



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORAS
DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO E CARBAPENEMASE TIPO
KPC ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS EM BELÉM, ESTADO DO
PARÁ.**

PATRICIA BENTES MARQUES

BELÉM-PARÁ
2016

PATRICIA BENTES MARQUES

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORAS DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO E CARBAPENEMASE TIPO KPC ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS EM BELÉM, ESTADO DO PARÁ.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro.

BELÉM-PARÁ

2016

PATRICIA BENTES MARQUES

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORAS DE β - LACTAMASES E CARBAPENEMASE TIPO KPC, ISOLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS EM BELÉM, ESTADO DO PARÁ.

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biologia de Agentes Infeciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biologia de Agentes Infeciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS.

Banca Examinadora: Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA.

Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS.

Profa. Dra Karla Tereza Silva Ribeiro
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA.

Prof. Dr. Anderson Nonato do Rosário Marinho
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS.

Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena (Suplente)
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA.

Belém, 13 de Dezembro de 2016.

“Ele não sabia que era impossível. Foi lá e fez”.

Jean Cocteau

Dedico esse trabalho aos meus pais José Maria (in memoriam) e Júlia, a minha amada Mãe “Aita” (in memoriam), ao Luiz e Larhissa Silva e a minha amiga Daniela Rocha que me apoiaram e estimularam a concretizar esse sonho.

Agradecimentos

Agradeço a DEUS por me iluminar e ser meu alicerce nos momentos de dificuldade e por colocar no meu caminho inúmeras pessoas maravilhosas que sempre me incentivam a seguir em frente e alegram a minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agente Infecciosos e Parasitários da Universidade Federal do Pará pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao Dr. Edvaldo Loureiro por aceitar a orientação desse projeto.

Ao Instituto Evandro Chagas/ Seção de Bacteriologia pela acolhida para o desenvolvimento dos experimentos desse trabalho.

Ao Dr. Ricardo Ishak e Dra Antonia Vieira que me estimularam a fazer o doutorado.

A Dra. Daniela Rocha e Dr. Anderson Marinho pelo apoio, suporte, conhecimentos transmitidos e amizade que foram essenciais para a realização desse estudo.

As Doutoradas Débora Costa e Aline Holanda, ao Dr. Yago Kanai e a aluna Érica Vidal pela amizade e apoio no desenvolvimento dos experimentos desse estudo.

Aos amigos do Laboratório de Entéricos/Seção de Bacteriologia pelos maravilhosos momentos compartilhados.

Ao Edmilson João Castro Lopes da Seção de Bacteriologia/Setor de Esterilização pela maravilhosa amizade e apoio no decorrer do desenvolvimento desse estudo.

As colegas Dra. Andrea Oliveira e Dra. Roberta Sodré pelo apoio no desenvolvimento desse estudo.

Ao amigo Raimundo Gladson Carvalho pelo estímulo e suporte dados ao desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Afonso Barth da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo suporte e orientações que foram muito importantes para o desenvolvimento desse estudo.

Ao Dr. Samir Casseb pelo apoio na realização do alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos.

Ao Luiz Carlos Santana da Silva pela parceria e imenso apoio no decorrer dessa trajetória.

A Larhissa Silva por ser a filha mais maravilhosa, amorosa, meiga e compreensiva de uma mãe que precisou se ausentar para realizar um sonho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE QUADROS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
1.1. A ESPÉCIE <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
1.1.1. Considerações gerais	13
1.1.2. Classificação e Nomenclatura da <i>Klebsiella</i>	16
1.2. ANTIMICROBIANOS β -LACTÂMICOS	17
1.2.1. Mecanismo de ação dos β-lactâmicos	17
1.2.2. Classificação dos β-lactâmicos	19
1.2.3. Mecanismo de resistência bacteriana aos β-lactâmicos	21
1.3. RESISTÊNCIA DE <i>K. pneumoniae</i> AOS ANTIMICROBIANOS	23
1.3.1. Beta- lactamases	23
1.3.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase (KPC)	27
1.3.3. Classificação das β- lactamases	28
1.3.4. Infecção hospitalar e comunitária associadas à <i>K. pneumoniae</i> produtoras de Beta-lactamases e KPC	30
1.3.5. Distribuição geográfica de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBL e KPC	31
1.4. TESTE DE TRIAGEM PARA ESBL e KPC	34
1.5. ABORDAGENS DE BIOLOGIA MOLECULAR EMPREGADAS NO ESTUDO DE ESBL E KPC	36
1.6. RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>K.pneumoniae</i> PRODUTORES DE BETALACTAMASE ÀS QUINOLONAS	37
1.7. RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>K. pneumoniae</i> PRODUTORES DE BETALACTAMASE AOS AMINOGLICOSÍDEOS	41
1.8. MECANISMOS DE TRANSFERÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA	42
1.9. PREVENÇÃO E CONTROLE	46
10. OBJETIVOS	47
2. MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1 ASPÉCTOS ÉTICOS	49
2.2 AMOSTRAGEM	49
2.3 DESENHO DO ESTUDO	49
2.4 CRITÉRIOS DE INCLUSAÕ E EXCLUSÃO	49
2.5 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DO ESTUDO	49

2.6 REIDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS	50
2.6.1. Teste de suscetibilidade antimicrobiana	50
2.6.2. Confirmação de isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBL	51
2.6.3. Confirmação de isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtores de KPC	51
2.6.4. Controle de qualidade para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos	51
2.6.5. Controle de qualidade para testes de suscetibilidade aos carbapenens	51
2.6.6. Análise Genotípica	51
2.6.6.1. Extração do DNA	51
2.6.6.2. Reação em cadeia mediada pela polimerase para ESBL	52
2.6.6.3. Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase para KPC	54
2.6.6.4. Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase para genes de resistência à quinolonas	54
2.6.6.5. Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase para genes de resistência aos aminoglicosídeos	56
2.6.6.6. Sequenciamento dos produtos da PCR	58
2.6.7.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
3. RESULTADOS	59
4. DISCUSSÃO	81
5. CONCLUSÃO	98
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cultura de espécimes de <i>K. pneumoniae</i> em Agar MacConkey.	14
Figura 2 - Etapas da síntese da parede celular bacteriana.	18
Figura 3 - Mecanismo de ação dos β -lactâmicos.	19
Figura 4 - A estrutura básica e classificação dos β -lactâmicos.	20
Figura 5 - Mecanismos de resistência bacterianos aos antibióticos.	21
Figura 6 - Mecanismos de ação das betalactamases.	23
Figura 7 - Linha do tempo do uso clínico dos β -lactâmicos e a detecção de betalactamases.	24
Figura 8 - Prevalência mundial de <i>K. pneumoniae</i> produtora de ESBL.	32
Figura 9 - Ocorrência de ESBL em Enterobactereaceae no Brasil.	33
Figura 10 - Distribuição de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de KPC.	33
Figura 11 - Estrutura química das quinolonas.	38
Figura 12 - Distribuição de genes plasmidiais relacionados à resistência as quinolonas.	40
Figura 13 - Aquisição de resistência à antibiótico (ab^r) por incorporação de DNA exógeno e mutação no cromossomo bacteriano.	43
Figura 14 - Sequência de Inserção e Transposon.	44
Figura 15 - Integron de classe I.	45
Figura 16 - Teste fenotípico de adição de ácido clavulânico para detecção de ESBL.	59
Figura 17 - Teste fenotípico de bloqueio enzimático com ácido fenil borônico para detecção de KPC.	59
Figura 18 - Resultados dos testes de triagem fenotípicas para detecção de isolados <i>K. pneumoniae</i> produtores de ESBL e KPC.	60
Figura 19 - Resultados da PCR para o gene <i>bla</i> CTX-M.	61
Figura 20 - Resultados da PCR para o gene <i>bla</i> SHV.	61
Figura 21 - Resultados da PCR para os gene <i>bla</i> TEM.	61
Figura 22 - Resultado da PCR para os gene <i>bla</i> KPC.	62
Figura 23 - Presença simultânea de genes <i>bla</i> CTX-M, SHV, TEM nas amostras estudadas.	62
Figura 24 - Resultados da PCR para o gene <i>ParC</i> .	63
Figura 25 - Resultado da PCR para o gene <i>GyrA</i>	64
Figura 26 - Resultados da PCR para os gene <i>AAC(6')-Ib</i> .	64
Figura 27 - Resultados da PCR para o gene <i>QnrB</i> .	64
Figura 28. Presença simultânea de genes <i>Gyra</i> , <i>ParC</i> , <i>QnrB</i> , <i>AAC (AAC(6')-Ib)</i> nas amostras estudadas.	65
Figura 29 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene <i>GyrA</i> e da sequência de aminoácidos codificados.	67
Figura 30 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene <i>ParC</i> e da sequência de aminoácidos codificados.	68
Figura 31 - Genes detectados pela análise do sequenciamento em amostras de <i>K.</i>	70

pneumoniae.

- Figura 32 - Relação entre isolados *K. pneumoniae* com os genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e o perfil de resistência à Amoxicilina/ácido clavulânico. 74
- Figura 33 - Relação entre isolados *K. pneumoniae* com os genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e o perfil de resistência à cefoxitina. 75
- Figura 34 - Relação entre isolados *K. pneumoniae* com genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e o perfil de resistência à cefalotina. 75
- Figura 35 - Relação entre isolados *K. pneumoniae* com os genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e o perfil de resistência à ceftriaxona. Dos isolados *K. pneumoniae* ESBL. 76
- Figura 36 - Relação entre isolados *K. pneumoniae* com os genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e o perfil de resistência à cefotaxima. 76
- Figura 37 - Relação entre isolados *K. pneumoniae* com genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e o perfil de resistência à ceftazidima. 77
- Figura 38 - Relação entre isolados *K. pneumoniae* com os genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e o perfil de resistência à cefepima. 77
- Figura 39 - Relação entre os isolados de *K. pneumoniae* contendo os genes *AAC(6')-Ib*, *ParC*, *Gyra*, *QnrB*, e o perfil de resistência à levofloxacina. 78
- Figura 40 - Relação entre os isolados de *K. pneumoniae* contendo os genes *AAC(6')-Ib*, *ParC*, *Gyra*, *QnrB*, e o perfil de resistência à ciprofloxacina. 78
- Figura 41 - Relação entre os isolados de *K. pneumoniae* contendo os genes *AAC(6')-Ib*, *ParC*, *Gyra*, *QnrB* e o perfil de resistência à norfloxacina. 79
- Figura 42 - Relação entre os isolados de *K. pneumoniae* contendo os genes *AAC(6')-Ib*, *ParC*, *Gyra*, *QnrB*, e o perfil de resistência ao ácido nalidíxico. 79
- Figura 43 - Fontes de isolamento de *K. pneumoniae* produtora de ESBL e KPC. 80
- Figura 44 - Ocorrência de ESBL em Enterobactereaceae no Brasil e genes identificados no estudo. 93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Antimicrobianos β -lactâmicos.	20
Quadro 2 - Classificação das principais β -lactamases produzidas por enterobactérias.	29
Quadro 3 - Critérios interpretativos do CLSI.	34
Quadro 4 - Exemplos de quinolonas segundo suas gerações.	38
Quadro 5 - Sequências iniciadoras utilizadas para os ensaios da PCR para identificação das ESBL e suas respectivas condições de reação.	53
Quadro 6 - Sequências iniciadoras utilizadas para os ensaios da PCR para identificação dos genes cromossômicos e plasmidiais que codifica resistência para quinolonas e suas respectivas condições de reação.	55
Quadro 7- Sequências iniciadoras utilizadas para os ensaios da PCR para identificação dos genes que codificam resistência para aminoglicosídeos e suas respectivas condições de reação.	57
Quadro 8 - Percentual de amplificações das reações de PCR para os genes <i>bla</i> CTX-M, SHV, TEM, KPC.	60
Quadro 9 - Percentual de amplificações das reações de PCR para os genes <i>QnrB</i> , <i>QnrA</i> , <i>QnrS</i> , <i>Gyr</i> , <i>ParC</i> , <i>AAA(6')-Ib</i> e <i>QepA</i> .	63
Quadro 10 - Perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados de <i>K.pneumoniae</i> produtores de KPC.	69
Quadro 11- Isolados produtores de KPC, genes sequenciados e concentração mínima inibitória.	72
Quadro 12 - Perfil de resistência aos antimicrobianos nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtora de ESBL.	73

RESUMO

A resistência aos antimicrobianos em bactérias da família *Enterobacteriaceae* está aumentando de forma alarmante no mundo todo. As *K. pneumoniae* constituem um importante grupo de patógenos humanos, causadores de infecções hospitalares e comunitárias. Nestas bactérias, a produção de beta-lactamases é um dos principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos e responsável pela falha da terapia antimicrobiana. Este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização molecular de espécimes de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL e KPC quanto a resistência aos antimicrobianos em pacientes hospitalizados em Belém-PA. Foram analisadas 124 espécimes de *K. pneumoniae* oriundas de um hospital público de Belém-Pará. Foram realizadas nesses espécimes testes de suscetibilidade a antimicrobianos, testes fenotípicos para detecção de betalactamases de espectro ampliado (ESBL) e *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC). Posteriormente foram realizadas reações de cadeia de polimerase (PCR) e o sequenciamento de DNA para identificar os genes determinantes de resistência aos antimicrobianos. Foi observado que 83% dos isolados apresentaram o gene *bla* CTX-M, 85,5% o *bla* SHV, 83% o *bla* TEM e 5% o gene *bla* KPC. Quanto aos genes que codificam ESBL o gene *bla* CTX-M-71 foi isolado com maior frequência e foi identificado em 60% dos isolados analisados. Os outros genes que codificam ESBL foram *bla* SHV-38 (5%), *bla* SHV-100 (5%) and *bla* SHV-12 (3,5%). O gene *bla* KPC-2 foi detectado em 100% dos isolados. Estas enterobactérias apresentaram fenótipos de multidroga resistência com elevados níveis para os quinolonas e aminoglicosídeos. Foram observadas associações entre os genótipos e a resistência aos antibióticos. A presença de micro-organismos multirresistentes em unidades hospitalares reforça a necessidade de medidas para a rápida contenção de possíveis infecções causadas por esses patógenos.

ABSTRACT

The antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* is increasing worldwide. The *K. pneumoniae* constitute an important group of human pathogen, causing of hospital and communitarian infections. In these bacteria, the production of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) is one of the main mechanisms of resistance the antimicrobials, responsible for the imperfection of the therapy against infections for gram-negative bacilli. This work aimed to do the molecular characterization of the *K. pneumoniae* producing ESBL and KPC about antimicrobial resistance in patients from Belém-PA. A total of 124 *K. pneumoniae* isolates were collected from public hospital from Belém-PA and susceptibility test was performed to detect its susceptibility patterns antibiotics. Phenotypic tests for extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) producing strains were performed to detect the resistance phenotype of the isolates. Then PCR amplification and sequencing analysis were performed for the drug resistance determinants genes. The results showed that 83% strains harbored *bla* CTX-M gene, 85,5% carried *bla* SHV , 83% carried *bla* TEM and 5% carried *bla* KPC. The most frequent gene ESBL detected was *bla* CTX-M-71, which was observed in 60% of isolates. Other ESBL genes were *bla* SHV-38 (5% of isolates), *bla* SHV-100 (5% of isolates) and *bla* SHV-12 (3,5% of isolates). O gene *bla* KPC-2 was detected in 100% of isolates. These enterobacterias showed multidrug resistance phenotypes with high levels for quinolones and aminoglycosides. Associations between genotypes and antibiotic resistance were observed. The presence of multidrug resistant micro-organisms in hospitals, reinforces the need for measures for rapid containment of possibles infections caused by these pathogens.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A ESPÉCIE *Klebsiella pneumoniae*

A denominação *Klebsiella* usada para designar o gênero de bactérias que pertence à família *Enterobacteriaceae* foi dado por Trevisan em 1885 em homenagem a Edwin Klebs, microbiologista alemão, que descreveu a espécie *Klebsiella pneumoniae* (Ørskov, 1984, Brisse *et al.*, 2006).

A espécie *Klebsiella pneumoniae*, considerada espécie-tipo do gênero *Klebsiella*, foi inicialmente conhecida como “bacilo de Friedländer” em referência a Carl Friedländer. Esse pesquisador relatou, em 1883, a presença de cápsula e a forma bacilar, como características morfológicas de destaque observadas na análise de cortes histológicos de amostras obtidas do trato respiratório de pacientes que foram a óbito devido à pneumonia (Austrain, 1960, Ørskov, 1984).

A pneumonia causada pelos “bacilos de Friedländer” passou a ser freqüentemente relatada, predominando em homens de meia idade com histórico de abuso de álcool como fator de predisposição, sendo referida como “pneumonia de Friedländer” (Bullock *et al.*, 1937, Salomon, 1937, Barber & Grant, 1952, Limson *et al.*, 1956, Holmes, 1956).

1.1.1. Considerações gerais

A *K. pneumoniae* é um bacilo Gram negativo, pode apresentar a forma bacilar ou cocobacilar, mede cerca de 0,3 a 1,5 μm de largura e 0,6 a 6 μm de comprimento, apresentam cápsula, são anaeróbios facultativos, fermentam glicose com ou sem produção de gás, são oxidase negativos, não formam esporos, são imóveis, desenvolvem-se em meios básicos, ricos e seletivos (Figura 1). Alguns isolados obtidos do trato urinário necessitam de suplementação com cisteína para se desenvolver (Abbot, 2007, López Vargas & Echeverri Toro, 2010).

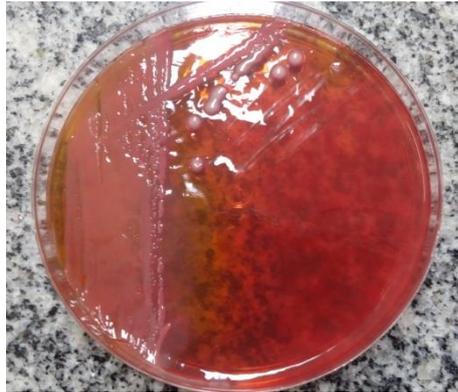


Figura 1 - Cultura de espécimes de *K. pneumoniae* em Agar MacConkey.

Fonte: O autor

A *K. pneumoniae* está amplamente distribuída na natureza, na água, esgoto, solo, plantas, bem como é normalmente encontrada no intestino do homem e de outros animais (Brisse *et al.*, 2006).

No homem a *K. pneumoniae* está presente como saprófita no trato intestinal e nasofaringe. No entanto, a colonização do intestino constitui um reservatório importante para a transmissão da bactéria, principalmente no ambiente hospitalar (Dhillon & Clark, 2012, Lin *et al.*, 2013).

A patogenicidade da *K. pneumoniae* está associada à vários fatores de virulência que facilitam sua evasão do sistema de defesa e sua manutenção no sítio infeccioso. Tais fatores incluem: a presença de lipopolissacarídeo, adesina, sistema de aquisição de ferro, resistência ao soro, formação de biofilme, cápsula e hipermucoviscosidade (El Fertas-Aissani *et al.*, 2013).

A colonização do trato intestinal de um indivíduo constitui frequentemente a etapa inicial das infecções causadas por *K. pneumoniae*. Além disso, pode haver outros tipos de colonização como a do trato urinário e trato respiratório (Li *et al.*, 2014). A colonização é seguida pela aderência às superfícies dos tecidos do indivíduo e a invasão de suas células (Struve *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2016). Essas propriedades de adesão de espécimes de *Klebsiella* spp. têm sido mediadas por fímbria tipo 1, fímbria tipo 3, adesina codificada por plasmídeo CF29K e fímbria KPK (Sahly *et al.*, 2008).

Os lipopolissacarídeos bacterianos e sistemas de aquisição de ferro facilitam a multiplicação bacteriana nos tecidos durante sua disseminação sistêmica. Alguns

plamídeos codificam proteínas que promovem a aderência às superfícies plásticas (Toro *et al.*, 2009).

A cápsula é um dos determinantes de virulência mais importante, protege contra a atividade bactericida do soro, peptídeos antimicrobianos e fagocitose (Lery *et al.*, 2014). Atualmente, são conhecidos cerca de 78 sorotipos capsulares relacionados ao antígeno K, porém K1 e K2 são os que mais se destacam (Li *et al.*, 2014).

O grau de virulência entre as linhagens de *K. pneumoniae* que expressam antígeno K está associado ao conteúdo de manose presente nos polissacarídeos capsulares. As linhagens que expressam antígenos K7 ou K12 têm baixa virulência por conter sequências repetidas de manose. Tais sequências são reconhecidas por lectinas de superfície de macrófago, o qual promove a fagocitose independentemente da opsonização denominada lectino-fagocitose (Podoschun & Ullmann, 1998, Brisse *et al.*, 2009).

Uma nova variante de *K. pneumoniae* hipervirulenta (hvKP), produtora de hiper mucoviscosidade, foi primeiramente detectada na Ásia, se disseminou e já foi relatada no Canadá, Europa, Estados Unidos, Israel, África do Sul e Austrália (Shon & Russo, 2012, Lee *et al.*, 2016). Inicialmente, as infecções foram diferenciadas das causadas comumente por espécimes de *K. pneumoniae* (cKP) pela apresentação na forma de abscesso hepático, meningite, fasciite necrotizante, pneumonia grave adquirida na comunidade. Os sorotipos K1 e K2 foram associados aos casos de abscesso hepático, frequentemente causando complicações devido à metástase (Li *et al.*, 2014). Essas infecções têm sido frequentemente relatadas em pacientes de origem asiática e com diabetes Mellitus, muito embora possa acometer indivíduos de várias etnias e não diabéticos (Paczosa & Meccas, 2016).

A *K. pneumoniae* é um micro-organismo muito adaptado ao ambiente hospitalar devido a diferentes propriedades e características. Sua cápsula hidrofílica lhe confere a capacidade de resistir à dessecação do meio ambiente e sobreviver na pele contribuindo para sua transmissão através das mãos contaminadas dos profissionais de saúde (Toro *et al.*, 2009).

As infecções causadas por isolados de *K. pneumoniae* produtores de enzimas que inativam antimicrobianos têm sido associadas a um aumento do tempo das internações e dos custos hospitalares. Observou-se adicionalmente, altas taxas de

mortalidade associadas à bacteremia causadas por esses isolados (Giske *et al.*, 2008).

No Brasil observou-se uma taxa de mortalidade de 49,2% associadas às bacteremias por isolados de *K. pneumoniae* produtores de enzimas que inativam antimicrobianos (Tuon *et al.*, 2011).

As altas taxas de morbimortalidade associadas às infecções causadas por *K. pneumoniae*, bem como, os relatos crescentes de surtos de infecções hospitalares por esses micro-organismos, reforçam a extrema importância de seu monitoramento no ambiente hospitalar (Meyer & Picoli, 2011, Falagas *et al.*, 2014).

Uma situação ainda mais preocupante foi apresentada recentemente no estudo de Derakhshan *et al.* (2016), cujos resultados indicam uma associação entre genes que codificam fatores de virulência e a resistência aos antimicrobianos em isolados clínicos de *K. pneumoniae*. Foi observado a presença de genes de virulência, como exemplo do gene *wcaG* responsável pela biossíntese da cápsula bacteriana em elementos móveis e que podem ser transferidos por conjugação junto com genes de resistência, o que pode ocasionar uma infecção por bactérias resistentes aos antimicrobianos com um perfil mais invasivo e de difícil manejo terapêutico e com possibilidade de disseminar e causar surtos no ambiente hospitalar. Tal perfil foi observado nos isolados estudados, os quais produzem betalactamases de espectro ampliado (ESBL).

1.1.2. Classificação e Nomenclatura da *Klebsiella*

A *K. pneumoniae* pertence à família *Enterobacteriaceae*. A classificação das espécies de *Klebsiella* foi inicialmente baseada na observação de suas características nos processos patológicos (Hay, 1932). Posteriormente, foram propostas chaves taxonômicas baseadas em aspectos como a utilização de substratos e atividades de enzimas (Martínez *et al.*, 2004). Outras metodologias como sorotipagem, fagotipagem, tipagem por bacteriocinas, tipagem molecular podem ser empregadas para discriminar espécies do gênero *Klebsiella* (Podschung & Ulmann, 1998, Singh *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de abordagens moleculares tem fornecido novas revisões na taxonomia das espécies do gênero *Klebsiella*. Através da hibridização de DNA-DNA total foram definidos cinco espécies para o gênero *Klebsiella*: *K. pneumoniae*

(com três subespécies: subespécie *pneumoniae*, subespécie *ozanae*, subespécie *rhinoscleromatis*); *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. terrigena* e *K. mobilis*. Ainda não está definido se a *K. ornithinolytica* é uma espécie independente ou uma subespécie da *K. planticola*. Devido à dificuldade para realizar a cultura de *K. granulomatis*, não há dados para fundamentar sua classificação (Martínez *et al.*, 2004).

1.2. ANTIMICROBIANOS β -LACTÂMICOS

Os β -lactâmicos constituem uma ampla classe de fármacos muito utilizada na terapêutica de infecções comunitárias ou nosocomiais, em função de seu amplo espectro de atividade. Além disso, esses fármacos têm toxicidade seletiva contra as bactérias devido ao seu efeito deletério sobre a parede celular, constituinte inexistente nas células humanas (Shaikh *et al.*, 2015).

1.2.1. Mecanismo de ação dos β -lactâmicos

A parede celular das bactérias Gram negativas é constituída por uma membrana externa e por peptídeoglicanos. Os peptídeoglicanos conferem às bactérias uma rigidez que favorece a resistência aos meios de baixa pressão osmótica. A parede celular é constituída por cadeias alternadas de resíduos de dissacarídeos de ácido N-acetilmurâmico (NAM) e N-acetilglicosamina (NAG), ligadas por pontes de peptídeos entre as unidades de NAM. As ligações das cadeias de NAM e NAG são feitas por transglicosidases, já as ligações peptídicas que unem os resíduos terminais de aminoácidos presentes nas unidades de NAM são catalisadas por serinas proteases como as transpeptidases, carboxipeptidases e endopeptidases, também conhecidas como *Penicillin Binding Proteins* (PBP), por serem os alvos dos antimicrobianos (Kong *et al.*, 2010, Lakshmi *et al.*, 2014)

As bactérias se reproduzem por divisão binária, porém antes desta divisão é necessário a produção de peptídeoglicano, para que haja extensão do tamanho e posterior separação da célula filha. Neste processo ocorre a união de fragmentos novos de peptídeoglicanos com outros preexistentes, mas para que haja a inserção desses novos fragmentos é necessário a ação de autolisinas bacterianas que inativam ligações covalentes com alguns peptídeoglicanos já presentes, liberando espaços para a formação de uma nova parede celular (Figura 2) (Typas *et al.*, 2012).

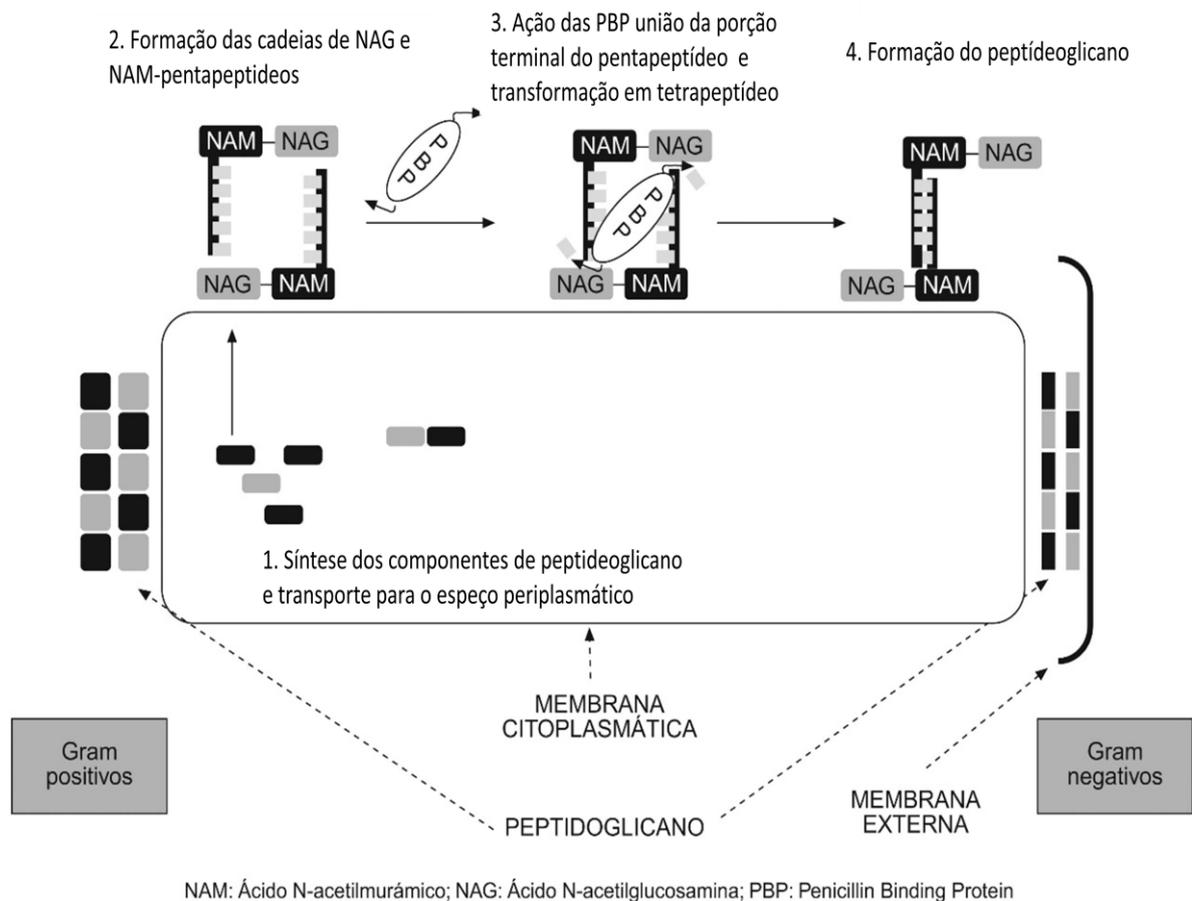
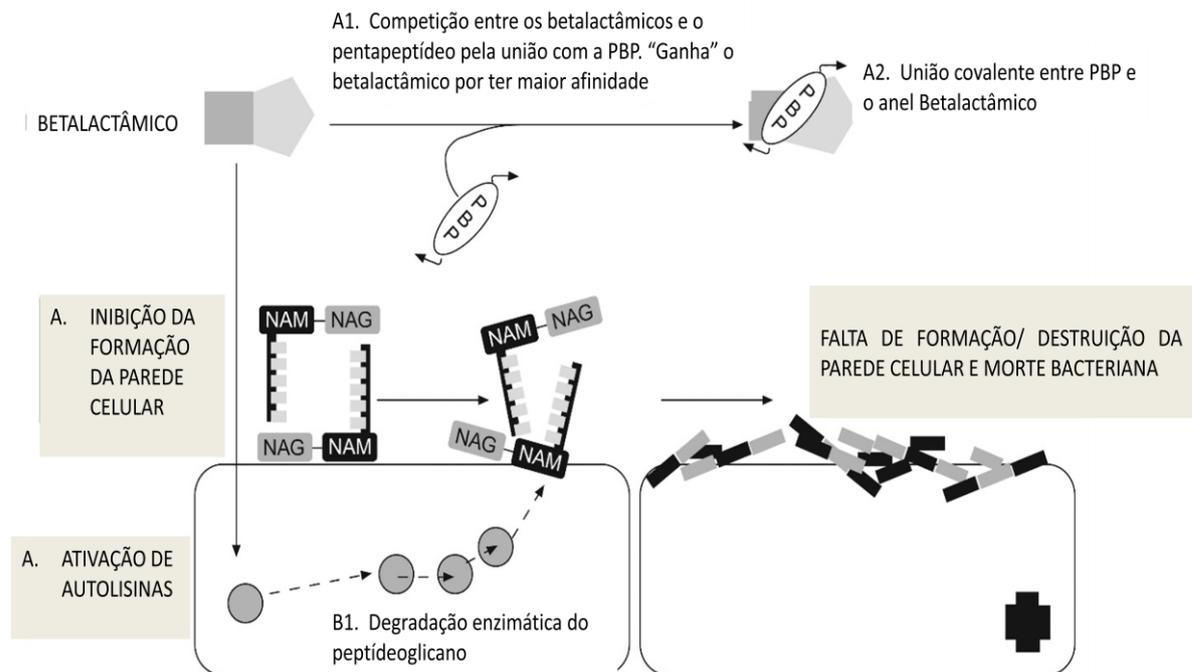


Figura 2 - Etapas da síntese da parede celular bacteriana.

Fonte. Adaptado de Suárez & Gudíol (2009).

Os β -lactâmicos atuam no estágio final da biossíntese de peptídeo glicano, inibindo as enzimas PBP. São análogos estruturais dos substratos das PBPs e sua atividade antimicrobiana reside no anel β -lactâmico, quando o mesmo toma o lugar do substrato. O anel sofre ruptura e ocorre a inativação da PBP, com a qual forma uma ligação covalente (Figura 3) (Laddomada *et al.*, 2016).

A inibição da ligação cruzada que ocorre no processo de síntese da parede celular não impede a ação das autolisinas, as quais tornam a estrutura da parede celular instável e fraca. A integridade da parede celular bacteriana é essencial para a manutenção da estabilidade osmótica e, sem a mesma, a bactéria sofre lise (Draws & Bonomo, 2010, Dhillon & Clark, 2012) (Figura 3).



NAM: Ácido N-acetilmurâmico; NAG: Ácido N-acetilglucosamina; PBP: Penicillin Binding Protein

Figura 3 - Mecanismo de ação dos β -lactâmicos.

Fonte. Adaptado de Suárez & Gudiol (2009).

1.2.2. Classificação dos β -lactâmicos

A maioria dos antibióticos com ação ativa na parede celular pertence à da classe dos β -lactâmicos (Dhillon & Clark, 2012). Para que o anel β -lactâmicos efetue sua atividade é importante que esteja ligado a outro radical, frequentemente outro anel. Os radicais e a composição dos anéis são elementos importantes para a classificação dos β -lactâmicos. Integram essa classe as penicilinas, cefalosporinas, monobactam, carbapenens e inibidores de β -lactamases (Figura 4) (Lakshmi *et al.*, 2014). Pequenas alterações nas estruturas químicas modificam as características dos antimicrobianos, o que pode ser percebido dentro de cada categoria quanto à afinidade por receptores, espectro de atividade e resistência às β -lactamases (Fernandes *et al.*, 2013). No Quadro 1 são apresentados os principais β -lactâmicos (Drawz & Bonomo, 2010).

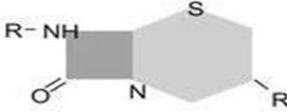
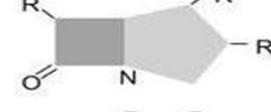
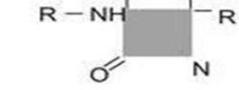
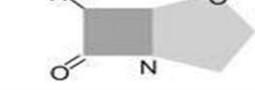
 Anel beta-lactâmico	Anel secundário	Grupo antibiótico
	Anel tiazolidina	PENICILINAS
	Anel di-hidrothiazida	CEFALOSPORINAS
	Anel pirrolínico	CARBAPENÊMICOS
	Nenhum	MONOBACTÂMICOS
	Anel oxazolidínico	ÁCIDO CLAVULÂNICO

Figura 4 - A estrutura básica e classificação dos β -lactâmicos.

Fonte: Adaptado de Suárez & Gudioul (2009).

Quadro 1 - Antimicrobianos β -lactâmicos.

Classes dos antimicrobianos	Características	Agentes
Penicilinas	Curto Espectro	Penicilina G, Penicilina V
	Amplo espectro	Ampicilina, Amoxicilina, Carbenicilina, Piperacilina
	Penicilinas estáveis	Oxacilina, cloxacilina
	Associadas aos inibidores de β -lactamases	Ampicilina/sulbactam, Amoxicilina/ ácido clavulânico, Ticarcilina/ ácido clavulânico, Piperacilina/Tazobactam
	Penicilinas de 3 ^o geração	Carbenicilina, Ticarcilina
	Penicilinas de 4 ^o geração	Piperacilina, mezlocilina, Azlocilina
Cefalosporinas	Cefalosporinas 1 ^o geração	Cefalexina, cefadroxil, cefaclor, cefalotina, cefazolina
	Cefalosporinas 2 ^o geração	Acetil-cefuroxime, cefprozil, cefoxitima, cefuroxima
	Cefalosporinas 3 ^o geração	Ceftamet, Cefixime, Cefpodoxima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefoperazona
	Cefalosporinas 4 ^o geração	Cefepima, Cefpiroma
	Cefalosporinas 5 ^o geração	Ceftobiprole, Ceftaroline
Monobactâm	-	Aztreonam
Carbapenens	-	Imipenem, Meropenem, Ertapenem, Doripenem

Fonte: Adaptado de Fernandes *et al.*, 2013.

1.2.3. Mecanismo de resistência bacteriana aos β -lactâmicos

A resistência antimicrobiana é um fenômeno natural da evolução dos micro-organismos e ocorre após mutações e recombinações genéticas. O uso de antimicrobianos pode eliminar os micro-organismos ou favorecer a sua adaptação. As bactérias que sobrevivem carregam os genes de resistência que podem ser transmitidos para bactérias da mesma espécie, bem como para as de espécies diferentes. Essa pressão seletiva limita as opções terapêuticas e contribui para a manutenção e a ampliação da resistência bacteriana (Davies & Davies, 2010, Wozniak, 2010).

Por conceito, a resistência bacteriana aos antimicrobianos é a capacidade de um micro-organismo sobreviver às concentrações desses fármacos que eliminariam bactérias sensíveis de sua população original (Lupo *et al.*, 2012).

A resistência bacteriana pode ser categorizada em intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca é característica de toda a espécie. A resistência adquirida ocorre através de mutações, que acontecem durante a multiplicação das bactérias, ou da aquisição de DNA exógeno, devido a transferência de genes de organismos resistentes para os sensíveis (Blair *et al.*, 2015).

As bactérias podem apresentar resistências aos antimicrobianos β -lactâmicos através dos seguintes mecanismos: modificações de PBPs, alteração da permeabilidade aos antimicrobianos, hiperexpressão de bombas de efluxo de antimicrobianos e produção de enzimas inativadoras de antimicrobianos (Figura 5) (Rao *et al.*, 2014, Blair *et al.*, 2015).

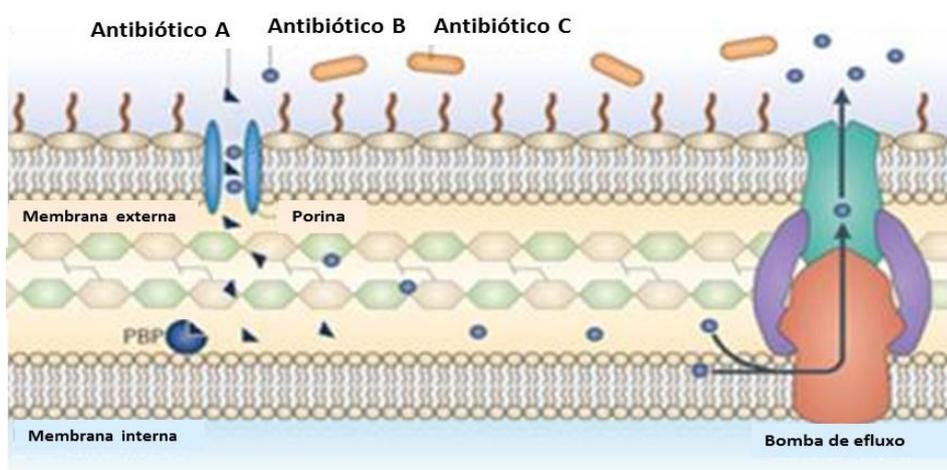


Figura 5 - Mecanismos de resistência bacterianos aos antibióticos. O Antibiótico A entra na bactéria através da porina, liga-se a PBP e inibe a síntese de peptidoglicano. O Antibiótico B entra na bactéria através da porina, porém é removido pela bomba de efluxo. O antibiótico C não atravessa a membrana externa e não se liga a PBP.

Fonte: Adaptado de Blair *et al.*, 2015.

A diminuição da permeabilidade celular está associada a perda ou a diminuição da expressão de proteínas de membrana externa, as porinas, que são as principais portas de entrada para os antimicrobianos (Sugawara *et al.*, 2016). Os principais alvos dos β -lactâmicos estão no interior das bactérias e para atingí-los é necessário transpor a membrana celular bacteriana. Por serem hidrofílicos, esses fármacos dependem dos canais de porinas para atravessar a membrana e atingir o espaço periplasmático (Fernades *et al.*, 2013). Mutações nos genes que codificam porinas, interferem no influxo dos β -lactâmicos para a bactéria, promovendo sua ineficácia clínica (Sugawara *et al.*, 2016).

A hipereexpressão de sistemas de efluxo que tem como substrato os β -lactâmicos favorece a extrusão do antimicrobiano inviabilizando sua ação (Blair *et al.*, 2015).

As modificações nas PBPs causam uma diminuição na afinidade dos antimicrobianos β -lactâmicos para essas proteínas, permitindo assim a ação da PBP na continuidade da formação da parede celular bacteriana (Rossi, 2011). Esse tipo de mecanismo de resistência é mais raro em bactérias Gram negativas. Foi detectado em *E. coli* mutações na PBP2 com associação à resistência para carbapenem (Yamachika *et al.*, 2013, Beceiro *et al.*, 2015)

A produção de β -lactamases é considerado o mecanismo de resistência aos β -lactâmicos mais frequentemente encontrado em bactérias Gram negativas e muitos estudos têm relatado esse mecanismo em isolados de *K. pneumoniae* (Livermore, 2012, Ejaz *et al.*, 2013, Manojkuma *et al.*, 2014)

As β -lactamases inativam os antimicrobianos β -lactâmicos através da hidrólise de seu anel β -lactâmicos. Inicialmente, as β -lactamases se ligam-se de forma não covalente a esse anel, que é atacado pela hidroxila livre do lado do sítio ativo do resíduo de serina, originando a formação de uma ligação covalente acil-éster. A

hidrólise do éster formado libera a enzima ativa e o antimicrobiano inativo, formando água e ácido penicilóico (Figura 6) (Livmore, 1995).

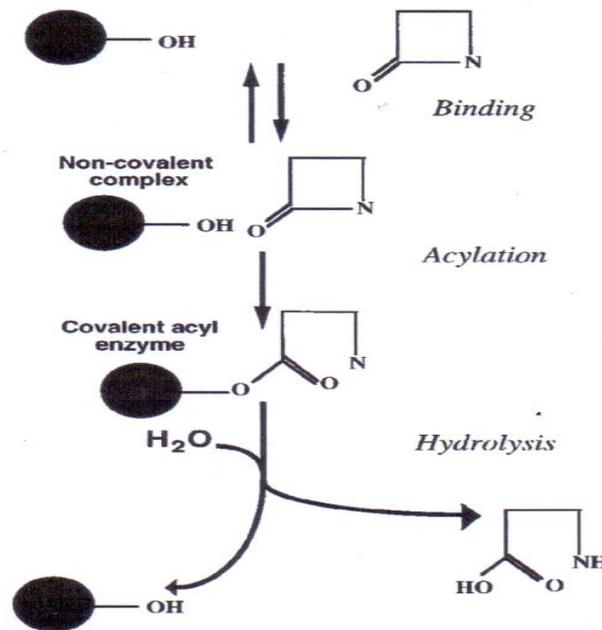


Figura 6 - Mecanismos de ação das betalactamases.

Fonte. Livmore (1995).

1.3. RESISTÊNCIA DE *K. pneumoniae* AOS ANTIMICROBIANOS

1.3.1. Beta- lactamases

A rápida emergência de resistência aos antimicrobianos entre os patógenos prevalentes é uma das mais sérias ameaças ao controle de doenças infecciosas. Nessa perspectiva, pode-se destacar a inativação de antibióticos β - lactâmicos por β - lactamases, como um dos principais mecanismos de resistência que inviabiliza o uso desses fármacos para o tratamento de infecções bacterianas (Grover *et al.*, 2013, Rao *et al.*, 2014). A figura 7 ilustra uma linha do tempo sobre o início de uso clínico de β -lactâmicos e sua inativação por betalactamases.

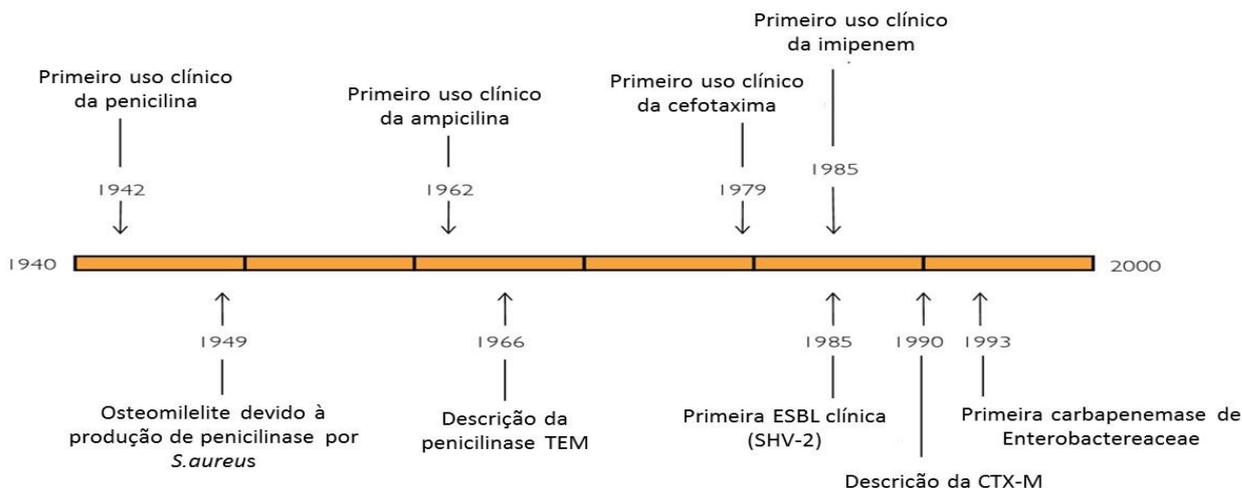


Figura 7 - Linha do tempo do uso clínico dos β -lactâmicos e a detecção de betalactamases.

Fonte. Adaptado de Rice (2012).

Muitos gêneros de bacilos Gram negativos produzem β -lactamases, as quais podem ser codificadas por genes presentes nos cromossomos ou plasmídeos. A primeira β -lactamase (TEM-1) identificada em bactérias Gram negativas, mediada por plasmídeo, foi descrita em 1965 (Sutcliffe, 1978). A enzima TEM-1 foi originalmente encontrada em uma cepa de *Escherichia coli* isolada de uma paciente na Grécia de nome Temoniera, daí sua designação TEM. Posteriormente, foi descrita a enzima SHV-1 (de sulfidril variável), uma outra β -lactamase plasmidial encontrada em isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* (AJ-Jasser, 2006).

A enzima TEM-1 foi relatada como a β -lactamase mais frequente em bacilos Gram negativos. Cerca de 90% da resistência à ampicilina em isolados de *Escherichia coli* foram atribuídas à presença dessa enzima. Já a SHV-1 foi considerada responsável por 20% da resistência à ampicilina mediada por plasmídeo em cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Shah *et al.*, 2004).

Para atuar na ação hidrolítica das β -lactamases foram desenvolvidos novos antibióticos β -lactâmicos. Apesar disso, a cada novo β -lactâmico produzido e usado na terapêutica, novas β -lactamases surgiram causando resistência a essa nova classe de fármacos. Provavelmente, a pressão seletiva e o uso indiscriminado desses antibióticos provocaram a emergência de outros tipos de β -lactamases (Hassan *et al.*, 2013). A primeira enzima capaz de hidrolisar esses novos antibióticos, SHV-2, foi encontrada em *Klebsiella ozaenae*, isolada na Inglaterra.

Devido a grande potência frente a esses novos antibióticos β -lactâmicos, essas enzimas foram denominadas de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) (Saha *et al.*, 2004).

As β -lactamases de espectro ampliado são enzimas que hidrolisam os antimicrobianos oximino β -lactâmicos incluindo as penicilinas, ceftazidima, cefotaxima e o aztreonam e são sensíveis às cefamicinas e aos inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, bem como aos carbapenens (Rao *et al.*, 2014). As ESBLs são mais frequentes em *Klebsiella spp* e *E. coli*, no entanto, a facilidade de transmissão mediada por plasmídeo e transposons, possibilitou a disseminação das ESBLs para outras bactérias como: *Serratia marcescens*, *Enterobacter spp*, *Salmonella spp*, *Citrobacter freundii* e *Pseudomonas aeruginosa* (Coque *et al.*, 2008, Dhillon & Clark, 2012, Mobarak-Qamsari *et al.*, 2013).

As bactérias produtoras de ESBL foram relatadas no início da década de 80 na Europa. Na Alemanha foram observados os primeiros isolados e na França ocorreu o primeiro surto hospitalar (Knothe *et al.*, 1983, Brun-Buisson *et al.*, 1987).

As ESBL surgiram a partir de mutações pontuais nos genes *bla* SHV e *bla* TEM, que codificam as beta-lactamases SHV-1, TEM-1 e TEM-2. Essas mutações resultaram em substituição de aminoácidos das enzimas parentais, o que favoreceu a produção de novas enzimas com maior afinidade por beta-lactâmicos de espectro estendido (Perez *et al.*, 2007).

Um novo tipo de ESBL, a CTX-M, codificada por plasmídeo, foi detectada em vários países e atualmente é detectada com frequência em isolados de *Klebsiella pneumoniae* (Coque *et al.*, 2008, Millán *et al.*, 2013). A ESBL CTX-M foi observada inicialmente em *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e *E. coli*. No entanto já sido descrita também em outras espécies da família Enterobacteriaceae (Bradford *et al.*, 1998, Dhillon & Clark, 2012).

A ESBL CTX-M tem pouca homologia com β -lactamase da família TEM e SHV, apresentando cerca de 40% de similaridade com essas enzimas. Porém tem cerca de 70 a 75% de similaridade com as β -lactamases cromossômicas AmpC de *Kluyvera spp*, uma enterobactéria que raramente é observada nos isolados associados a infecções na microbiologia médica (Humeniuk *et al.*, 2002).

A ESBL CTX-M compõe uma família heterogênea de cerca de mais de 50 membros, os quais são classificados em cinco grupos filogeneticamente distintos:

CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M9, CTX-M-25. Os grupos 1 e 2 estão associados com escape de genes cromossomais de *Kluyvera ascorbata*, enquanto que os grupos 8 e 9 estão associados com escape de genes cromossomais de *Kluyvera georgiana*. Uma vez em movimento os genes *bla* CTX-M podem se inserir em muitos elementos, mas frequentemente, se inserem em plasmídeos multirresistentes (Livemore *et al.*, 2007). O elemento de inserção ISEcp1 é frequentemente associado à inicialização dos eventos de mobilização do gene *bla* CTX-M. Porém, isso não é válido para as ESBL CTX-M dos grupos 2 e 9 que tem o escape dos genes de *Kluyvera* spp. facilitado por um elemento phago-relacionado (Brigante *et al.*, 2005, Livemore *et al.*, 2007).

A análise de cinética enzimática de ESBL CTX-M demonstrou que a enzima é mais ativa para a hidrólise de cefotaxima e ceftriaxona do que de ceftazidima, embora algumas mutações possam aumentar a hidrólise para a ceftazidima. Como exemplo pode-se referir a CTX-M-15 que difere da CTX-M-2 apenas pela substituição do resíduo de aspartato por glicina na posição 240 da proteína. Tem sido sugerido que os resíduos de serina na posição 237 presente em todas as ESBL CTX-M realiza um papel importante no espectro ampliado de atividade dessas enzimas. Adicionalmente, a presença de resíduos de arginina na posição 276 parece ter ação na cinética dessas enzimas auxiliando na hidrólise das oximinocefalosporinas (Bradford, 2001).

Têm sido detectadas, em amostras de *K. pneumoniae* que produzem ESBL do tipo TEM, SHV e CTX-M, β -lactamases do tipo AmpC de origem plasmidial (Song *et al.*, 2011). Os genes AmpC plasmidiais são derivados dos genes cromossômicos de várias espécies da família *Enterobacteriaceae*. Esses genes estão localizados geralmente nos integrons de classe I, em plasmídeos que contém genes que codificam para as ESBL citadas inicialmente (Toleman *et al.*, 2003). As AmpC plasmidiais conferem resistência às cefalosporinas de terceira geração, cefamicinas e inibidores de β -lactamases. Já foram descritos na literatura nove tipos de AmpC plasmidiais, são elas CMY, MOR, MIX, LAT, FOX, DHA, ACT, ACC, CFE (Jacoby, 2009).

As ESBL tipo OXA são mais comumente encontradas em *P. aeruginosa*, porém já foram detectadas em outros Gram-negativos, incluindo bactérias da família *Enterobacteriaceae* (Paterson & Bonomo, 2005). As OXA-ESBL conferem resistência à ampicilina, cefalotina, oxacilina, cloxacilina e meticilina e apresentam

grande heterogeneidade quanto ao espectro de hidrólise, sendo alguns tipos resistentes aos inibidores de β -lactamases e outras OXA-ESBL sensíveis ao ácido clavulânico (Nordmann *et al.*, 2011). As ESBL-OXA são derivadas de OXA-2 e OXA-10 e apresentam como substrato preferencial a cefotaxima e em menor grau ceftazima e aztreonam (Toleman *et al.*, 2003)

Outros tipos de ESBL são PER, VEB, GES, BES, TLA, BEL e SFO. Essas enzimas são enzimas detectadas em menor frequência em relação as ESBL tipo SHV, TEM e CTX-M, fato parece estar relacionado à localização do genes que codificam essas enzimas em plasmídeos não conjugativos (Nordmann *et al.*, 2011).

As ESBL são codificadas por plasmídeos que podem apresentar uma grande variedade de genes que também codificam resistência para outros antimicrobianos como aminoglicosídeos, trimetropim, sulfonamidas, tetraciclina e clorofenicol. Dentre os genes mais frequentemente relatados estão os genes *qnr*, associado a resistência adquirida às quinolonas, e o genes *rmtD* e *armA* que codificam para uma RNA metilase associada à resistência aos aminoglicosídeos. Tais aspectos contribuem para que os isolados produtores de ESBL tenham como característica atual um espectro de resistência a múltiplas classes de antimicrobianos (Pitout *et al.*, 2005, Yang *et al.*, 2011).

1.3.2. *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC)

No final da década de 80 os carbapenêmicos foram instituídos como alternativa terapêutica para o tratamento de infecções graves, causadas por bactérias Gram negativas produtoras de AmpC e de ESBL (Saha, 2008).

O uso abusivo dos carbapenêmicos possibilitou a seleção e disseminação de bactérias resistentes a esses antibióticos. Dentre os mecanismos associados à resistência bacteriana aos carbapenêmicos destaca-se a produção de carbapenemases (Naas *et al.*, 2008, Grupta *et al.*, 2011).

As carbapenemases podem ser divididas em serino carbapenemases e metalo-betalactamases. As primeiras pertencem a categorias das classes A e D de Ambler e as metalo-betalactamases à classe B de Ambler (Bush, 2010).

Em relação às serino carbapenemases pode-se citar as GES, SME-1, IMI, NMC-a, OXA e KPC (Nordmann *et al.*, 2011) e quanto às metalo-betalactamases as principais famílias são IMP, GIM, VIM, GIM, NDM e SPM (Bush, 2010).

A KPC confere resistência a todos os antibióticos β -lactâmicos como as penicilinas, cefalosporinas, monobactam e carbapenem. Essa enzima é codificada por genes associados a transposon e tem sido identificada em plasmídeos conjugativos (Anderson *et al.*, 2007, Won *et al.*, 2011).

A enzima KPC foi inicialmente detectada em isolados de *K. pneumoniae* resistente a carbapenens, nos Estados Unidos, sendo denominada KPC-1 (Yigit *et al.*, 2001). Após o relato da KPC-1 foram descritas variantes enzimáticas com aminoácidos diferentes como KPC-3 (His 272→Tyr) associada a surto de infecção hospitalar (Le *at al.*, 2010). Atualmente vinte e três variantes são produzidas por vários gêneros e espécies da família *Enterobacteriaceae* e bacilos não fermentadores (<https://www.lahey.org/studies/other.asp> acessado em 28/05/2016).

1.3.3. Classificação das β - lactamases

As classificações mais comumente aplicadas para categorizar as betalactamases são as de Ambler (1980) e a de Bush *et al.* (1995). A primeira baseia-se na estrutura molecular e agrupa as enzimas em quatro classes: A, B, C e D, de acordo com sua sequência de nucleotídeos e aminoácidos. A principal diferença entre os grupos da classificação de Ambler é que as classes A, C e D atuam através de um mecanismo baseado em serina, enquanto que a classe B necessita de zinco como cofator para a sua atuação. A maioria das ESBL contém serina em seu sítio ativo e pertencem à classe A de Ambler. A classificação de Bush *et al.* (1995) permite categorizar as enzimas em quatro grupos de acordo com o seu substrato preferencial e propriedades inibitórias. Com base nessa classificação, as ESBL pertencem ao grupo 2 be, constituído por enzimas de amplo espectro contra antimicrobianos de última geração, não induzíveis, inibidas por ácido clavulânico e sensíveis a carbapenens. As enzimas KPC estão agrupadas na classe A de Ambler e grupo 2f segundo a classificação funcional. Recentemente, Bush & Jacoby (2010) atualizaram o esquema de classificação das β -lactamases (Quadro 2).

Quadro 2 - Classificação das principais β -lactamases produzidas por enterobactérias.

B & J	A	Características	Enzimas (exemplos)	Substrato	Inibição AC
1	C	Maior hidrólise de cefalosporinas do que benzilpenicilina; hidrólise de cefamicinas	Amp C, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1	Cefalosporinas	Não
1e	C	Hidrólise aumentada de ceftazidima e outras cefalosporinas de amplo espectro	GC1, CMY-37	Cefalosporinas	Não
2a	A	Maior hidrólise de penicilinas do que cefalosporinas	PC1	Penicilina	Sim
2b	A	Hidrólise semelhante de penicilinas e cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Penicilina, Cefalosporina	Sim
2be	A	Maior hidrólise de cefalosporinas de espectro ampliado e monobactâmicos	TEM-3, SHV-2, CTXM-, 15, PER-1, VEB-1	Cefalosporina AP, monobactam	Sim
2br	A	Resistência ao ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-30, SHV-10	Penicilina	Não
2ber	A	Hidrólise aumentada de cefalosporinas AP, monobactam, resistência ao ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-50	Cefalosporina AP, monobactam	Não
2c	A	Maior hidrólise de carbenicilina	PSE-1, CARB-3	Carbenicilina	Sim
2ce	A	Maior hidrólise de carbenicilina, cefepime e cefpiroma	RTG-4	Carbenicilina	Sim
2d	D	Hidrólise aumentada de cloxacilina	OXA-1, OXA-10	Cloxacilina	Variável
2de	D	Hidrólise de cloxacilina, oxacilina e cefalosporina AP	OXA-11 OXA- 15; OXA-23, OXA-48	Cefalosporina AP	Variável
2df	A	Hidrólise de cloxacilina, oxacilina e carbapenem	OXA-23, OXA-48	Cefalosporina AP, cefaminas, monobactam, carbapenem	Variável
2e	A	Hidrólise de cefalosporina AP, porém não de monobactam	CepA	Cefalosporina AP	Sim
2f	A	Maior hidrólise de cefalosporina AP, carbapenem e cefamicina	KPC-2, IMI-1, SME-1	Carbapenem	Variável
3 ^a	B (B1) (B3)	Hidrólise de betalactâmicos de espectro ampliado, carbapenem, porém não de monobactam	IMP-1, VIM-1, IND-1, CcrA L1, CAU-1, GOB1, FEZ-1	Carbapenem	Não
3b	B (B2)	Hidrólise de carbapenem	CphA, Sfh-1	Carbapenem	Não

* BJ= Bush & Jacob, A= Ambler, **AC= ácido clavulânico, AP=amplo espectro

Fonte: Adaptado de Bush & Jacoby, 2010.

Para simplificar a categorização das diversas β -lactamases foi sugerida uma classificação que propõe a expansão da definição de ESBL para outras β -lactamases adquiridas com importância clínica e com atividade contra cefalosporinas de amplo espectro e/ou carbapenens. As ESBL do grupo A de Ambler passariam a ser conhecidas como ESBL_A, as β -lactamases tipo AmpC e OXA seriam categorizadas como ESBL_M (o M refere-se à miscelânea). Já as β -lactamases capazes de inibir carbapenens, conhecidas como carbapenemases, seriam classificadas como ESBL_{CARBA} (Giske *et al.*, 2009).

1.3.4. Infecção hospitalares e comunitárias associadas à *K. pneumoniae* produtora de ESBL e KPC

Os isolados de *K. pneumoniae* são agentes de infecções comunitárias e nosocomiais. Porém, a grande maioria das infecções tem relação com a hospitalização, onde são agentes de infecções do trato urinário, pneumonia, infecções nos tecidos moles e sepse (Grupta *et al.*, 2004, Minarini *et al.*, 2008, Abreu *et al.*, 2011).

As amostras produtoras de ESBL são freqüentemente encontradas em ambiente hospitalar, principalmente onde há uso constante de antibióticos e também onde há pacientes críticos internados (Thompson *et al.*, 1996, Cerqueira *et al.*, 2011). Vários fatores de risco estão envolvidos na propagação dos isolados que produzem ESBL, como: cateter venoso, cateter urinário, colonização intestinal, internação prolongada em unidade de terapia intensiva, tempo de permanência em ambiente hospitalar, cirurgia intra-abdominal, antibioticoterapia prolongada e principalmente uso abusivo de cefalosporinas de terceira geração (Paterson & Bonomo, 2005, Dhillon & Clark, 2012, Tuon *et al.*, 2012).

As infecções comunitárias causadas por isolados produtores de ESBL constituem um problema emergente em vários países do mundo (Yang *et al.*, 2010, Lin *et al.*, 2013).

Os espécimes de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL têm sido isolados a partir da cultura de urina de pacientes com infecções do trato urinário (ITU) comunitárias. Observou-se que os fatores de risco associados à ITU comunitária causada por Gram negativos ESBL foram: infecções por *Klebsiella* spp., internação prévia, tratamento prévio com antimicrobiano, diabetes Mellitus,

indivíduos do sexo masculino com idade acima de 60 anos (Colodner *et al.*, 2004). Dentre os fatores de risco, a hospitalização prévia foi a mais significativa, indicando que a ITU comunitária causada por isolado ESBL tem uma tendência de ser mais uma infecção de alta hospitalar do que propriamente adquirida na comunidade.

Nos estudos de Minarini *et al.* (2007) foram isolados no Brasil diferentes tipos de bactérias produtoras de ESBL em urina de pacientes que da comunidade que apresentaram ITU após alta hospitalar. Tais isolados apresentaram perfis de eletroforese em campo pulsante (PFGE) distintos e também diferentes tipos de enzimas ESBL em cada isolado. Os achados de Minarini *et al.* (2007) estão de acordo com os encontrados nos estudos de Colodner *et al.* (2004), sugerindo que a disseminação de micro-organismos produtores de ESBL na comunidade parece estar relacionada com a aquisição nosocomial prévia. O plasmídeo que codifica ESBL pode se disseminar entre as enterobactérias colonizando o trato intestinal e o trato urinário dos pacientes internados, que após a alta hospitalar passa a ser um reservatório na comunidade, com real possibilidade de disseminar as bactérias resistentes aos antimicrobianos, reintroduzindo esses isolados posteriormente no ambiente hospitalar.

No Brasil a ocorrência de bactérias produtoras de ESBL tem sido maior em pacientes internados. Quanto às infecções comunitárias há poucos relatos, principalmente associados a uropatógenos (Minarini *et al.*, 2008).

As bactérias produtoras de KPC têm sido frequentemente identificadas em surtos hospitalares, sendo demonstrado seu isolamento intra e inter-hospitalar (Bratu, 2005, Gupta *et al.*, 2011).

1.3.5. Distribuição geográfica de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL e KPC

Após os primeiros relatos de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL na Alemanha e na França, no início da década de 80, os isolamentos desses microorganismos aumentaram por toda a Europa (Knothe *et al.*, 1983, Brun-Buisson *et al.*, 1987). No final da década de 80 foram detectados os primeiros isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL nos Estados Unidos (Quinn *et al.*, 1989). Posteriormente, esses isolados foram relatados em todos os continentes (Coque *et al.*, 2008, Dahmen *et al.*, 2010).

Durante as décadas de 80 e 90 do século XX as ESBL do tipo TEM e SHV foram predominantes na Europa, sendo quase exclusivamente adquiridas em

infecções nosocomiais em unidades de terapia intensiva (Livermore, 2012). Atualmente, tem-se observado uma mudança nesse perfil, os tipos CTX-M tornaram-se mais frequentes, isolados de *E. coli* associados a infecções do trato urinário comunitárias.

Na América do Norte e do América do Sul e na Ásia têm sido detectadas taxas elevadas de ESBL tipo CTX-M (Coque *et al.*, 2008). No Brasil, a ESBL tipo CTX-M também se destaca dentre as ESBL relatadas (Silva & Lincopan, 2012.)

De acordo com os estudos de Elhani *et al.* (2011), a prevalência da distribuição dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL varia bastante no mundo, tendo destaque especial para elevadas prevalências nas regiões da América Latina, África e Regiões da Ásia e Pacífico. As menores foram observadas nos Estados Unidos e Europa (Figura 8).



Figura 8 - Prevalência mundial de *K. pneumoniae* produtora de ESBL.

Fonte: Adaptado de Elhani *et al.*, 2011.

A ocorrência de bactérias produtoras de ESBL no Brasil tem sido relatada nas regiões Nordeste, Sul, Sudeste e Centro-oeste (Freitas *et al.*, 2003, Minarini *et al.*, 2008, Silva & Lincopan, 2012).

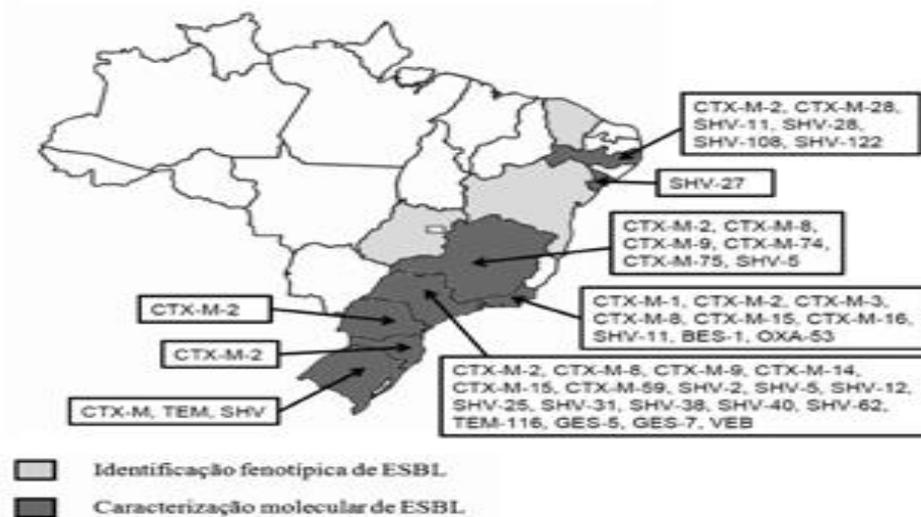


Figura 9 - Ocorrência de ESBL em *Enterobacteriaceae* no Brasil.

Fonte: Silva & Lincopan (2012).

Os espécimes *K. pneumoniae* produtores de KPC têm sido relatados em vários países, como exemplo Estados Unidos, Argentina, China e Israel (Figura10) (Le *et al.*, 2010, Lee *et al.*, 2016). No Brasil o primeiro registro de caso de infecção causada por isolados de *K. pneumoniae* produtora de KPC foi em Recife. Essa amostra foi categorizada como KPC-2 e também apresentava genes que codificavam β -lactamases do tipo TEM-1, CTX-2 e SHV-1 (Monteiro, 2009). Após o primeiro relato foram registrados casos de isolamento de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC nas regiões Centro- oeste, Sul e Sudeste (Andrade *et al.*, 2011, Dienstmann *et al.*, 2010, Meyer & Picoli, 2011).

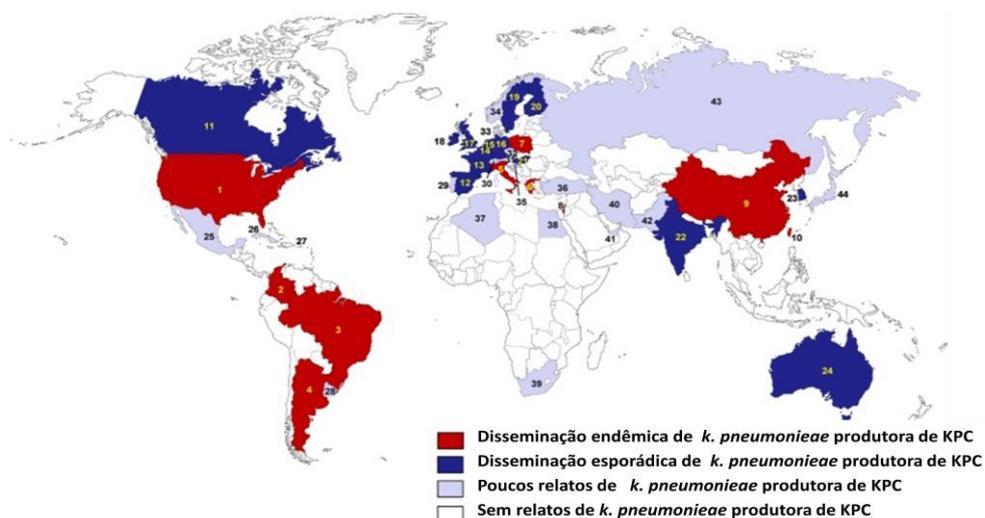


Figura 10 - Distribuição de *K. pneumoniae* produtoras de KPC.

Fonte: Adaptado de Lee *et al.*, 2016.

1.4. TESTE DE TRIAGEM PARA ESBL e KPC

A realização de testes para a detecção de ESBL em isolados de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* e *Potenus* sp. na rotina laboratorial em microbiologia foi uma orientação de comitês internacionais, como exemplo do *Comitê Laboratory Standards Institute* (CLSI), devido a falhas na identificação dessas enzimas com o uso dos critérios interpretativos preconizados. Assim, independentemente do resultado obtido nos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, todos os isolados de enterobactérias produtores de ESBL deveriam ser relatados como resistentes a todas as cefalosporinas, penicilinas e monobactam (CLSI, 2009).

Com base em parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos, o CLSI passou a adotar, a partir de 2010, novos critérios interpretativos para avaliar a suscetibilidade de isolados de enterobactérias para algumas cefalosporinas e para o monobactam (CLSI 2009, CLSI 2010). Essa conduta visou melhorar a correlação dos resultados dos testes *in vitro* com a eficiência dos antimicrobianos *in vivo*. Com os novos pontos de corte, a detecção de ESBL passou a ser realizada a critério das instituições para fins de controle de infecção e epidemiológicos, porém é desnecessária para a rotina laboratorial (CLSI 2010) (Quadro 3).

Quadro 3 - Critérios interpretativos do CLSI.

Antimicrobiano	CLSI M100-S19-2009			CLSI M100-S20-2010		
	S	I	R	S	I	R
Cefotaxima	≤ 8	16-36	≥64	≤ 1	2	≥4
Ceftriaxona	≤ 8	16-32	≥64	≤ 1	2	≥4
Ceftazidima	≤ 8	16	≥32	≤ 4	8	≥16
Cefepime	≤ 8	16	≥32	≤ 8	16	≥32
Aztreonam	≤ 8	16	≥32	≤ 4	8	≥16

S : sensível, I: intermediário e R: resistentes

Fonte: CLSI (2009, 2010)

Para alguns autores há questionamentos quanto à liberação da triagem de detecção para ESBL, bem como, discordâncias quanto à aplicabilidade dos novos pontos de corte sugeridos pelo CLSI em 2010, cuja adoção tem sido associada à

falha terapêutica (Chande *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2011, Thomson, 2013, Morrissey *et al.*, 2014).

Em relação às carbapenemases, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, Ministério da saúde/Brasil) publicou na nota técnica de número 01/2013 orientações para a triagem de enterobactérias produtoras de carbapenemases.

De acordo com a nota técnica supracitada, ao isolar enterobactérias de pacientes hospitalizados o laboratório deve testar simultaneamente ertapenem, imipenem e meropenem. Caso o isolado seja sensível ao três carbapenêmicos, o resultado deverá ser liberado como tal, não havendo necessidade de pesquisar as carbapenemases. Por outro lado, isolados com diâmetro de halo de inibição ≤ 22 mm ou com Concentração Mínima Inibitória (MIC) ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ para imipenem e/ou meropenem, e isolados com diâmetro do halo de inibição ≤ 24 mm, ou MIC ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ para ertapenem deverão ser testados, de modo suplementar, com discos de meropenem e imipenem com e sem adição de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), cloxacilina (CLOXA) e ácido fenilborônico (AFB).

Para a avaliação de produção de KPC deverão ser observados os discos de imipenem e meropenem com e sem a adição de AFB. Serão considerados produtores de KPC os isolados de *K. pneumoniae* com diferença de diâmetro de halo de inibição ≥ 5 mm apenas com AFB, para qualquer um dos substratos de imipenem ou meropenem.

Para detecção de metalo-betalactamases (IMP, VIM, NDM) em isolados de *K. pneumoniae* deverão ser observados os discos de imipenem e meropenem com e sem a adição de EDTA. Serão considerados produtores de metalo-betalactamase isolados com diferença de diâmetro ≥ 5 mm para o carbapenêmico (imipenem ou meropenem) com EDTA em relação ao carbapenêmico sem EDTA.

Para estabelecer diferenças entre os isolados produtores de KPC e os produtores de AmpC plasmidial e deficientes em porinas, deverão ser observados os resultados dos testes com AFB e CLOXA. Deverão ser considerados isolados de *K. pneumoniae* produtores de AmpC plasmidial e deficientes em porinas aqueles com diferença de diâmetro de halo de inibição ≥ 5 mm com AFB e CLOXA, para qualquer um dos substratos. As KPCs são inibidas pelo ácido AFB, mas não ocorre potenciação quando é adicionada a CLOXA. As AmpCs plasmidiais são inibidas pelo AFB, mas ocorre potenciação quando é usado a CLOXA.

1.5. ABORDAGENS DE BIOLOGIA MOLECULAR EMPREGADAS NO ESTUDO DE ESBL E KPC

Muitos trabalhos têm empregado a biologia molecular para estudos de cepas produtoras de ESBL e KPC envolvidas em infecções (Chanawong *et al.*, 2001, Fluit *et al.* 2001, Lavigne *et al.*, 2005, Willemsen *et al.*, 2011).

As metodologias de biologia molecular auxiliam tanto na tipificação e caracterização de isolados bacterianos envolvidos em infecções hospitalares ou em surtos epidêmicos, como na detecção de genes que codificam resistência aos antimicrobianos e determinação de genes relacionados a fatores de virulência. A tipificação de isolados bacterianos baseada em análise de ácidos nucléicos pode ser feita através de muitas abordagens, como exemplo a análise de plasmídeos, o uso de sondas de ácidos nucléicos e reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) (Paterson & Bonomo, 2001, Qi *et al.*, 2010, Naas *et al.*, 2011).

A utilização da PCR associada à análise de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCP) tem sido considerada uma ferramenta importante na análise da caracterização molecular das bactérias que produzem ESBL, principalmente do tipo SHV, capaz de detectar mutações em regiões específicas no gene *bla* SHV, sendo considerada uma metodologia simples e muito útil para sugerir a presença de mutações responsáveis pelo referido fenótipo (Shah *et al.*, 2004).

Outras metodologias moleculares como PCR em Tempo Real, PCR-*Restriction Fragment Length Polymorphisms* (PCR-RFLP), análise do perfil do DNA genômico utilizando *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR* (ERIC-PCR) têm sido usadas em estudos de caracterização de ESBL e KPC (Bradford *et al.*, 2001, Dahmen *et al.*, 2010).

A PFGE tem sido utilizada para o estudo de surtos hospitalares na comparação de populações bacterianas, ampliando o escopo epidemiológico da metodologia (Tenover *et al.*, 1995, Magalhães *et al.*, 2005 Singh *et al.*, 2006). Estudos utilizando a PFGE têm sido útil para elucidar a transmissão de clones de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL e KPC em ambiente hospitalar em diversos países (Grupta *et al.*, 2004, Lavigne *et al.*, 2004). No Brasil foi observado através de PFGE a disseminação de dois clones de *Klebsiella* spp. produtora de ESBL em um hospital Universitário em no estado de São Paulo (Minarini *et al.*, 2008).

No Pará foi observado através de PFGE um clone endêmico de *S. marcescens* associado a um surto de infecção neonatal em um hospital de alta complexidade em Belém (Lima *et al.*, 2011).

Apesar dos benefícios da utilização da PFGE anteriormente mencionados, essa técnica tem como desvantagem a necessidade de um tempo de execução muito extenso, o que pode comprometer a viabilidade do DNA em estudo, além do alto custo do material empregado. O método de ERIC-PCR que consiste na análise do padrão de amplificação de elementos repetidos encontrados no genoma bacteriano (Versalovic *et al.*, 1991), tem sido utilizado em substituição ao PFGE e tem apresentado vantagens como maior simplicidade de execução, baixo custo, e principalmente, maior agilidade para obtenção dos resultados o que repercute em menor risco de degradação do DNA (Silbert *et al.*, 2003, Cabral *et al.*, 2012).

O sequenciamento de DNA tem permitido definir as variantes das enzimas mutantes de ESBL e KPC pela detecção de diferentes mutações, sendo considerado como procedimento de alta acurácia (Pitout *et al.*, 2005, Cheng *et al.*, 2016). Ainda não há relatos publicados na literatura sobre a realização desse procedimento para caracterizar as variantes enzimáticas de ESBL e KPC de *Klebsiella pneumoniae* recuperadas de isolados clínicos de pacientes do Pará.

1.6. RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *K. pneumoniae* PRODUTORES DE BETALACTAMASES ÀS QUINOLONAS

As quinolonas são uma classe de antimicrobianos sintéticos com ação bactericida e de amplo espectro sobre bactérias Gram positivas e Gram negativa (Xue *et al.*, 2016).

De acordo com a classificação de Lee & Katani (1999) e Bolon (2011) as quinolonas foram categorizadas com base em suas gerações em quatro grupos, esses podem ser observadas no quadro 4.

Quadro 4 - Exemplos de quinolonas segundo suas gerações.

Gerações das quinolonas	Exemplos de fármacos
Primeira	Ácido nalidíxico e ácido pipemídico
Segunda	Ciprofloxacina, norfloxacina e lomefloxacina
Terceira	Levofloxacina, grepafloxacina e esparfloxacina
Quarta	Gatilfloxacina, moxifloxacina, trovafloxacina, gemifloxacina

Fonte: Adaptado de Lee & Katani (1999) e Bolon (2011)

As quinolonas foram desenvolvidas a partir de modificações da estrutura 4-quinolona (Figura 11). A primeira quinolona produzida foi o ácido nalidíxico, descoberto durante o desenvolvimento de um agente antimalárico, a cloroquina (Lescher *et al.*, 1962). Na década de 80, foram realizadas inovações no núcleo básico desses fármacos, através da introdução de um composto peperazínico na posição 7 e da adição do flúor na região do carbono 6, dando origem a fluoroquinolonas, onde destacam-se a ciprofloxacina, norfloxacina, lomefloxacina. Esses fármacos têm espectro de ação ampliado contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Posteriormente, foram realizadas modificações nas estruturas básicas desses fármacos que ampliaram o espectro de ação e deram origem às quinolonas de novas gerações.

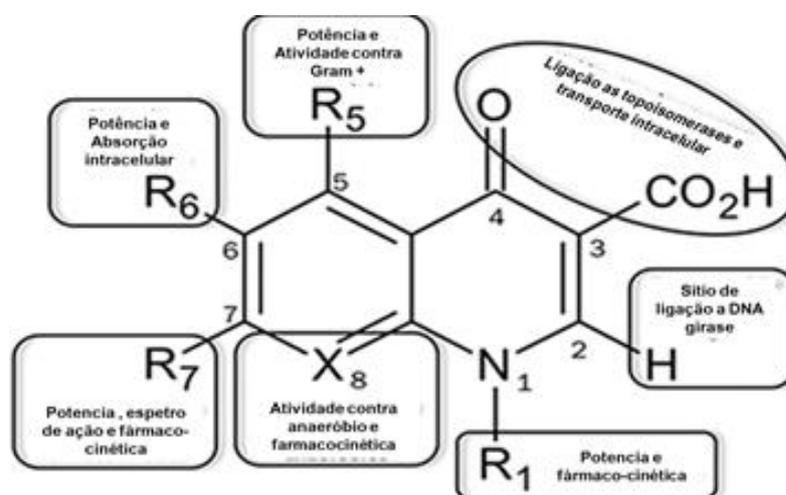


Figura 11 - Estrutura química das quinolonas.

Fonte: Adaptado de Chávez- Jacobo et al., 2015.

A ação das quinolonas consiste na inibição da DNA girase ou da topoisomerase IV, que são necessárias para replicação, recombinação e reparo do DNA bacteriano (Redgrave *et al.*, 2014).

A DNA girase é composta por duas subunidades A e duas B, denominadas GyrA e GyrB, codificadas pelos genes *GyrA* e *GyrB*. A Topoisomerase IV é composta por duas subunidades A e duas B, denominadas parC e parE, codificadas pelos genes *ParC* e *ParE*. A DNA girase é o alvo principal das quinolonas em bactérias Gram negativas, enquanto que a Topoisomerase IV é o alvo principal em bactérias Gram positivas (Lavilla *et al.*, 2008, Murray *et al.*, 2009, Aldreded *al.*, 2014). No entanto, foi observado que as quinolonas podem capturar ambas as enzimas DNA girase e topoisomerase IV, formando um complexo quinolona-proteína-DNA, provocando rupturas em uma única fita do DNA bacteriano, impedindo desta forma o mecanismo de replicação do micro-organismo (Chávez-Jacob *et al.*, 2015).

Os mecanismos de resistência às quinolonas estão associados à presença de mutações nos genes cromossômicos que codificam as enzimas DNA-girase e topoisomerase IV. Outros mecanismos de resistência codificados por genes cromossômicos são a hiperexpressão de bombas de efluxo e diminuição da permeabilidade da membrana que levam à redução da concentração do antimicrobiano no interior da célula bacteriana (Redgrave *et al.*, 2014).

As mutações nos genes que codificam a DNA girase e a topoisomerase IV são apontadas como as principais formas de resistência às quinolonas. Tais mutações têm a tendência de ocorrer em uma região conhecida como determinante de resistência à quinolona, *Quinolone-resistance determining region (QRDR)* e são mais freqüentes no gene *GyrA*, resultando principalmente na substituição dos resíduos de serina na posição 83 ou 87 da proteína por outros aminoácidos (Minarini & Darini, 2012).

O envolvimento de plasmídeos em mecanismos de resistência às quinolonas também foi relatado em alguns estudos (Kim *et al.*, 2011, Tripath *et al.*, 2012, Shams, *et al.*, 2015). Pode-se destacar dentre esses mecanismos a expressão dos genes *Qnr*, *AAC(6')-Ib-cr* e *QepA*, que codificam as proteínas QnR, AAC(6')-Ib-cr e QepA, respectivamente. A proteína QnR tem a função de proteger a DNA girase e a topoisomerase IV da ligação às quinolonas; a proteína AAC(6')-Ib-cr cataliza a

acetilação das quinolonas, modificando sua estrutura; a QepA ativa bombas de efluxo (Xue *et al.*, 2016).

O envolvimento das proteínas QnR na resistência às quinolonas é considerado o mecanismo de resistência codificado por plasmídeos mais relevante (Jacoby *et al.*, 2015). Já foram descritos cerca de 127 genes relacionados à codificação dessas proteínas. As proteínas Qnr formam uma família dividida em categorias de acordo com a homologia da sequência de resíduos dos aminoácidos: QnrA (QnrA1 – QnrA8); QnrB (QnrB1 – QnrB89); QnrC; QnrD (QnrD1 e QnrD2) e QnrS (QnrS1 – QnrS9) e QnrV (QnrV1 – QnrV7) (<http://www.lahey.org/qnrstudies/>, acessado em 18/05/2016).

Os genes plasmidiais associados à resistência às quinolonas têm sido detectados em muitos países (Figura 12). Os genes *Qnr*, *aac(6')-Ib-cr* e *QepA* já foram identificados na Europa, Estados Unidos, Canadá, África, Ásia e Austrália (Sousa, 2014, Redgrave *et al.*, 2014, Jacoby *et al.*, 2015)

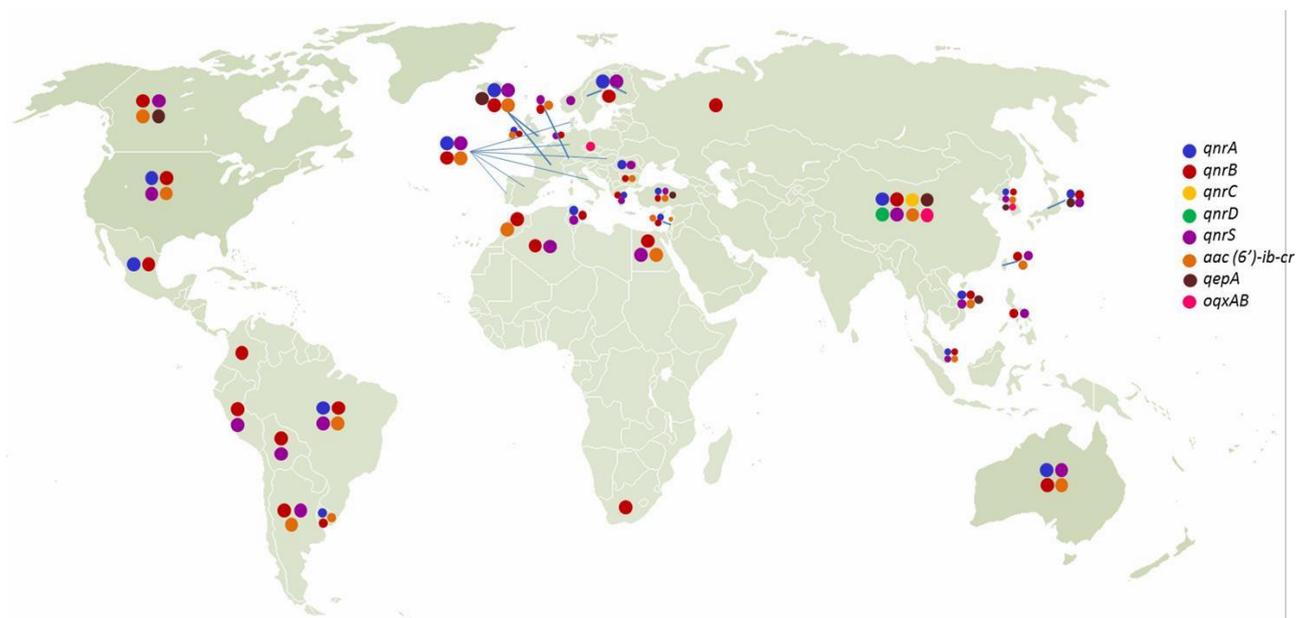


Figura 12 - Distribuição de genes plasmidiais relacionados à resistência as quinolonas.

Fonte: Adptado de Sousa, 2014; Redgrave *et al.*, 2014; Jacoby *et al.*, 2015.

1.7. RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *K.pneumoniae* PRODUTORES DE BETALACTAMASES AOS AMINOGLICOSÍDEOS

Os aminoglicosídeos são uma classe de antimicrobianos empregados no tratamento de infecção causadas por bactérias Gram negativas e Gram positivas. Sua ação consiste na inibição da síntese de proteínas por ligação irreversível às proteínas da subunidade 30S do ribossomo. Nas bactéria Gram negativas, os aminoglicosídeos após ingressarem no ambiente intracelular ligam-se ao sítio A da região decodificadora na porção 16S, no interior da subunidade 30S do ribossomo, provocando a falha no processo de tradução, com formação de proteínas alteradas, que ao serem utilizadas na constituição da membrana celular bacteriana comprometem a semipermeabilidade, o que favorece a morte das bactérias (Krahn *et al.*, 2012).

A estreptomicina, gentamicina, tobromicina, amicacina, netilmicina e neomicina são representantes da classe dos aminoglicosídeos (CLSI, 2012).

A resistência bacteriana aos aminoglicosídeos pode ocorrer devido a mutações no sítio de ligação do ribossomo, efluxo dos fármacos, diminuição da entrada dos antimicrobianos na bactéria e alterações enzimáticas do antimicrobiano. Essas alterações enzimáticas são causadas pela ação de aciltransferases, fosfotransferases e adeniltransferases das bactérias nos grupos amino e hidroxila dos aminoglicosídeos. Foi identificado um outro grupo de enzimas que confere resistência pela metilação sítio específica do RNA ribossômico 16S, denominadas de metilases 16S rRNA, capazes de conferir um alto nível de resistência aos aminoglicosídeos usados clinicamente como amicacina, gentamicina e tobramicina (Murray *et al.*, 2009, Wachino & Arakawa, 2012).

A ação das metilases 16S rRNA tem sido considerado um novo mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos, amplamente distribuído em isolados da família *Enterobacteriaceae*. Há relatos de sete tipos de metilases 16S rRNA, a *aminoglycoside resistance methyltransferase* (ArmA), *ribosomal methyltransferases* A, B, C e D, E e *N1-A1408 16S-RMTases* (NpmA) (Neves *et al.*, 2011, Doi *et al.*, 2016.)

De acordo com Wachino & Arakawa (2012), a disseminação de metilases 16S rRNA está se tornando um sério problema global, o que remete a necessidade de investigação e monitoramento desse tipo de mecanismo de resistência a fim de restringir a sua disseminação. É importante ressaltar que os genes que codificam

essas enzimas estão frequentemente associados a outros mecanismos de resistência aos antimicrobianos, e como exemplo pode-se referir a produção de ESBL. Há relatos de isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL que também apresentam genes que codificam metilases 16S rRNA, bem como resistência às quinolonas, o que contribui para a diminuição das opções terapêuticas (Ma *et al.*, 2009, Bueno *et al.*, 2013).

O estudo da suscetibilidade aos aminoglicosídeos e às quinolonas, bem como, o de determinantes genéticos de resistência desses antimicrobianos em isolados de *K. pneumoniae* produtores de betalactamases pode colaborar com o conhecimento de um perfil fenotípico e genotípico da amostra estudada. É importante ressaltar que não há nenhum relato de ocorrência no Pará, sobre o perfil genotípico referente aos isolados de *K. pneumoniae* produtores de betalactamases que também apresentam resistência às quinolonas e aminoglicosídeos.

1.8. MECANISMOS DE TRANSFERÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA

A resistência das bactérias Gram negativas aos antimicrobianos é resultado da expressão de mecanismos enzimáticos de inativação desses fármacos e/ou mecanismos não enzimáticos. Tais mecanismos podem ser expressos intrinsecamente por uma espécie ou podem ser adquiridos (Ruppé *et al.*, 2015).

As bactérias podem transferir seu material genético de forma vertical ou horizontal. Na transferência vertical, os genes são passados de um micro-organismo para seus descendentes. Na transferência horizontal, os genes podem ser adquiridos de outros micro-organismos e parte do DNA da bactéria doadora é incorporado ao da receptora, que passa a ser denominada recombinante. A transferência horizontal pode ser realizada pelos processos de transformação, transdução e conjugação (Deng *et al.*, 2015).

As bactérias podem se tornar resistentes através dos seguintes processos: por mutações nos genes cromossômicos, por aquisição de segmentos de DNA exógeno ao cromossomo (transformação), por transferência seguida de infecção por bacteriófago (transdução) e através de plasmídeos pelo processo de conjugação (Figura 13) (Alekhshun & Levy, 2007).

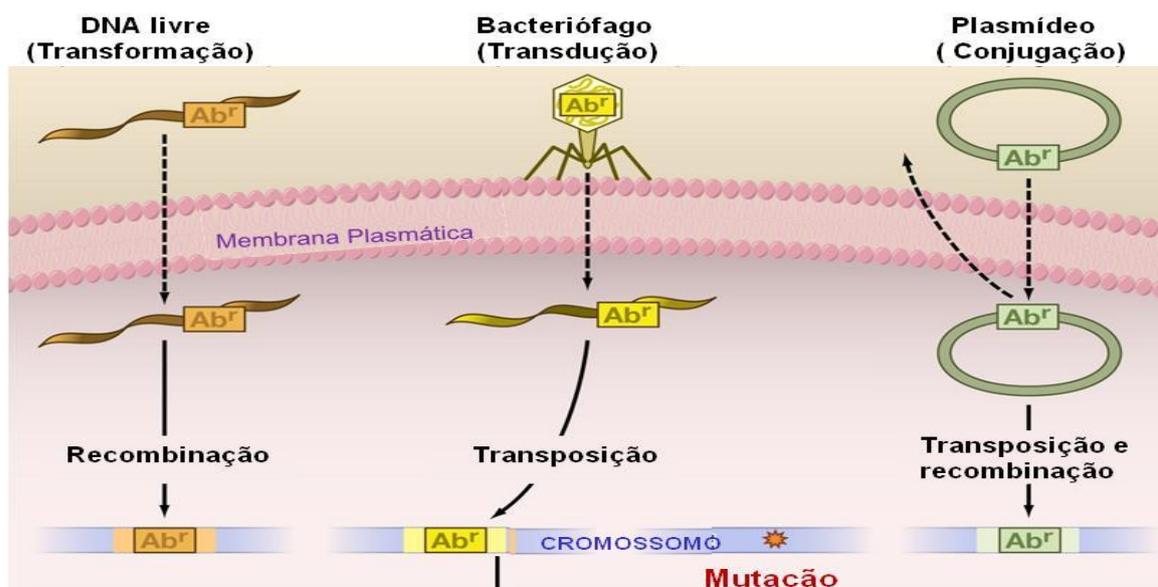


Figura 13 - Aquisição de resistência à antibiótico (ab^r) por incorporação de DNA exógeno e mutação no cromossomo bacteriano.

Fonte: Adaptado de Alekshun & Levy (2007).

A disseminação de betalactamases é realizada por clones específicos ou elementos genéticos móveis contendo os genes de resistência. Como exemplo de disseminações clonais pode-se citar os isolados de *K. pneumoniae* associados aos clones ST11 e ST15 que têm sido apontados como agentes de disseminação das enzimas CTX-M e dos genes *bla* KPC (Melegh *et al.*, 2015, Cheng *et al.*, 2016)

Os elementos genéticos mais associados à mobilização dos genes de resistência aos antimicrobianos são: plasmídeos, transposon, integron e sequências de inserção (Gyles & Boerlin, 2014).

Os transposons são elementos genéticos com habilidade de se movimentar no genoma bacteriano através de um mecanismo denominado de transposição (Muñoz-López & García-Pérez, 2010).

Todos os transposons contêm genes codificadores das transposases (*tnpA*) e repetições invertidas (IRs) em suas extremidades, e podem ser categorizados em sequência de inserção (IS), transposons compostos e transposons não compostos (Gyles & Boerlin, 2014).

As ISs são os menores transposons existentes e frequentemente codificam apenas as transposases que viabilizam a sua mobilidade. Quando duas ISs do mesmo tipo se movem e ficam próximas uma da outra formam um transposon maior,

denominado transposon composto, o qual pode conter um cassete de genes entre suas ISs, podendo transpor todo seu conteúdo de um DNA para outro, inclusive do DNA cromossômico para o plasmidial (Dropa, 2012).

Como exemplos de transposons compostos tem-se as famílias Tn5 (IS50), Tn9 (IS1) e Tn10 (IS10), que codificam genes de resistência entre as suas ISs. Transposons não compostos possuem IRs nas extremidades e genes de resistência a antimicrobianos como parte da unidade mínima de transposição. São exemplos as desses transposons não compostos as famílias Tn3 e Tn21. A Figura 14 ilustra uma representação das estruturas das ISs e transposons (Dropa, 2012).

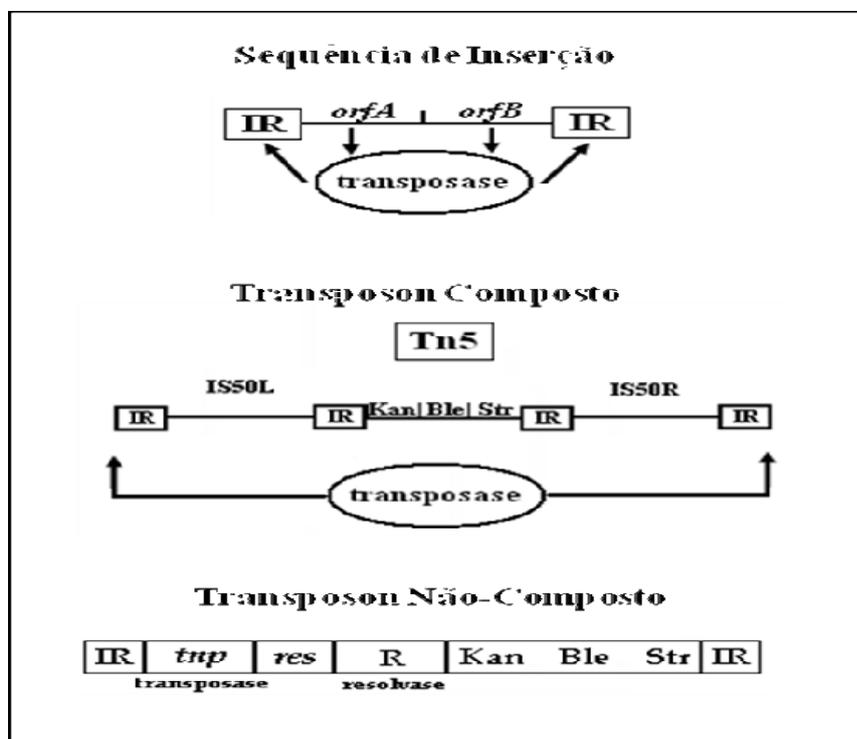


Figura 14 - Sequência de Inserção e Transposon.

Fonte: Dropa (2012).

Os Integrons são elementos gênicos que permitem a captura eficiente e a expressão de genes exógenos. São conhecidos por seu papel na disseminação de resistência aos antimicrobianos, principalmente nas bactérias Gram negativas. Produzem integrase, enzimas que catalisam a recombinação do DNA em sítios específicos. Podem incorporar cassetes gênicos, que são estruturas constituídas por genes e regiões para recombinação. Um integron pode ter uma associação diferente

de um ou mais genes de resistência aos antimicrobianos, com expressão através de um promotor (Figura 15) (Davies & Davies, 2010, Gillings, 2014).

Os integrons podem ser classificados em móveis e imóveis. Os integrons móveis pertencem às classes 1 a 5, e os imóveis são os denominados super-integrons. No entanto, embora sendo categorizados como integrons móveis, precisam estar ligados a outros elementos móveis para que ocorra a veiculação de material genético (Gillings, 2014).

Os integrons da classe 1 são os mais frequentemente encontrados. São formados por dois segmentos terminais conservados 5'CS e 3'CS separados por uma região variável. É na região variável que ocorre a inserção dos cassetes gênicos com genes de resistência aos antimicrobianos através da região *attI*, sítio de ocorrência dos processos de recombinação gênica. A região conservada 5'CS contém o gene *intI* que codifica a enzima integrase, o local de inserção das cassetes gênicos *attI* e um promotor que permite sua expressão. A região conservada 3'CS contém os genes *qacEΔ1*, que confere resistência aos compostos quaternários de amônio, o gene *sul1*, que confere resistência a sulfonamidas e dois outros genes designados *orf5* e *orf6*, com função desconhecida (Figura 15) (Deng, *et al.*, 2015).

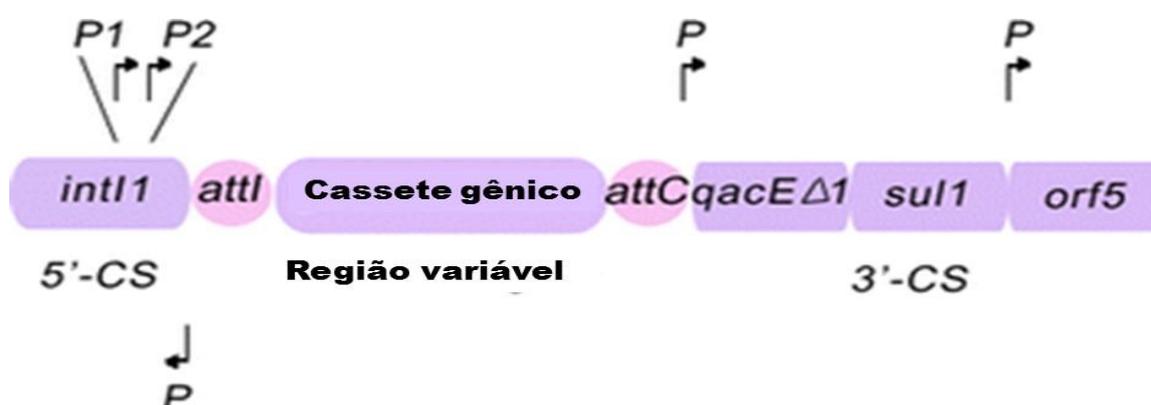


Figura 15 - Integron de classe I: segmentos terminais conservados 5'CS e 3'CS; promotor para transcrição dos cassetes gênicos P1, segundo promotor que é frequentemente inativo; gene da integrase *intI*; local de inserção da cassete genética *attI*; sequência do cassete gênico *attC*; gene responsável pela resistência a compostos quaternários de amônio *qacEΔ1*; gene *sul1*, que confere resistência a sulfonamidas; genes *orf5*, com função desconhecida.

Fonte: Adaptado de Deng *et al.*, 2015.

Os plasmídeos são fragmentos de DNA extra cromossômicos, com capacidade de replicação autônoma. Têm também habilidade autônoma de se transferir de uma bactéria para outra. Os plasmídeos denominados conjugativos contêm genes que codificam proteínas capazes de favorecer a sua transferência para outras bactérias através da formação de um *pili* (Grohmann *et al.*, 2003, Gyles & Boerlin, 2014).

Os genes *bla* CTX-M, TEM, SHV e KPC têm sido identificados em plasmídeos conjugativos. Frequentemente, tem sido detectado a associação de mais de um gene de resistência em um mesmo plasmídeo, o que colabora para a disseminação de micro-organismos multirresistentes (Cabral *et al.*, 2012, Cheng *et al.*, 2016).

1.9. PREVENÇÃO E CONTROLE

A situação de resistência bacteriana aos antimicrobianos no ambiente hospitalar se agrava progressivamente. A contínua evolução dos genes que codificam ESBL e KPC pode refletir em um aumento dos tipos enzimáticos e na disseminação de plasmídeos multiresistentes em diversas partes do mundo, o que pode representar um impacto importante nas opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras desses perfis enzimáticos. A detecção de ESBL e KPC, bem como sua análise através da biologia molecular, pode auxiliar fornecendo informações que favoreçam o controle da disseminação desse tipo de resistência bacteriana (Jemima & Verghese, 2008, Lopes *et al.*, 2010).

Nessa perspectiva, as culturas de bactérias que podem produzir essas enzimas são consideradas “culturas de vigilância epidemiológica”. Os isolados de origem hospitalar devem ser relatados ao Centro de Controle de Infecções Hospitalar (CCIH), para monitoramento e prevenção de surtos infecciosos (Oplustil *et al.*, 2010).

O papel do laboratório de microbiologia no contexto da resistência bacteriana aos antimicrobianos é de grande importância, por contribuir de forma significativa para o apoio ao diagnóstico dessas bactérias, bem como, para a orientação do tratamento, para alertar sobre possíveis surtos e favorecer a implementação de estratégias de controle que impeçam a disseminação de espécimes resistentes aos antimicrobianos nos hospitais e na comunidade (Singh *et al.*, 2006).

10. OBJETIVOS

10.1. **Objetivo Geral:**

Realizar a caracterização molecular de isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL e KPC quanto à resistência aos antimicrobianos em pacientes hospitalizados em Belém, Estado do Pará.

10.2. **Objetivos Específicos:**

Determinar a frequência dos isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL e KPC identificados através de métodos fenotípicos.

Determinar a frequência e descrever o perfil genotípico dos genes: *bla* SHV, *bla* TEM *bla* CTX- M e *bla* KPC.

Determinar a frequência e descrever o perfil genotípico dos genes *Gyra*, *ParC*, *QnrA*, *QnrB*, *QnrS*, *AA(6')-Ib* e *QepA*.

Determinar a frequência dos genes e descrever o perfil genotípico *armA* e *rmtB*.

Determinar nos isolados *K. pneumoniae* produtoras de ESBL o perfil de resistência dos seguintes antimicrobianos: amoxicilina/ácido clavulânico, cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e cefepima, ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina e ácido nalidíxico, amicacina, gentamicina, trobamicina, imipenem, meropenem e ertapenem.

Determinar nos isolados *K. pneumoniae* produtoras de KPC perfil de resistência dos seguintes antimicrobianos amoxicilina/ácido clavulânico, cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e cefepima, ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina e ácido nalidíxico, amicacina, gentamicina, imipenem, meropenem e ertapenem.

Correlacionar a presença dos genes *bla* SHV, *bla* TEM e *bla* CTX- M, dos isolados de *K. pneumoniae* produtores betalactamases com o perfil de resistência à amoxicilina/clavulonato, cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e cefepima.

Correlacionar a presença dos genes *bla* KPC dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC com o perfil de resistência ao imipenem, meropenem e ertapenem.

Correlacionar a presença dos genes *Gyra*, *ParC*, *QnrA*, *QnrB*, *QnrS*, *AAC(6)-Ib* e *QepA* com o perfil de resistência aos antimicrobianos: ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina e ácido nalidíxico.

Descrever a frequência dos isolados dos *K. pneumoniae* produtores de ESBL e KPC nas amostras de pacientes hospitalizados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Evandro Chagas com número de registro CAAE: 32625914.3.0000.0019 e Parecer nº 708.336.

2.2. AMOSTRAGEM:

A amostragem do estudo foi constituída de 124 isolados de *K. pneumoniae* cedidos pelo Laboratório de Análises Clínicas de um Hospital Público de Belém, Pará, detectados de diferentes espécimes clínicos de pacientes hospitalizados, no período de abril 2012 a abril de 2013.

2.3. DESENHO DO ESTUDO

O presente estudo é de natureza descritiva, observacional, transversal e analítico inferencial referente à caracterização molecular de isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL e KPC.

2.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo os isolados de *K. pneumoniae* previamente identificados pelos Laboratórios de Análises Clínicas que cederam as amostras de micro-organismos para o estudo.

Foram excluídos do estudo os micro-organismos não viáveis após o reisolamento das amostras do estudo.

2.5. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DO ESTUDO

No período de abril 2012 a abril de 2013, todos os micro-organismos identificados como *K. pneumoniae* nos Laboratórios de Análises Clínicas que cederam as amostras para o estudo, foram repicados em tubos contendo em ágar estoque (Difco, U.S.A) e incubados na temperatura de 37°C durante 24 horas. Após a incubação as amostras foram enviadas ao Instituto Evandro Chagas, e acondicionadas no setor de Bacterioteca, até a realização do estudo.

2.6. REIDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de *K. pneumoniae* armazenadas em Agar estoque (Difco, U.S.A) foram repicadas para o caldo Luria Bertani (LB) (Difco, U.S.A) e incubadas em estufa na temperatura de 37°C durante 24 horas. Após a turvação do caldo uma alíquota foi semeada em placa de ágar Mac Conkey (Difco, U.S.A) e incubada a 37°C por 24 horas. Após a incubação as amostras foram submetidas à identificação realizadas por automação, no aparelho Vitek 2 da BioMerieux, através de painéis com provas de identificação para bacilo Gram negativo (Funke & Pascale, 2004, O'Hara, 2005).

As culturas puras de *K. pneumoniae* foram usadas para as análises propostas no presente estudo, além de serem armazenadas em tubos de criopreservação de 2 mL contendo caldo de Luria Bertani (LB) acrescido com glicerol a 20% e congelado em *freezer* a temperatura de – 70°C, bem como, em tubos 12 x 75 mm, e mantidos na Bacteriologia do Instituto Evandro Chagas.

2.6.1. Teste de sensibilidade antimicrobiana

As amostras de *K. pneumoniae* foram submetidas ao antibiograma manual realizada pelo Teste de disco-difusão padronizada pelo Instituto de Padronização de testes Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2012) com os seguintes antimicrobianos: ampicilina(10µg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10µg), cefalotina (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefoxitina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefepima (30 µg),cefuroxima (30 µg), gentamicina (10 µg), amicacina (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), ertapenem (10 µg) ciprofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg), levofloxacina (5 µg), ácido nalidixíco (30 µg) (Oxoid® (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra).

Para determinação da concentração mínima inibitória foram utilizadas fitas de Etest® (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) de acordo com a orientação do fabricante para os seguintes antibióticos: cefotaxima, ceftriaxona, cefepima, imipenem, meropenem, ertapenem, ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina, ácido nalidixíco.

2.6.2. Confirmação de isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL

Foram consideradas amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, os isolados positivos no Teste de adição de ácido clavulânico Oxoid® (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra)(CLSI, 2012).

2.6.3. Confirmação de isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC

Em todos os isolados de *K. pneumoniae* ESBL considerados positivos de acordo com os critérios padronizados pelo CLSI (2012), foram realizados os testes de suscetibilidade aos carbapenens (imipenem, meropenem, ertapenem) por disco-difusão, com discos Oxoid® (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). Os critérios de detecção fenotípica de KPC foram os descritos na norma técnica nº1 de 2013 da ANVISA.

2.6.4. Controle de qualidade para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

Nas análises de controle de qualidade para os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram utilizadas cepas *American Type Culture Collection* (ATCC). A *K. pneumoniae* ATCC 700603 produtora de ESBL e a *E.coli* ATCC 25922 não produtora de ESBL, foram utilizadas como controle de qualidade para todos os teste de suscetibilidade a antimicrobianos desse estudo. A interpretação dos resultados foram realizadas utilizando os limites preconizados para cada ATCC (CLSI, 2012).

2.6.5. Controle de qualidade para testes de suscetibilidade aos carbapenens

As análises de controle de qualidade para os testes de suscetibilidade aos carbapenens foram realizados com isolados de *E.coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

2.6.6. Análise Genotípica

2.6.6.1 Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de colônias de *K. pneumoniae* isolados em ágar MacConkey. As colônias bacterianas foram suspensas em 500 µL de solução tampão TE (0,01 M Tris-HCl, 0,001 M EDTA [pH 8,0]) e equiparadas a uma

turbidez nº 2 na escala de McFarland (6×10^8 UFC/mL). A suspensão foi aquecida a 100°C por 10 minutos, centrifugada por 5 minutos a 1000 RPM, e 150 µL do sobrenadante foram congelados a -20°C até o uso (Lopes *et al.*, 2010).

2.6.6.2 Reação em cadeia mediada pela polimerase para ESBL

A PCR foi realizada para identificar os genes *bla* TEM, *bla* SHV e *bla* CTX-M. Todas as reações foram realizadas com 1 µL de DNA de cada microorganismo, 1 U de Taq DNA polimerase, tampão MgCl₂, dNTP e água miliQ em um volume total de 25 µL. As sequências de oligonucleotídeos, genes alvo, condições das reações, tamanho do amplicon e referência foram descritas abaixo no Quadro 5.

O produto amplificado de cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% com Syber safe (Invitrogen) (0,5 µg/mL) durante 1 hora (6volts/cm) e visualizados em UV (312 nm).

Para a padronização das reações de PCR, foram utilizadas linhagens gentilmente cedidas pelo Dr. Afonso Barth, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Quadro 5 - Sequências iniciadoras utilizadas para os ensaios da PCR para identificação das ESBL e suas respectivas condições de reação.

Sequência de oligonucleotídeos	Gene alvo	Condições			Tamanho do Amplicom	Referência
		desnaturação	Anelamento	extensão		
5´- ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG - 3´ 5´ CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA -3´	<i>bla</i> TEM	94°C, 30s	58°C, 1 min	72 °C, 1 min	1076 pb	Rasheed <i>et al.</i> (1997)
5´- TTA GCG TTG CCA GTG CTC - 3´ 5´-GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC -3´	<i>bla</i> SHV	95°C, 45s	59o C, 45s	72 °C, 1 min	930 pb	Rasheed <i>et al.</i> (1997)
5´- ACC GCG ATA TCG TTG GT -3´ 5´- CGC TTT GCG ATG TGG AG-3´	<i>bla</i> CTX-M	94°C, 60 s	54°C, 45s	72 °C, 1 min	550 pb	Bonnet <i>et al.</i> (2000)

2.6.6.3. Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase para KPC

O gene *bla* KPC foi amplificado com os iniciadores: 5'-TGTCAGTGT ATCGCCGTC-3' e 5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3'. O procedimento para realização da PCR foi o seguinte: desnaturação 95°C por 5 min, anelamento a 58°C por 30 s, e alongamento a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, extensão final a 72°C por 10 minutos. Para realização da PCR foram utilizados um volume de 25 µL da reação com tampão MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,25mM, 1,5 U de taq DNA polimerase, 10 µL de iniciadores e 5 µL de extrato de DNA. A presença de um fragmento de 879 pares de base indicará a presença do gene *bla* KPC (Yigit *et al.*, 2001).

O produto amplificado de cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% com Syber safe (Invitrogen) (0,5 µg/mL) durante 1 hora (6 volts/cm) e visualizados em UV (312 nm).

Para a padronização das reações de PCR, foi utilizada linhagens de KPC-2 do *College of American Pathologists*.

2.6.6.4 Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase para genes de resistência à quinolonas.

Nas amostras de *K. pneumoniae* produtores de ESBL que apresentaram resistência às quinolonas testadas no antibiograma segundo CLSI (2012), foram realizadas PCR para detecção dos genes que conferem resistência cromossômica (gen *GyrA*, gen *ParC*), e plasmidial (gen *QnrA*, gen *QnrB*, gen *QnrS*) às quinolonas. Adicionalmente foram pesquisados o gen *AAC(6')-Ib* e gen *QepA*. Todas as reações foram realizadas com 2 µL de DNA de cada microorganismo, 1 U de Taq DNA polimerase, tampão MgCl₂, dNTP e água miliQ em um volume total de 25 µL. As sequências de oligonucleotídeos, genes alvo, condições das reações, tamanho do amplicon e referência foram descritas abaixo no Quadro 6.

Quadro 6 - Sequências iniciadoras utilizadas para os ensaios da PCR para identificação dos genes cromossômicos e plasmidiais que codifica resistência para quinolonas e suas respectivas condições de reação.

Sequência de oligonucleotídeos	Gene alvo	Condições			Tamanho do Amplicom	Referência
		desnaturação	anelamento	extensão		
5'-CGACCTTGCGAGAGAAAT-3' 5'-GTTCCATCAGCCCTTCAA-3'	<i>GyrA</i>	94°C, 30s	55°C, 30s	72°C, 30	625pb	Vien <i>et al.</i> (2009)
5'-CTGAATGCCAGCGCCAAATT-3' 5'-TGCGGTGGAATATCGGTCGC-3'	<i>ParC</i>	95°C, 30s	55°C, 30s	72°C, 30s	389pb	Vien <i>et al.</i> ,(2009)
5'-TCAGCAAGAGGATTTCTCA-3' 5'-GGCAGCACTATTACTCCCA-3'	<i>QnrA</i>	95°C, 30s	48°C, 1min	72°C, 30s	627pb	Vien <i>et al.</i> (2009)
5'-GGMATHGAAATTCGCCACTG-3' 5'-TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA-3'	<i>QnrB</i>	94°C, 30s	55°C, 30s	72°C, 30s	264pb	Vien <i>et al.</i> (2009)
5'-ATGGAAACCTACAATCATAC-3' 5'-AAAAACACCTCGACTTAAGT-3'	<i>QnrS</i>	95°C, 30s	48°C, 30s	72°C, 30s	627pb	Vien <i>et al.</i> (2009)
5'-TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA-3' 5'-CTCGAATGCCTGGCGTGTTT-3'	<i>AAC(6')-Ib</i>	95°C, 30s	55°C, 30s	72°C, 30s	482pb	Vien <i>et al.</i> (2009)
5'-GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG-3' 5'-CTTCCTGCCCGAGTATCGTG-3'	<i>QepA</i>	95°C, 30s	55°C, 30s	72°C, 30s	199pb	Vien <i>et al.</i> (2009)

2.6.6.5. Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase para genes de resistência aos aminoglicosídeos

Nas amostras de *K. pneumoniae* produtores de ESBL que apresentaram resistência aos aminoglicosídeos testadas no antibiograma, segundo CLSI (2012) foram realizadas PCR para detecção dos genes *armA* e *rmtB*. Todas as reações foram realizadas com 2 µL de DNA de cada microorganismo, 1 U de Taq DNA polimerase, tampão MgCl₂, dNTP e água miliQ em um volume total de 25 µL. As sequências de oligonucleotídeos, genes alvo, condições das reações, tamanho do amplicon e referência foram descritas abaixo no Quadro 7.

Quadro 7 - Sequências iniciadoras utilizadas para os ensaios da PCR para identificação dos genes que codificam resistência para aminoglicosídeos e suas respectivas condições de reação.

Sequência de oligonucleotídeos	Gene alvo	Condições			Tamanho do Amplicom	Referência
		desnaturação	anelamento	Extensão		
5'-CCGAAATGACAGTTCCTATC-3' 5'-GAAAATGAGTGCCTTGGAGG-3'	<i>ArmA</i>	94°C, 1min	55°C, 1min	72°C, 2min	846 pb	Wassef <i>et al.</i> (2010)
5'-ATGAACATCAACGATGCCCT-3' 5'-CCTTCTGATTGGCTTATCCA-3'	<i>RmtB</i>	94°C, 1min	55°C, 1min	72°C, 2min	769 pb	Wassef <i>et al.</i> (2010)

2.6.6.6. Sequenciamento dos produtos da PCR

Os produtos das amostras de ESBL e KPC, foram amplificadas novamente com Taq polimerase pfu (Invitrogen, Carlsbad, USA). Os fragmentos amplificados foram seqüenciados para determinar o tipo de ESBL e KPC presentes. Os iniciadores, reativos e condições de amplificação foram os mesmos usados na reação da PCR para detecção do gene. Os produtos amplificados foram purificados com o kit GFX-TM PCR (Amershan Biosciences, Suécia) e água w-30500 (Sigma, Estados Unidos). O ciclo de amplificação foi de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 minuto e 15 segundos a 50°C, que foi repetido 30 vezes. O produto foi precipitado com acetado de amônio 30M e etanol 95% e seqüenciado no analisador genético ABI Prism-3130 (Applied Biosystems). As seqüências produzidas foram editadas no programa Sample Manager, acoplado ao ABI 3130 DNA Sequencer, e posteriormente analisadas com programa Chromas-prov versão 1.45 com a utilização do kit ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems), ClustalW (<http://www.cbi.ac.uk/clustalw>) e, em seguida comparadas às sequencias disponíveis no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>).

2.6.6.7. ANALISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram distribuídos de acordo com a frequências absolutas e relativas.

Para analisar as relações entre presença dos genes de resistência e o perfil de MIC dos antimicrobianos estudados foi usado o teste do qui- quadrado (χ^2) (Ayres *et al.*, 2007). Foram realizadas comparações de proporções, visando identificar uma possível diferença entre as categorias das variáveis avaliadas. Foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para todos os testes estatísticos.

3. RESULTADOS

Em relação aos resultados dos testes fenotípicos para detecção de ESBL pode-se observar que 60% (74/124) dos isolados de *K. pneumoniae* apresentaram produção de ESBL (Figura 16).

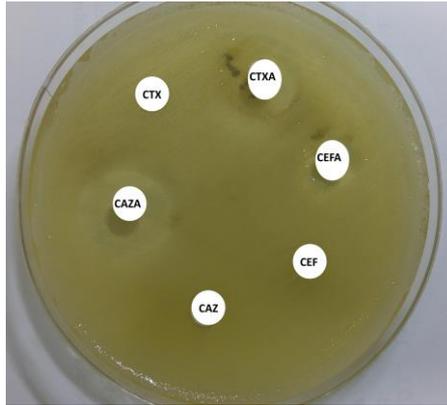


Figura 16 - Teste fenotípico de adição de ácido clavulânico para detecção de ESBL.

Fonte: O autor.

Quanto aos resultados dos testes fenotípicos para detecção de KPC observou-se que 5% (4/74) dos isolados de *K. pneumoniae* apresentaram produção de KPC (Figura 17).

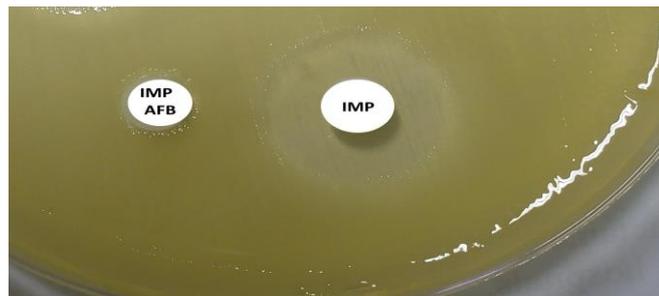


Figura 17 - Teste fenotípico de bloqueio enzimático com ácido fenil borônico para detecção de KPC.

Fonte: O autor

Em relação aos isolados de *K.pneumoniae* cujos testes fenotípicos foram positivos para ESBL, observou-se que das 74 amostras, 69 (93%) apresentaram amplificação para os genes associados às codificações de enzimas betalactamases, e em 5 isolados não houve amplificação para os genes estudados. Além disso, 4/74

(5%) isolados de *K. pneumoniae* com testes fenotípicos positivos para KPC foram amplificados pela PCR (Figura 18).

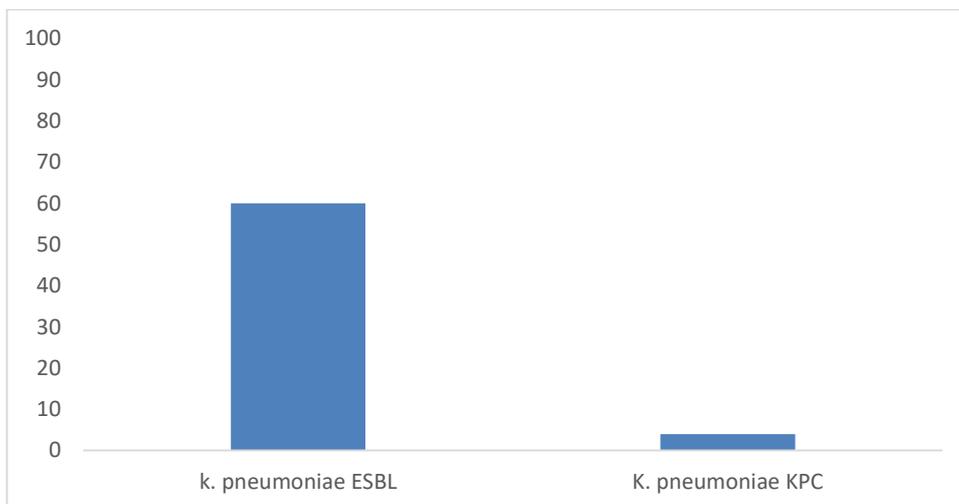


Figura 18 - Resultados dos testes de triagem fenotípicos para detecção de isolados *K. pneumoniae* produtores de ESBL e KPC.

Os resultados das amplificações dos genes que codificam betalactamases nos espécimes de *K. pneumoniae* possibilitaram detectar os seguintes percentuais: 83% para o gene *bla* CTX-M, 85,5% para o gene *bla* SHV e 83% para o gene *bla* TEM (Quadro 8, Figuras- 19, 20, 21).

As reações de PCR nas amostras cujos testes fenotípicos foram indicativos para produção de KPC detectaram amplificações de 100% do gene *bla* KPC (Quadro 8, Figura 22).

Quadro 8 - Percentual de amplificações das reações de PCR para os genes *bla* CTX-M, SHV, TEM, KPC.

RESULTADO DAS REAÇÕES DE PCR	Isolados de <i>K. pneumoniae</i>
Gene <i>bla</i> CTX-M	83%(57/69)
Gene <i>bla</i> SHV	85,5%(59/69)
Gene <i>bla</i> TEM	83%(57/69)
Gene <i>bla</i> KPC	5%(4/74)



Figura 19 - Resultados da PCR para o gene *bla* CTX-M. Amostras amplificadas: A7, A8, A9, A11, A14, A15, A19, A27, A31. Amostra não amplificada: A17. Controle positivo: CP. Ladder (L) de 100 pares de base de DNA. Os primers utilizados na PCR amplificaram um fragmento gênico de 550 pares de bases.



Figura 20 - Resultados da PCR para o gene *bla* SHV. Amostras amplificadas: A94, A95, A96, A98, A100, A101, A109. Amostra não amplificada: A102, A111. Controle positivo: CP. Ladder (L) de 100 pares de base de DNA. Os primers utilizados na PCR amplificaram um fragmento gênico de 930 pares de bases.



Figura 21 - Resultados da PCR para os gene *bla* TEM. Amostras amplificadas: A8, A9, A11, A14, A15, A17, A19, A23, A25. Amostra não amplificada: A18. Controle positivo: CP. Ladder (L) de 100 pares de base de DNA. Os primers utilizados na PCR amplificaram um fragmento gênico de 1076 pares de bases.

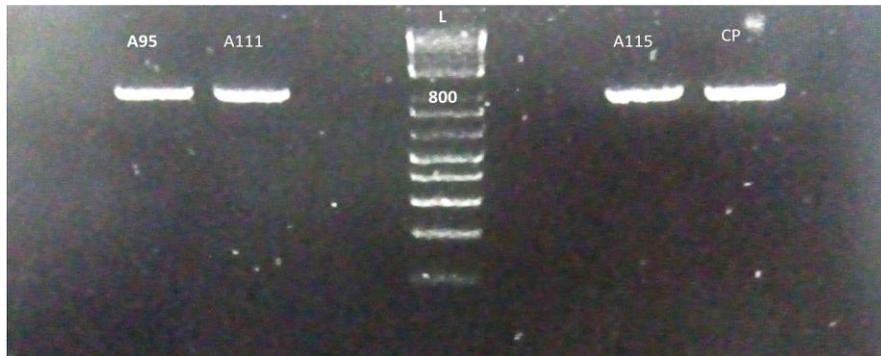


Figura 22 - Resultado da PCR para os gene *bla* KPC– Amostras amplificadas: A95, A111, A115. Controle positivo: CP. Ladder (L) de 100 pares de base de DNA. Os primers utilizados na PCR amplificaram um fragmento gênico de 879 pares de bases.

Os resultados das ampliações dos genes *bla* CTX-M, SHV e TEM nas amostras estudadas permitiram detectar mais de uma tipo de gene em um mesmo isolado com a seguinte frequência: 60% (41/69) para genes *bla* CTX-M/ SHV/ TEM , 19% (13/69) genes *bla* CTX-M/TEM, 19%(13/69) genes *bla* CTX-M/SHV, e 13% (9/69) para os genes *bla* SHV/TEM (Figura 23).

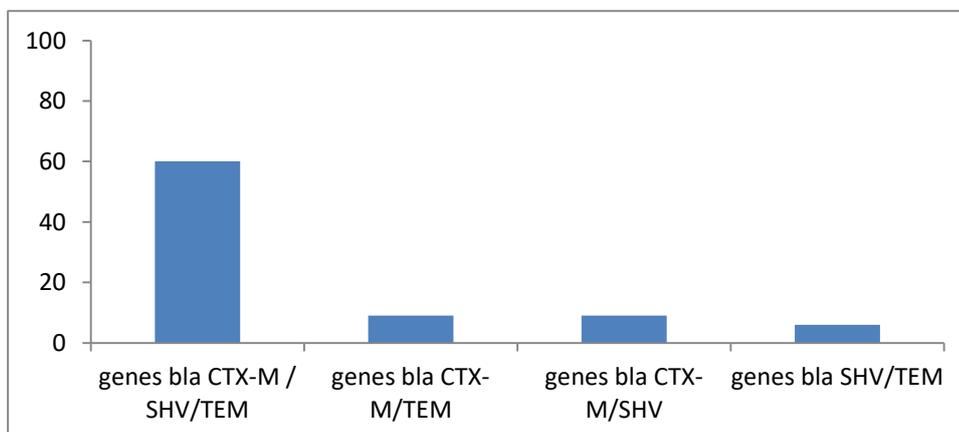


Figura 23 - Presença simultânea de genes *bla* CTX-M, SHV, TEM nas amostras estudadas.

Quanto aos isolados *K. pneumoniae* produtoras de ESBL e com ampliações para os genes que codificam betalactamases pode-se verificar que 39%(27/69) apresentaram resistência às quinolonas estudadas. Os resultados das reações de PCR dessas amostras possibilitaram as ampliações dos seguintes genes: 44%

(12/27) do gene *QnrB*, 88% (24/27) do gene *GyrA*, 93% (25/27) *ParC*, e 85% (23/27) do gene *AAC(6')-Ib*. No entanto, não houve ampliações dos genes *QnrA*, *QnrS* e *QepA* (Quadro 9, Figuras 24, 25, 26 e 27).

Quadro 9 - Percentual de ampliações das reações de PCR para os genes *QnrB*, *QnrA*, *QnrS*, *GyrA*, *ParC*, *AAC(6')-Ib* e *QepA*.

RESULTADO DAS REAÇÕES DE PCR	Isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtores de ESBL resistentes às quinolonas
Gene <i>QnrB</i>	44%(12/27)
Gene <i>QnrA</i>	0%(0/27)
Gene <i>QnrS</i>	0%(0/27)
Gene <i>GyrA</i>	88% (24/27)
Gene <i>ParC</i>	93%(25/27)
Gene <i>AAC(6')-Ib</i>	85%(23/27)
Gene <i>QepA</i>	0%(0/27)

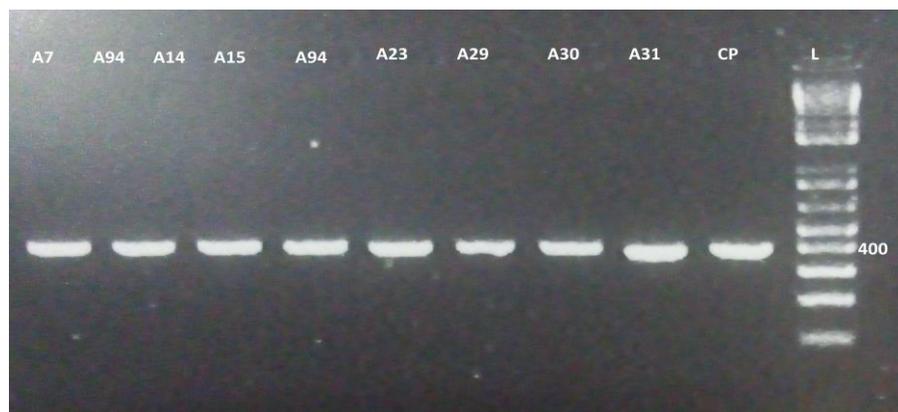


Figura 24 - Resultados da PCR para o gene *ParC*. Amostras amplificadas: A7, A94, A14, A15, A94, A23, A29, A30, A31. Controle positivo: CP. Ladder (L) de 100 pares de base de DNA. Os primers utilizados na PCR amplificaram um fragmento gênico de 389 pb.

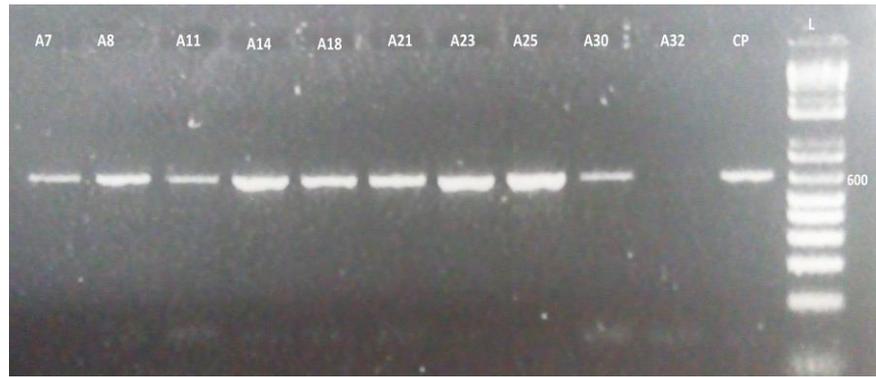


Figura 25 - Resultado da PCR para o gene *GyrA*. Amostras amplificadas: A7, A8, A11, A14, A18, A21, A23, A25, A30. Não foi amplificada a amostra A32. Controle positivo: CP. Ladder (L) de 100 pares de base de DNA. Os primers utilizados na PCR amplificaram um fragmento gênico de 625 pb.

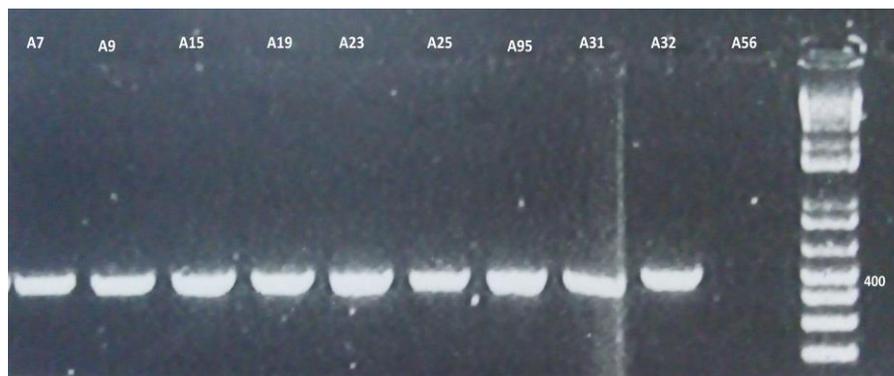


Figura 26 - Resultados da PCR para os gene *AAC(6)-Ib*. Amostras amplificadas: A7, A9, A15, A19, A23, A25, A95, A31, A32. Amostra A56 não foi amplificada. Ladder (L) de 100 pb de base de DNA. Os primers utilizados na PCR amplificaram um fragmento gênico de 482 pb.

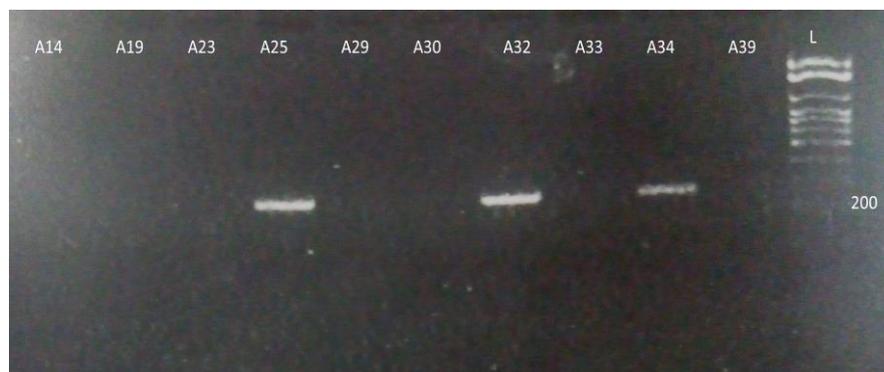


Figura 27 - Resultados da PCR para o gene *QnrB*. Amostras amplificadas: A25, A32, A34. Amostras não amplificadas: A14, A19, A23, A29, A30, A33, A39. Ladder

(L) de 100 pb de base de DNA. Os primers utilizados na PCR amplificaram um fragmento gênico de 482 pb.

Os resultados da amplificação dos genes *GyrA*, *ParC*, *QnrB* e *AAC(6')-Ib* nos espécimes estudados revelaram a presença de mais de um desses genes em um mesmo isolado. Foram detectadas as seguintes associações: 44% (12/27) para os genes *QnrB/GyrA/ParC*, 26% (7/27) para os genes *QnrB/GyrA, ParC/ AAC(6')-Ib*, 8% (2/27) para genes *GyrA/ParC*, 4% (1/27) para genes *QnrB/ParC/AAC(6')-Ib*, 4% (1/27) genes *GyrA/ AAC(6')-Ib*. Isto fez um total de 86% de associações entre esses genes (Figura 28).

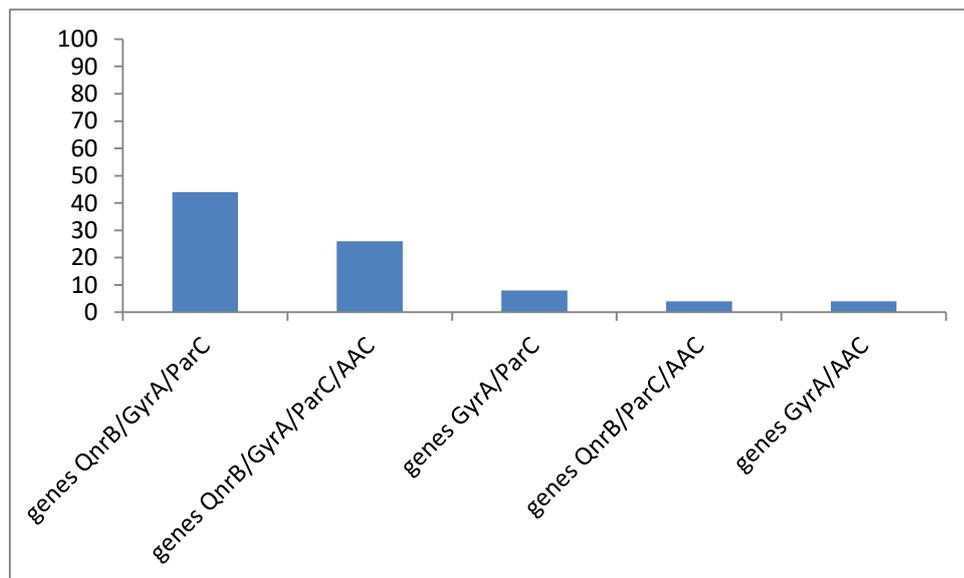


Figura 28 - Presença simultânea de genes *GyrA*, *ParC*, *QnrB*, *AAC(AAC(6')-Ib)* nas amostras estudadas.

Quanto as *K. pneumoniae* produtoras de ESBL pode-se verificar que 62%(43/69) apresentaram resistência aos aminoglicosídeos estudados, porém os genes *armA* e *rmtB* não foram amplificados nessas amostras.

As análises do sequenciamento dos produtos da PCR dos genes *bla* CTX-M, SHV, TEM em espécimes de *K. pneumoniae* produtores de ESBL permitiram observar as seguintes distribuições:

1. Para os genes *bla* CTX-M 60% (34/57) das amostras foram identificadas como *bla* CTX-M -71,32% (18/57) *bla* CTX-M -165, 5% (3/57) *bla* CTX-M-15 e 3,5% (2/57) *bla* CTX-M -176.
2. Para os genes *bla* SHV verificou-se que 41% (24/59) foram *bla* SHV-11, 12%(7/59), *bla* SHV-32, 8% (5/59) *bla* SHV-26, 8% (5/59) *bla* SHV-44, 5%(3/58) *bla* SHV-38, 5% (3/59) *bla* SHV-100, 3,5% (2/59) foram *bla* SHV-1, 3,5%(2/58) *bla* SHV-12, 3,5% (2/59) SHV-28, 3,5% (2/59) SHV-109, 3,5% (2/59) *bla* SHV-110, 3,5% (2/59) *bla* SHV- 137.
3. Para o gene *bla* TEM verificou-se que 30% (17/57) foram *bla* TEM-116, 26% (15/57) foram identificados como gene *bla* TEM-1B, 24,5% (14/57) gene *bla* TEM-1A, 9% (5/57) gene *bla* TEM-150, 3, 5% (2/57) gene *bla* TEM-183, 3,5%(2/57) gene *bla* TEM-198, 3,5% (2/57) gene *bla* TEM-209.

Em relação aos resultados da análise do sequenciamento dos produtos de PCR dos genes *GyrA* e *ParC* de *K. pneumoniae* produtores de ESBL, observou-se, através do alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos realizado pelo programa Geneious, tomando como base a *K. pneumoniae* ATCC 13883, que todos os isolados apresentaram mutações no gene *GyrA*, sendo que 100% (24/24) apresentaram substituição de adenina por guanina na posição 493, causando substituição de um resíduo de tirosina por uma alanina na posição 165 da cadeia polipeptídica (Tyr165Ala); 54% (13/24) apresentaram simultaneamente a mutação Tyr165Ala, uma alteração de timina para adenina na posição 188 e de citosina por timina na posição 189, causando a substituição de leucina para histidina na posição 63 da cadeia polipeptídica (Leu63His). Dois isolados apresentaram mais de duas mutações simultâneas, um deles apresentou além da mutação Tyr165Ala, uma alteração de guanina para adenina na posição 47, resultando na substituição do resíduo glicina por arginina na posição 16 (Gly16Arg) da proteína; uma alteração de timina por citosina na posição 104, resultando na mutação Ile35Thr; uma alteração de guanina por adenina na posição 107, resultando na mutação Gly36Arg; uma substituição de adenina por timina na posição 139, resultando na mutação Ser47Cys; uma alteração de citosina por timina na posição 175, causando a mutação Ser59Pro. Em um outro isolado foi detectado além das mutações Tyr165Ala e Leu63His, uma alteração de adenina por timina na posição 26, resultando na mutação His9Leu; alteração de guanina por timina na posição 49,

resultando na mutação Gly17Arg e uma alteração de adenina por guanina na posição 103, resultando na proteína mutante Ile35Val. Em um outro isolado foi detectado além das mutações Tyr165Ala e Leu63His, uma alteração de guanina por timina na posição 472, resultando na mutação Asp158Tyr (Figura 29).

Quanto ao gene *ParC*, detectou-se através do alinhamento das sequência de nucleotídeos e aminoácidos que 43% (9/21) dos isolados apresentaram mutações, 57% (13/21) não apresentaram mutações e não foi possível identificar quatro amostras pela metodologia do alinhamento de nucleotídeos e aminoácidos. Foram detectadas em 78% (7/9) das amostras uma alteração de adenina por timina na posição 2, resultando em uma substituição de tirosina por fenilalanina na posição 1 da cadeia polipeptídica (Tyr1Phe). Em 44% (4/9) dos isolados além da mutação Tyr1Phe foi detectada uma alteração de adenina por citosina na posição 5, causando a mutação His2Pro. Em 22% (2/9) foram observados uma alteração de citosina por guanina na posição 21, repercutindo na mutação Ile7Met. Em 22% (2/9) foi detectada uma alteração de timina por guanina na posição 20, resultando na mutação Ile7Ser. Em 11% dos isolados (1/9), além das mutações Tyr1Phe e His2Pro, foi observada uma troca de guanina por adenina na posição 16, resultando na mutação Asp6Asn. Em 11% dos espécimes (1/9), além das mutações Tyr1Phe, His2Pro e Ile7Met, foi encontrada uma troca de timina por guanina na posição 42, resultando na mutação Val14Gly (Figura 30).

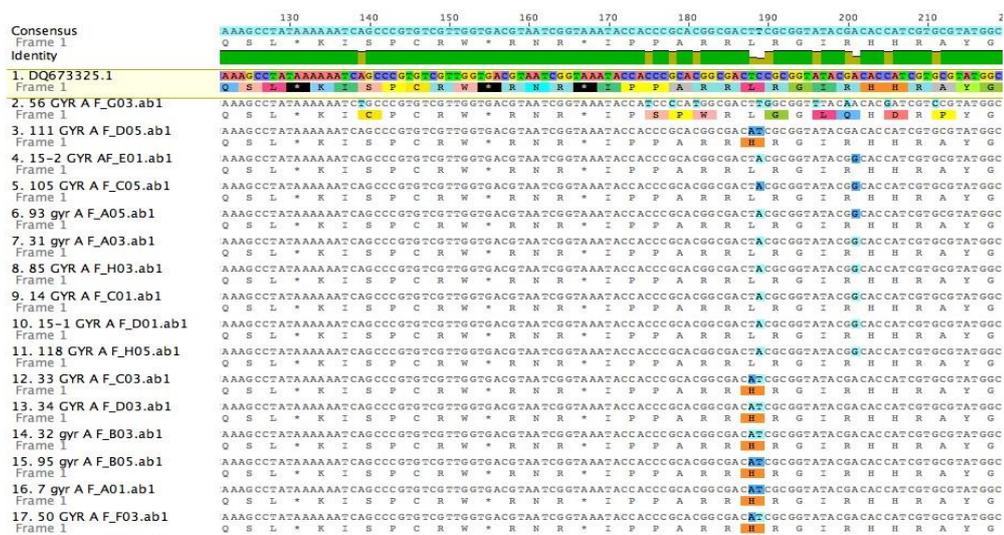


Figura 29 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene *GyrA* e da sequência de aminoácidos codificados.

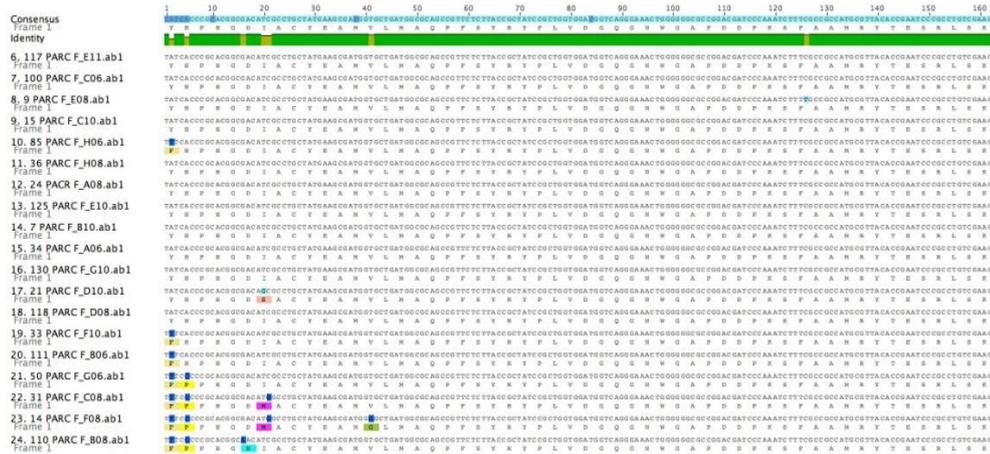


Figura 30 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene *ParC* e da seqüência de aminoácidos codificados.

A partir das análises do sequenciamento dos produtos amplificados do gene *QnrB* foi detectado 92% (11/12) da variante *QnrB42* e 8% (1/12) da variante *QnrB69*. Em relação ao gene *AAC(6')-Ib* a análise de sequenciamento detectou 94% (17/18) para a variante *AAC(6')-Ib-cr* e 6% (1/18) para a *AACA4*. Cinco amostras não foram identificadas decorrente de limitação técnica.

Os resultados da análise do sequenciamento dos produtos amplificados do gene *bla* KPC, obtidos a partir de espécimes de *K. pneumoniae* produtoras de KPC, possibilitaram a identificação do gene *bla* KPC-2 em 100% (4/74) das amostras analisadas.

Em relação aos isolados *K. pneumoniae* produtores de KPC pode-se observar que o perfil de resistência aos antimicrobianos estudados foi de 100% para amoxicilina/ácido clavulânico, cefalotina, cefoxitina, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima, ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina, ácido nalidíxico, amicacina e ertapenem; 75% para gentamicina, meropenem e imipenem (Quadro 10).

Quadro 10 - Perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados de *K.pneumoniae* produtores de KPC.

ANTIMICROBIANOS	PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS /ANTIBIOGRAMA DOS ISOLADOS DE <i>K. pneumoniae</i> PRODUTORES DE KPC (n=4)
Amoxicilina/ácido clavulânico	100%(4)
Cefalotina	100%(4)
Cefoxitina	100%(4)
Cefotaxima	100%(4)
Ceftriaxona	100%(4)
Ceftazidima	100%(4)
Cefepima	100%(4)
Imipenem	75%(3)
Meropenem	75%(3)
Ertapenem	100%(4)
Ciprofloxacina	100%(4)
Levofloxacina	100%(4)
Norfloxacina	100%(4)
Ácido nalidíxico	100%(4)
Amicacina	100%(4)
Gentamicina	75%(3)

Os isolados de *K. pneumoniae* com genes KPC-2 também apresentaram as seguintes associações: 100 % com o gene *bla* CTX-M, 50% para o gene *bla* SHV e 75% com o gen *bla* TEM, 75 % com gene *QnrB*, 100 % com gene *GyrA*, 25% com o

gene *ParC*. Não houve associação com o gene AAC(6')-Ib. Não foram observadas ampliações dos genes *QnrA*, *QnrS*, *QepA*, *armA* e *rmtB*

Foi possível identificar as seguintes variantes associadas ao gene KPC-2: 75% para a variante *bla* CTX-M-71, 25% para CTXM-165, 50% para SHV-11, 25% para SVH-137, 50% para TEM-116, 25% para TEM-209, 75% para *QnrB42*. Quanto aos genes *GyrA* e *ParC*, a frequência de mutações foi 100% e 25%, respectivamente. Os isolados KP95, KP115 e KPX apresentaram as mutações Leu63His e Tyr265Arg no gene *GyrA*. O isolado KP111 apresentou as seguintes mutações no gene *GyrA* His9Leu, Gly17Arg, Ile35Val, Leu63His e Tyr165Ala, e no gene *ParC* a mutação Tyr1Phe.

Após o sequenciamento dos produtos amplificados foi possível compor um mapa de identificações dos genes estudados, o qual está apresentado na figura 31.

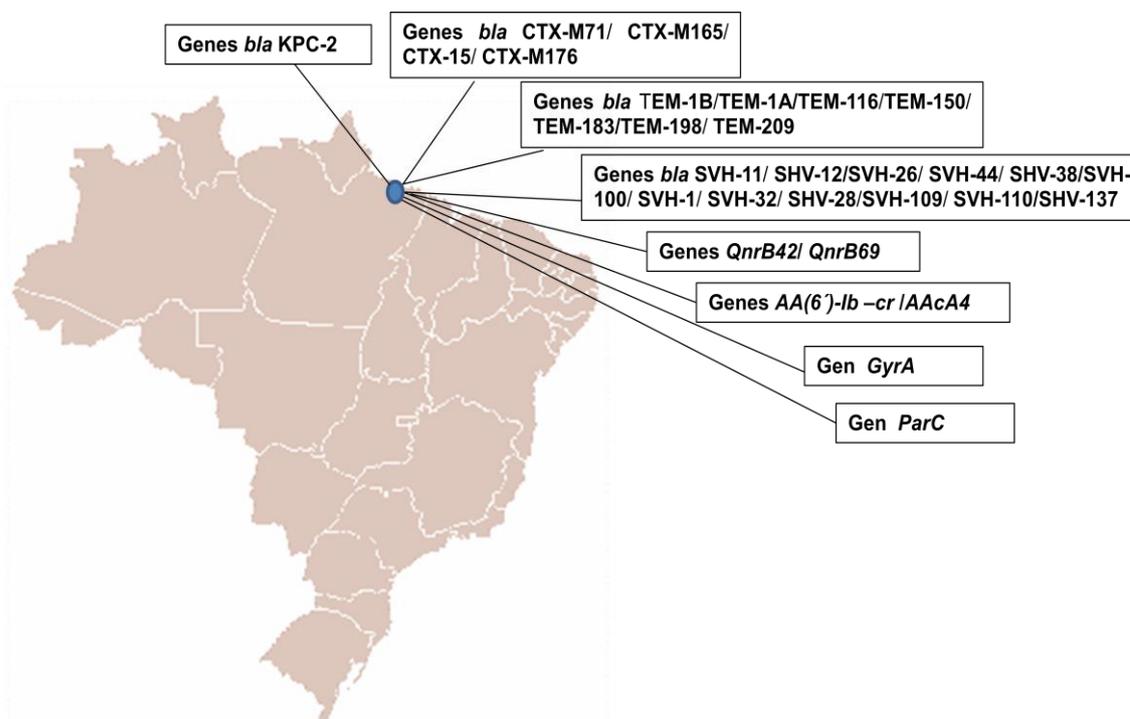


Figura 31 - Genes detectados pela análise do sequenciamento em amostras de *K. pneumoniae*

Quanto aos resultados das MICs para as amostras com genes KPC-2 foi verificado as seguintes MICs para os antimicrobianos betalactâmicos: para a amoxicilina/ácido clavulânico 100% das amostras apresentam MIC 32 µg/mL; para cefalotina 100% com MIC 32 µg/ mL; para cefoxitina 75% com MIC 64 µg/ mL e 25% com MIC 16 µg/ mL; para cefotaxima 75% com MIC ≥256 µg/mL e 25% com

MIC 16 µg/ mL, para ceftriaxona 100% com MIC ≥32 µg/mL, para ceftazidima 50% com MIC 64 µg/mL e 50% com MIC 16µg/m; para a cefepima 75% com MIC ≥256 µg/mL e 25% MIC 12µg/mL. Para as quinolonas 100% das MICs para ciprofloxacina foram ≥32 µg/mL, 50% das MICs para levofloxacina foram ≥32 µg/mL e 50% foram 16 µg/mL; para a norfloxacina 75% das MICs foram ≥256 µg/mL e 25% foram ≥32 µg/mL, para o ácido nalidixico 100% das MICs foram ≥256 µg/mL. Para os carbapenens, observou-se que para o imipenem 50% das MICs foram 16 µg/mL, 25% foram 8 µg/mL e 25% foram 2 µg/mL; para o meropenem os valores foram de 25% para cada uma das MICs a seguir ≥32 µg/mL, 16 µg/mL, 4 µg/mL e 2 µg/mL; para o ertapenem 50% das MICs foram ≥32 µg/mL, 25% foram 4 µg/mL e 50% foram 2 µg/mL (Quadro 11).

Quadro 11 - Isolados produtores de KPC, genes sequenciados e concentração mínima inibitória. AC = amoxicilina/ ácido clavulânico, CL= cefalotina, CX= ceftriaxona, CM= cefotaxima, CR= ceftriaxona, CZ= ceftazidima, CP= cefepima, LV= levofloxacina, NR= norfloxacina, NA= ácido nalidíxico ,IM= imipenem, MR= meropenem, ET= ertapenem.

Isolado KPC	Genes Amplificados	Antimicrobianos/Concentração Mínima Inibitória (µg/mL)/ Suscetibilidade													
		AC	CL	CX	CM	CR	CZ	CP	CI	LV	NR	AN	IM	MR	ET
K95	KPC2/CTXM71/ SHV11/TEM116/ Qnr42/Gyr	32/ (R)	32/ (R)	64/ (R)	≥ 256 /(R)	≥ 32/ (R)	16/ (R)	≥ 256 /(R)	≥ 32/ (R)	≥ 32/ (R)	≥ 256 /(R)	≥ 256 /(R)	16/ (R)	16/ (R)	2/ (R)
K111	KPC2/CTXM71/ SHV137/Qnr42/ GyrA /ParC	32/ (R)	32/ (R)	64/ (R)	16/ (R)	≥32/ (R)	16/ (R)	≥ 256 /(R)	≥ 32/ (R)	≥ 32/ (R)	≥ 256 /(R)	≥ 256 /(R)	8/ (R)	4/ (R)	4/ (R)
K115	KPC2/CTXM71/ SHV11/TEM116/ Qnr42/GyrA	32 /(R)	32/ (R)	16/ (I)	≥ 256 /(R)	≥ 32/ (R)	64/ (R)	≥ 256 /(R)	≥ 32/ (R)	≥ 32 (R)	≥ 256 /(R)	≥ 256 /(R)	2/ (I)	2/ (I)	≥ 32/ (R)
Kx3	KPC2/CTXM165/ TEM209/GyrA	32/ (R)	32/ (R)	64/ (R)	≥ 256 /(R)	≥ 32/ (R)	64/ (R)	≥ 256 /(R)	≥ 32/ (R)	16/ (R)	32/ (R)	≥ 256 /(R)	16/ (R)	≥ 32/ (R)	≥ 32/ (R)

Nos isolados *K. pneumoniae* produtores de ESBL, o perfil de resistência aos antimicrobianos estudados foi de 63% para amoxicilina/ácido clavulânico, 100% para cefalotina, 34% para ceftazidima, 100% para cefotaxima, 100% para ceftriaxona, 100% para ceftazidima, 100% para cefepima, 36% para ciprofloxacina, 35% para levofloxacina, 32% para norfloxacina, 36% para ácido nalidíxico, 12% para amicacina, 58% para gentamicina, 9% para imipenem, 9% para meropenem e 11% para o ertapenem (Quadro 12).

Quadro 12 - Perfil de resistência aos antimicrobianos nos isolados de *K. pneumoniae* produtora de ESBL.

ANTIMICROBIANOS	PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS <i>K. pneumoniae</i> ESBL/(n=74)
Amoxicilina/ácido clavulânico	63%(47/74)
Cefalotina	100%(74)
Ceftazidima	34%(25/74)
Cefotaxima	100%(74)
Ceftriaxona	100%(74)
Ceftazidima	100%(74)
Cefepima	100%(74)
Imipenem	9%(7/74)
Meropenem	9%(7/74)
Ertapenem	11%(8/74)
Ciprofloxacina	36%(27/74)
Levofloxacina	35%(26/74)
Norfloxacina	32%(24/74)
Ácido nalidíxico	36%(27/74)
Amicacina	12%(9/74)
Gentamicina	58%(43/74)

No que diz respeito à relação entre os isolados de *K. pneumoniae* contendo os genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e o perfil de resistência à amoxicilina/ácido clavulânico dos isolados *K. pneumoniae* ESBL, observou-se que a maior MIC para amoxicilina/ácido clavulânico foi de 32µg/mL ($p < 0,05$) com 71,93%(41/57), 67,79%(40/59) e 66,67%(38/57) referentes aos isolados contendo os genes *bla* TEM, SHV e CTX-M, respectivamente (Figura 32).

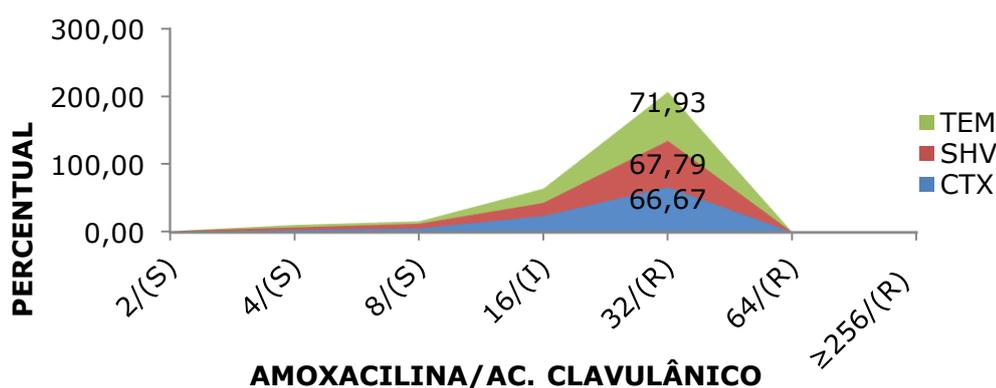


Figura 32 - Relação entre isolados *K. pneumoniae* com os genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e o perfil de resistência à Amoxicilina/ácido clavulânico.

Quanto à relação entre os espécimes contendo os genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e a resistência à cefoxitina dos isolados *K.pneumoniae* ESBL, observou-se um perfil heterogêneo com menor tendência à resistência. Pode-se observar que os percentuais mais representativos para resistência foram para as MIC 64µg/mL e $\geq 256\mu\text{g/mL}$. Os espécimes com genes *bla* TEM, SHV e CTX-M apresentaram os seguintes percentuais para a MIC 64µg/mL: 17,54% (10/57), 18,64% (11/59) e 15,78% (9/57), respectivamente. Por outro lado, nos isolados com a MIC $\geq 256\mu\text{g/mL}$ os percentuais foram 17,54% (10/57), 15,25% (9/59), e 19,29% (11/57), respectivamente (Figura 33).

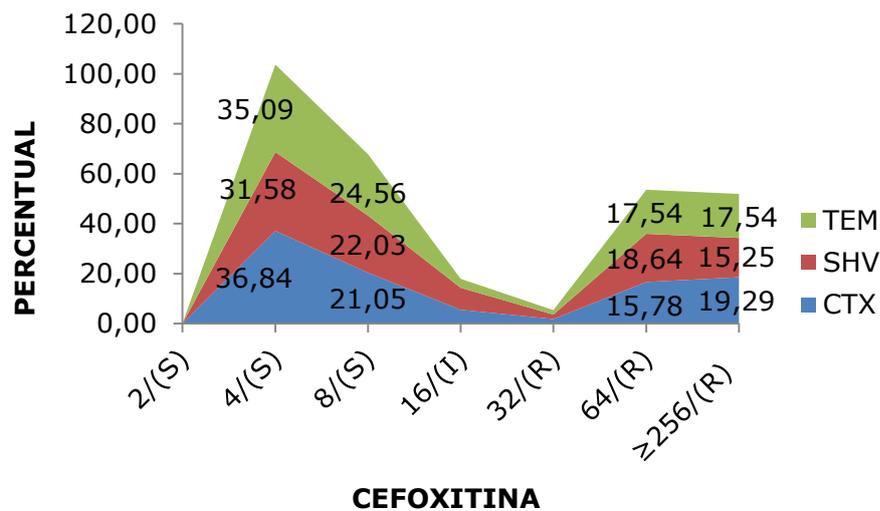


Figura 33 - Relação entre isolados *K. pneumoniae* com os genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e o perfil de resistência à cefoxitina.

Quanto à correlação entre os isolados de *K. pneumoniae* contendo os genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e a resistência à cefalotina pode-se observar que 100% (57/TEM, 59/SHV, 57/CTX-M) das MIC foram de 32µg/mL ($p < 0,05$) para todas as amostras analisadas (Figura 34).

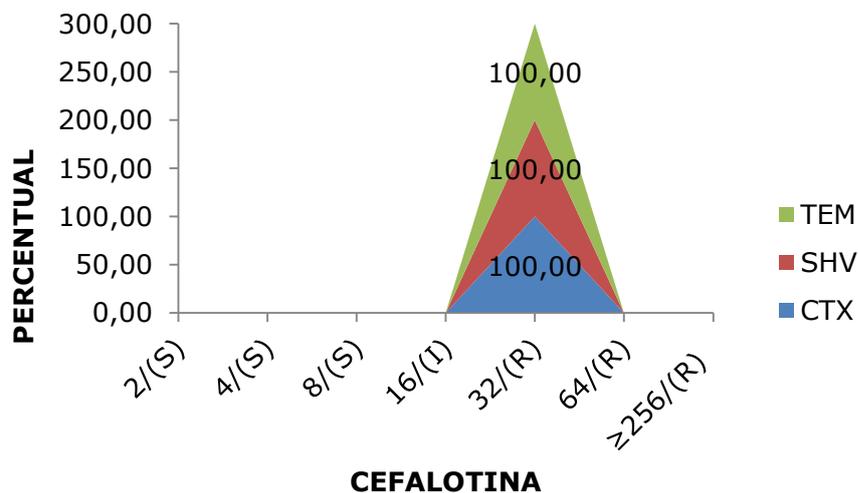


Figura 34 - Relação entre isolados *K. pneumoniae* com genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e o perfil de resistência à cefalotina.

Sobre a relação entre os espécimes de *K. pneumoniae* com genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e a resistência à ceftriaxona verificou-se que o maior percentual foi

para a MIC 32µg/mL ($p < 0,05$), distribuídos nos espécimes estudados com 91,23% (52/57) para o gene *bla* TEM, 94,91% (56/59) para o gene *bla* SHV e 92,98% (53/57) para gene *bla* CTX-M (Figura 35).

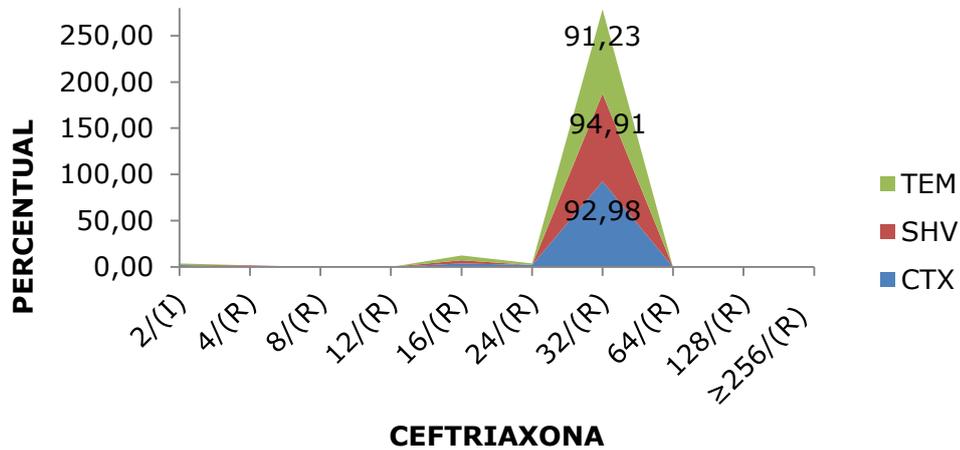


Figura 35 - Relação entre isolados *K. pneumoniae* com os genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e o perfil de resistência à ceftriaxona. Dos isolados *K. pneumoniae* ESBL.

Quanto à relação entre os isolados de *K. pneumoniae* com genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e a resistência à cefotaxima, verificou-se que o maior percentual foi para a MIC $\geq 256\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) com a seguinte percentagem: 70%(40/57) , 66,1% (39/59) e 71,93% (41/57) para os isolados contendo genes *bla* TEM, SHV, e CTX-M, respectivamente (Figura 36).

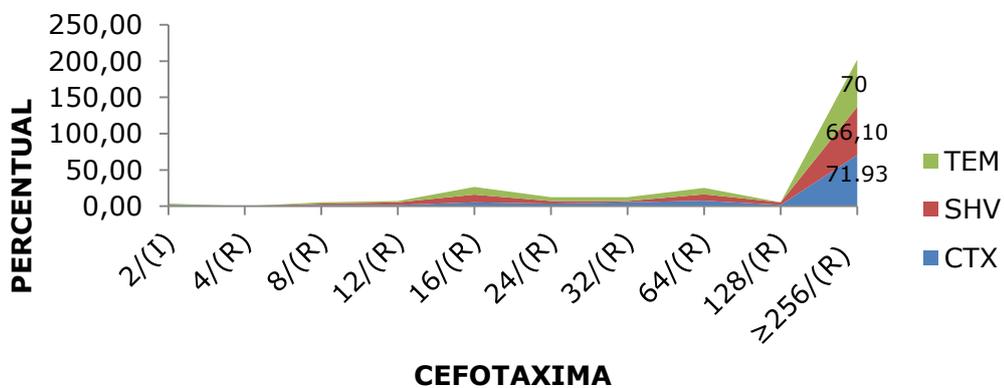


Figura 36 - Relação entre isolados *K. pneumoniae* com os genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e o perfil de resistência à cefotaxima.

Na correlação entre os espécimes *K. pneumoniae* com os genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e a resistência à ceftazidima, observou-se maior percentual para a MIC 64µg/mL ($p < 0,05$) distribuído da seguinte forma: 42,11% (24/57) para o gene *bla* TEM, 42,37% (25/59) para o gene *bla* SHV e 49,12% (28/57) para o gene *bla* CTX-M (Figura 37).

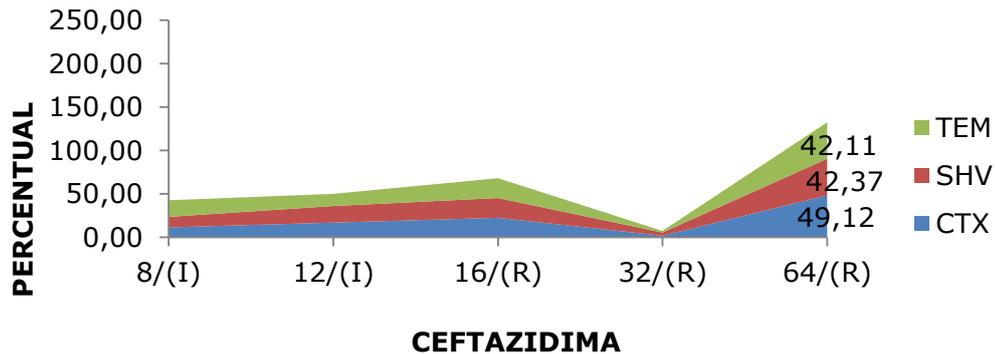


Figura 37 - Relação entre isolados *K. pneumoniae* com genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e o perfil de resistência à ceftazidima.

Quanto à relação entre os espécimes *K. pneumoniae* com genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e a resistência à cefepima, verificou-se que os percentuais mais representativos para resistência foram para as MIC 12µg/mL e $\geq 256\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$). Os espécimes com gen *bla* TEM, SHV e CTX-M apresentaram os seguintes percentuais para a MIC 12 µg/mL: 29,82% (17/57), 22,03 (13/59) e 24,56% (14/57), respectivamente. Já para a MIC $\geq 256\mu\text{g/mL}$ os percentuais foram 24,56% (14/57), 27,11% (16/57) e 24,25% (14/57), respectivamente. (Figura 38).

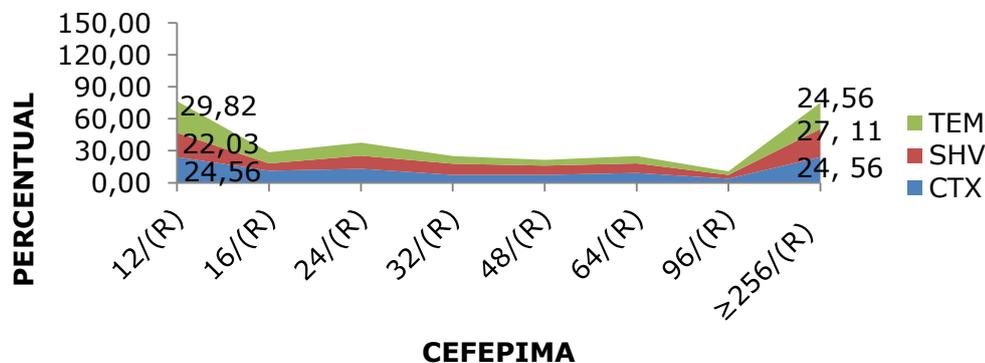
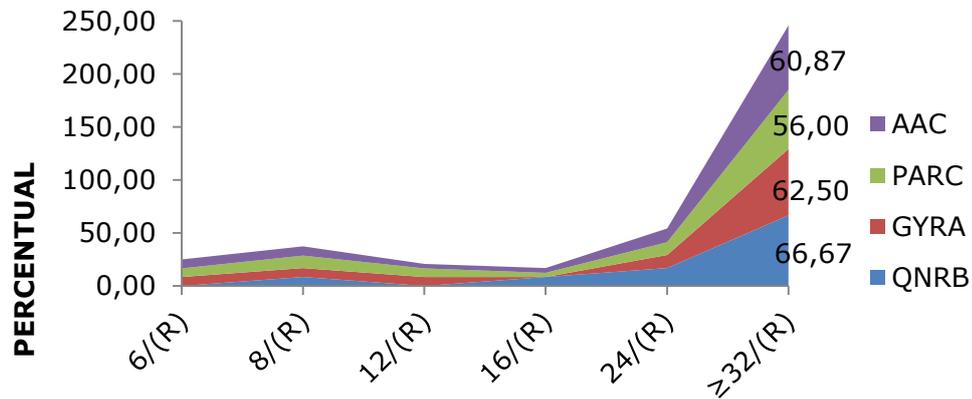


Figura 38 - Relação entre isolados *K. pneumoniae* com os genes *bla* TEM, SHV e CTX-M e o perfil de resistência à cefepima.

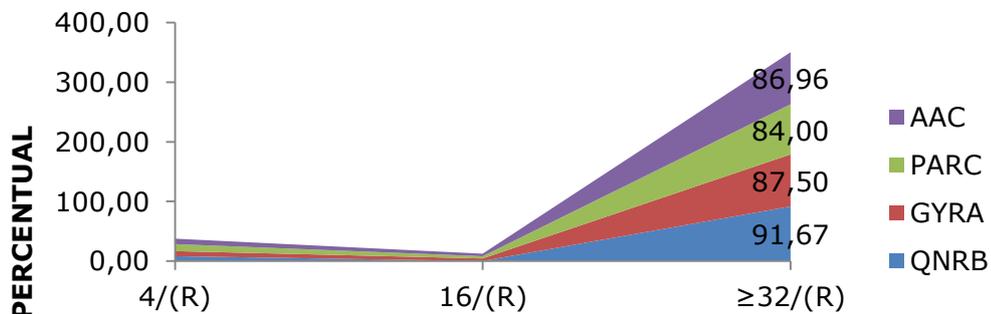
No que diz respeito à relação entre os isolados *K. pneumoniae* contendo os genes *AAC(6')-Ib*, *ParC*, *GyrA* e *QnrB* e o perfil de resistência à levofloxacina, percebeu-se que a maior MIC foi 32µg/mL ($p < 0,05$) com 60,87% (14/23), 56%(14/25), 62,50%(15/24) e 66,67% (8/12), respectivamente (Figura 39).



LEVOFLOXACINA

Figura 39 - Relação entre os isolados de *K. pneumoniae* contendo os genes *AAC(6')-Ib*, *ParC*, *GyrA*, *QnrB*, e o perfil de resistência à levofloxacina.

Em relação aos isolados de *K. pneumoniae* contendo os genes *AAC(6')-Ib*, *ParC*, *GyrA* e *QnrB* e o perfil de resistência à ciprofloxacina, verificou-se que o maior percentual para a MIC foi de ≥ 32 µg/mL ($p < 0,05$), distribuído da seguinte forma: 86,96% (20/23), 84% (21/25), 87,50% (21/24), 91,67% (11/12), respectivamente (Figura 40).



CIPROFLOXACINA

Figura 40 - Relação entre os isolados de *K. pneumoniae* contendo os genes *AAC(6')-Ib*, *ParC*, *GyrA*, *QnrB*, e o perfil de resistência à ciprofloxacina.

Quanto à correlação entre os genes *AAC(6')-Ib*, *ParC*, *GyrA*, *QnrB* e a resistência à norfloxacina, verificou-se nos isolados analisados que a maior frequência foi para a MIC ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$) com 82,61%(19/23) para amostras com gen *AA(6')-Ib*, 80%(20/25) para as com gen *ParC*, 83,33%(20/24) para as com gen *GyrA*, e 91,67%(11/12) para as com gen *QnrB* (Figura 41).

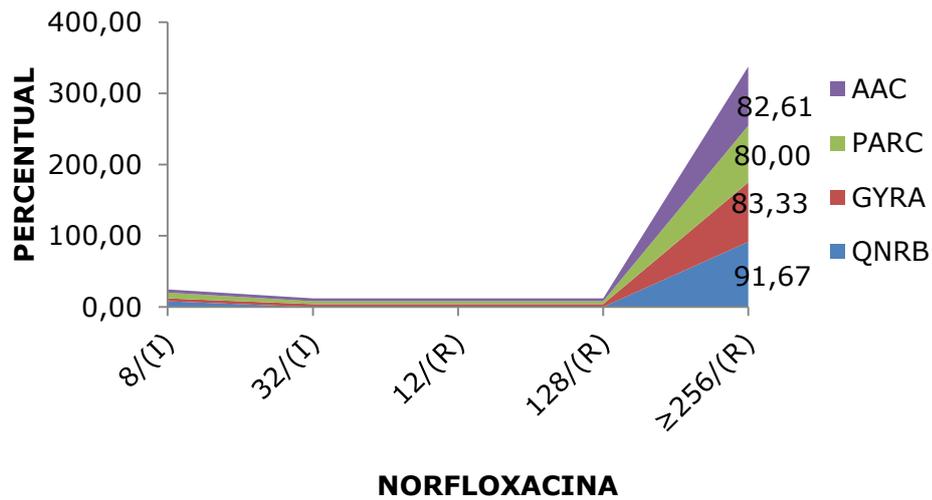


Figura 41 - Relação entre os isolados de *K. pneumoniae* contendo os genes *AAC(6')-Ib*, *ParC*, *GyrA*, *QnrB* e o perfil de resistência à norfloxacina.

Em relação aos isolados de *K. pneumoniae* contendo os genes *AAC(6')-Ib*, *ParC*, *GyrA*, *QnrB* e a resistência ao ácido nalidixico, observou-se uma maior frequência para a MIC ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$), distribuída entre as amostras com genes *AAC(6')-Ib*, *ParC*, *GyrA*, *QnrB* com os seguintes percentuais 91,30% (21/23), 88% (22/25) e 91,67% (22/24), 91,67% (11/12), respectivamente (Figura 42).

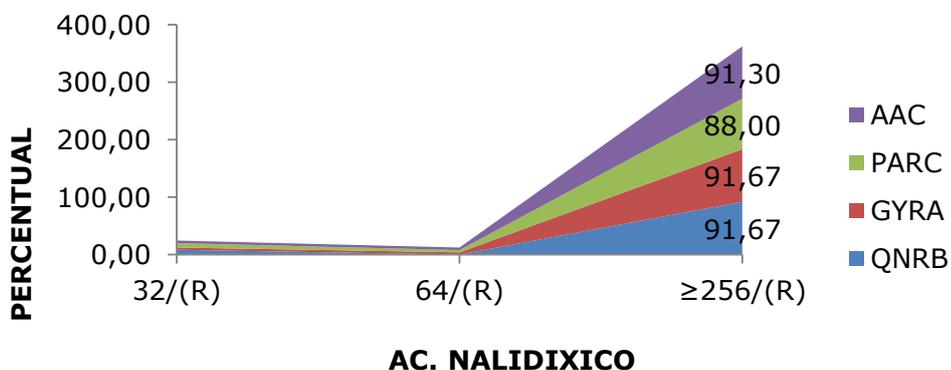


Figura 42 - Relação entre os isolados de *K. pneumoniae* contendo os genes *AAC(6')-Ib*, *ParC*, *GyrA*, *QnrB*, e o perfil de resistência ao ácido nalidixico.

Os espécimes de *K. pneumoniae* produtores de ESBL e KPC foram isolados a partir de: 40,5% (30/74) de amostras de urina; 23% (17/74) de swab retal; 23% (17/74) de sangue; 4,2% (3/74) de ponta de cateter; 2,7% (2/74) de secreção traqueal; 2,7% (2/74) de lavado brônquico alveolar; 1,3% (1/74) de fístula; 1,3% (1/74) de abcesso; e 1,3% (1/74) de ferida operatória (Figura 43).

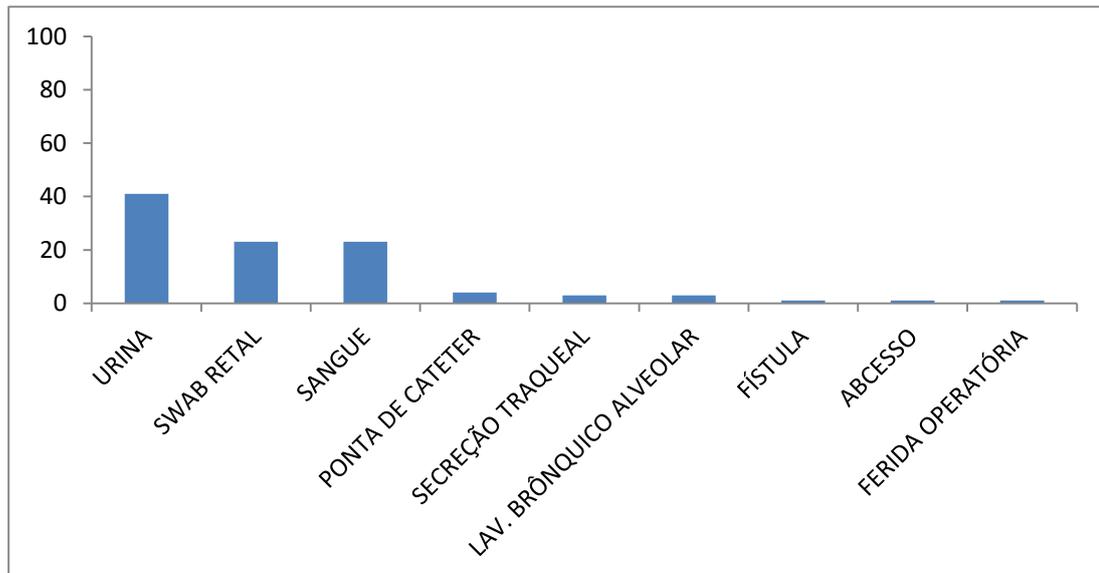


Figura 43 - Fontes de isolamento de *K. pneumoniae* produtora de ESBL e KPC.

4. DISCUSSÃO

Os espécimes de *K. pneumoniae* são considerados dentre as bactérias Gram negativas os mais frequentemente isolados em ambiente hospitalar em todo o mundo e têm sido associados a processos e surtos infecciosos, principalmente por sua resistência aos antimicrobianos utilizados na terapêutica (Chung *et al.*, 2015).

Dados do programa *Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY), programa mundial e longitudinal de vigilância de resistência aos antimicrobianos, demonstraram que 50% dos espécimes de *K. pneumoniae* isolados na América Latina no ano de 2011 produziram ESBL, evidenciando assim sua grande capacidade de adquirir e expressar mecanismos de resistência aos antimicrobianos (Jones *et al.*, 2013).

De acordo com o *Center of Disease Control* (CDC, 2013), a *K. pneumoniae* foi considerada um “desafio urgente à saúde humana” por sua associação com a multirresistência aos antimicrobianos.

Segundo Livermore (2012), a resistência aos antimicrobianos tem se tornado mais grave em bactérias Gram negativas. A elevada prevalência de ESBL tem aumentado a dependência do uso de carbapenem, fármaco reservado para o tratamento contra isolados produtores de ESBL multirresistentes.

Tem sido crescente a detecção de cepas de *K.pneumoniae* capazes de produzir carpenemases, como a KPC, que podem hidrolizar carbapenens. Adicionalmente, há registros de isolados de *K. pneumoniae* resistentes a outras categorias de antimicrobianos como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e sulfametaxazol/trimetropim (Cantón *et al.*, 2012; Falagas *et al.*, 2016).

O tratamento de isolados patogênicos de *K. pneumoniae*, particularmente os produtores de ESBL e KPC, está frequentemente associado a falha terapêutica em pacientes hospitalizados. Além disso, esses isolados têm habilidade de contaminar rapidamente o ambiente hospitalar, disseminando genes que codificam mecanismos de resistência, resultando em elevação de taxas de morbidade e mortalidade (Trivedi *et al.*, 2015).

A detecção de bactérias produtoras de mecanismos enzimáticos capazes de promover falha terapêutica, como ESBL e KPC, pode favorecer um melhor manejo clínico do paciente e, adicionalmente, a execução de medidas de controle

microbiano a fim de evitar a disseminação de isolados resistentes aos antimicrobianos no hospital, e até mesmo entre hospitais (Girometti *et al.*, 2014, Hendrik *et al.*, 2015, Oduro-Mensah *et al.*, 2016).

Em 2009 o CLSI e o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) publicaram alterações interpretativas em relação aos pontos de corte para os testes de suscetibilidade para penicilinas, cefalosporinas e monobactam, representando uma mudança de paradigma para interpretação e relatos dos isolados produtores de ESBL. Nesse contexto, os testes de triagem fenotípicos para detecção de ESBL foram sugeridos apenas para fins epidemiológicos, sendo desnecessários para a rotina. O tratamento de isolados produtores de ESBL com cefalosporinas passou a ser permitido dependendo dos resultados dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos analisados com os novos pontos de corte, independente da produção de ESBL pelo micro-organismo (Hombach *et al.*, 2013).

As proposições dos novos pontos de corte para isolados produtores de ESBL levantam questionamentos sobre a eficácia do tratamento. Além disso, a isenção dos testes fenotípicos para a detecção de ESBL seria um contrasenso dada a sua elevada transmissibilidade entre as bactérias. Nessa perspectiva, a utilização de técnicas para a detecção desse mecanismo de resistência favorece o rastreamento de ESBL em isolados clínicos no ambiente hospitalar, bem como na comunidade (Harris, 2015, El - Jad *et al.*, 2016).

As triagens fenotípicas realizadas nesse estudo detectaram que 60% dos isolados de *K. pneumoniae* produziram ESBL. Foram identificadas por Reis *et al.* (2013) percentuais de 57,4% de isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL em amostras de paciente de um hospital privado de Fortaleza, Ceará. Outro estudo em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, detectou a presença de betalactamases em 75,8% de espécimes de *K. pneumoniae* em um hospital de emergência (Meyer & Picoli, 2011). Em Passo Fundo, Rio Grande do Sul, foram detectados 2,4% de isolados de *Klebsiella spp* produtores de ESBL (Lago *et al.*, 2010). Já um estudo realizado por Rodrigues & Mesquita (2016) detectou em Caruaru, Pernambuco, a produção de ESBL em 22,1 % espécimes de *Klebsiella spp*.

Os relatos atuais sobre os dados de isolados de *K. pneumonie* produtores de ESBL ainda são escassos em muitas regiões do Brasil. Não há uma obrigatoriedade de divulgação de registros, por isso a importância de estudos que possam contribuir

com a elucidação do cenário de resistência causado por esses mecanismos enzimáticos. No Brasil, nos anos de 2007 e 2008, houve uma proposta de ampliar o conhecimento sobre a resistência microbiana, através do termo de cooperação TC 37 entre a Organização Pan-Americana da Saúde e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no qual foi proposto um projeto para implantação da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM, envolvendo 114 hospitais da Rede Sentinela e 27 Laboratórios de Saúde Pública. Dentre os objetivos da Rede RM estava o de construir um instrumento capaz de informar e divulgar os dados do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. No ano de 2008, a rede RM passou por dificuldades de diversas ordens, o que culminou posteriormente na inviabilidade de seu prosseguimento nesse formato (ANVISA, 2009).

Atualmente, os dados dos perfis de bactérias resistentes estão disponíveis nos boletins da ANVISA referentes à Segurança do Paciente e Qualidade em Serviço de Saúde. Esses perfis são agora notificados para a ANVISA por meio do formulário eletrônico FormSus. No entanto, os boletins não apresentam resultados de triagens fenotípicas que poderiam elucidar o mecanismo indicativo de resistência aos antimicrobianos (<http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/12>, acessado em 20/05/2016).

Em relação a triagem fenotípica, nesse estudo foi detectado em 5% dos isolados de *K. pneumoniae* a presença de KPC. Ressalta-se que, apesar de 11% dos isolados *K. pneumoniae* produtores de ESBL apresentarem resistência ao ertapenem e 9% ao meropenem e imipenem, apenas 5% apresentaram testes fenotípicos foram positivos para KPC. A resistência aos carbapenems apresentados por amostras negativas para KPC, pode estar envolvida com outros mecanismos como a produção de betalactamase Amp C, deficiência de porinas ou produção de betalactamase OXA-48 (ANVISA, 2013).

O primeiro relato da detecção da KPC no Brasil foi realizado por Monteiro *et al.* (2009) em um isolado de *K. pneumoniae* detectado em Recife, Pernambuco. Posteriormente verificou-se sua disseminação em vários estados do Brasil, bem como em diversos gêneros e espécies bacterianas (Pavez *et al.*, 2009, Peirano *et al.*, 2009, Zavascki *et al.*, 2010, Fehlberg *et al.*, 2012, Nogueira *et al.*, 2013).

Quanto à presença dos genes que codificam betalactamases observou-se que das 74 amostras positivas para os testes fenotípicos, 69 apresentaram

amplificações para os genes associados à codificação de enzimas betalactamases. No entanto 5 amostras foram positivas para os testes fenotípicos, e sem amplificações para nenhum dos genes estudados. Outros tipos de genes menos freqüentes, como os genes *bla* GES e *bla* PER, podem também codificar ESBL, levando a positividade dos testes fenotípicos (Yezli *et al.*, 2015). Para os genes que codificam KPC, observou-se 100% de amplificações nas amostras positivas para os testes fenotípicos, o que confirmou a presença dessas carbapenemases nos isolados estudados.

Em relação aos resultados das reações de PCR para os genes *bla* CTX-M, SHV e TEM observou-se percentuais de amplificações de 83%, 85,5% e 83%, respectivamente. Foi detectada uma elevada associação entre esses genes nos isolados analisados (13 a 60%), indicando a presença de dois a três genes em uma mesma amostra capazes de codificar diferentes betalactamases. No estudo de Shahid *et al.* (2011), o percentual detectado para o gene *bla* CTX-M foi de 39%, 25% para o gene *bla* SHV e 18% para o gene *bla* TEM e uma associação entre esses genes de 38%. Cabral *et al.* (2012) observaram percentuais de 62% tanto para o gene *bla* CTX-M, como para o gene *bla* SHV e 29% para o gene *bla* TEM e uma associação entre esses genes de 71%. Al-Qahtani *et al.* (2014) identificaram percentuais de 92%, 87%, e 54% para os genes *bla* SHV, CTX-M e TEM, respectivamente, e um percentual de associações entre esses genes de 95,2%.

Tem sido relatada a coexistência da produção de ESBL e resistência à quinolonas e aminoglicosídeos, o que constitui um sério problema de saúde pública e requer atenção e vigilância para o monitoramento dos isolados com esse perfil de resistência (Raei *et al.*, 2014). Segundo levantamento do programa SENTRY, 50% dos espécimes de *K. pneumoniae* isolados no Brasil apresentaram altas taxas de resistência às quinolonas, o que colocou o Brasil em primeiro lugar entre os países da América Latina em relação à resistência às quinolonas (Jones, 2013).

Dos 69 isolados *K. pneumoniae* produtores de ESBL com amplificações para os genes que codificam betalactamases, observou-se que 36% (27/69) apresentaram resistência às quinolonas. Nessas amostras foram realizadas reações de PCR para os genes *QnrB*, *QnrA*, *QnrS*, *GyrA*, *ParcA*, *AAC (6')-Ib*, *QepA*, cujo resultado foi 44%, 0%, 0%, 88%, 93%, 85%, 0%, respectivamente. Houve também a detecção de associações de genes em uma mesma amostra, com um total de 86%. Por outro lado, em relação aos aminoglicosídeos, apesar da detecção de resistência

de 62% (43/69) nas amostras analisadas, não houve amplificação para os genes *armA* e *rmtB*.

A resistência às quinolonas pode ser atribuída a vários mecanismos, como mutações cromossômicas nos genes que codificam as enzimas DNA-girase e topoisomerase IV, redução do acúmulo do antimicrobiano no interior da célula bacteriana devido à hiperexpressão das bombas de efluxo e alterações nas porinas presentes na membrana externa que reduzem a permeabilidade ao agente antimicrobiano. Adicionalmente, a aquisição de genes plasmidiais tem sido citada na literatura pelo envolvimento na diminuição da suscetibilidade às quinolonas (Chávez-Jacobo *et al.*, 2015).

Nesse estudo genes relacionados à resistência às quinolonas foram amplificados, os quais podem contribuir para a ineficácia do uso desses antimicrobianos, principalmente quando encontrados de forma associada em uma mesma amostra. Foram observados nos isolados *K. pneumoniae* percentuais elevados de amplificações dos genes *GyrA* e *AAC(6')-Ib*. De acordo com Minarini & Darini (2012), mutações em genes cromossomais, como *GyrA*, são uma das principais causas de resistência às quinolonas em enterobactérias. Foram detectadas por Al-Marzooq *et al.* (2014), na Malásia, 44% de mutações para os genes *GyrA* em isolados de *K. pneumoniae* resistentes às quinolonas. Nos estudos realizados na China por Hou *et al.* (2015) foram observados em espécimes de *K. pneumoniae* multirresistentes uma frequência de 71% de mutações neste gene, resultando também em um perfil de resistência às quinolonas.

A produção de variantes de enzimas acetiltransferases (AACs) codificadas pelo gene plasmidial *AAC(6')-Ib* é um mecanismo capaz de inativar quinolonas (Paiva *et al.*, 2012, Mood *et al.*, 2015). Tal variante tem sido recentemente envolvida com a resistência à ciprofloxacina, o que foi detectado por Frasson *et al.* (2011) em 8 % dos espécimes de *K. pneumoniae* que apresentavam o gene *AAC(6')-Ib*. Já nos estudos de Eftekha & Seyedpour (2015), 89,4% dos espécimes de *K. pneumoniae*, recuperados de amostras clínicas de pacientes hospitalizados em Teerã, apresentavam o gene *AAC(6')-Ib* indicando resistência *in vitro* à ciprofloxacina.

O gene *Qnr* tem sido referido na literatura como um determinante plasmidial de resistência à quinolona (Shams, *et al.*, 2015). No estudo de Peirano *et al.* (2011), no Rio de Janeiro, foi observado uma frequência de 20% do gene *QnrB* em isolados de *K. pneumoniae*. Dados do estudo de Kim *et al.* (2011), realizado na Coreia,

indicaram frequência de 85,7%% de detecção do gene *QnrB*. Um estudo realizado em Kolkata, Índia, observou uma frequência de 56% desse gene nos espécimes de *K. pneumoniae* analisados (Tripath *et al.*, 2012).

Quanto aos aminoglicosídeos, apesar da detecção de 62% de isolados resistentes pelo antibiograma, não houve ampliações para os genes *armA* e *rmtB*. Esses genes estão associados à produção das metiltransferases 16S rRNA, as quais conferem altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos. Porém, a resistência aos aminoglicosídeos pode estar associada a outros mecanismos, como por exemplo, efluxo do antimicrobiano e modificação do alvo ribossômico, e que podem estar relacionados com o perfil apresentado pelos isolados (Doi *et al.*, 2016).

As enzimas CTX-M são consideradas um paradigma na evolução dos mecanismos de resistência em função de sua disseminação global e atualmente são conhecidas como “CTX-M pandêmicas”. A família de ESBL CTX-M é constituída por cinco grupos categorizados como CTX- M-1, CTX- M-2, CTX- M-8, CTX- M-9, CTX- M-25, e também por algumas enzimas isoladas (Canton *et al.*, 2012).

De acordo com Rossi (2011), a CTX-M é a ESBL mais frequentemente encontrada no Brasil, e as variantes CTX- M-2, CTX- M-8, CTX- M-9, CTX- M-14, CTX- M-15, CTX- M-16 são as mais identificadas.

As enzimas CTX-M podem ser disseminadas por plasmídeo ou multiplicação clonal. Tal fato pode ser observado na disseminação de CTX-M-15, que ocorre de formas diferentes em *E. coli* e *K. pneumoniae*. Nos espécimes de *K. pneumoniae*, o gen *bla* CTX-M-15 é frequentemente transferido por plasmídeos para cepas geneticamente diferentes, sem predominância da disseminação clonal. Por outro lado, em determinadas linhagens de *E. coli*, como a ST 131 que carrega plasmídeos IncF, verifica-se o sucesso da multiplicação clonal, o que tem favorecido sua ampla distribuição no mundo (Livemore, 2012).

A enzima CTX-M-15 tornou-se predominante nos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentando registros de disseminação global (Cantón *et al.*, 2012). No Brasil, o gene *bla* CTX-M-15 foi detectado pela primeira vez em 2010 em isolados de *E. coli* de pacientes hospitalizados em São Paulo. Posteriormente foi observado em outros estados brasileiros, como no Rio de Janeiro, onde foi verificado um percentual maior que 50% em isolados produtores de ESBL (Cergole-Novella, 2010, Tolentino *et al.*, 2011, Seki *et al.*, 2013).

As ESBLs tipo CTX-M foram inicialmente descobertas por apresentar alta atividade hidrolítica contra a cefotaxima. Porém, foi observado na enzima CTX-M-15 uma capacidade hidrolítica contra ceftazidima significativamente maior em relação à cefotaxima. Esta capacidade maior está associada à presença da mutação Asp240Gly no gene *bla* CTX-M-15 quando comparada ao gene CTX-M-1 (Seki *et al.*, 2013).

Segundo Seki *et al.* (2013), os isolados que carregam o gene *bla* CTX-M-2 codificador da enzima CTX-M-2 são os mais prevalentes na América do Sul, incluído o Brasil. Estudos realizados no Brasil têm sido observado que a enzima CTX-M-2 encontra-se disseminada em vários estados do país como São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Pernambuco, que reforça seu perfil endêmico (Climaco *et al.*, 2010, Lopes *et al.*, 2010, Tolentino *et al.*, 2012, Queiroz *et al.*, 2012, Cabral *et al.*, 2012).

Neste estudo foram identificados através da análise do sequenciamento de DNA os genes *bla* CTX- M-15, CTX- M-71, CTX- M-165, CTX- M-176 com a seguinte frequência: 5%, 60%, 32%, 3,5%, respectivamente. Dentre os genes observados apenas o gene *bla* CTX- M-15 compõe o grupo CTX- M-1, o gen CTX-165 compõe o grupo CTX-M-2, e o gen CTX- M-176 ainda não integra a classificação vigente (Livemore *et al.*, 2007).

Em relação a frequência do gene *bla* CTX- M-15, bem como dos demais genes identificados nesse estudo, os dados percentuais encontrados no presente estudo divergem dos referidos por Rossi (2011) e Seki *et al.* (2013).

O gene *bla* CTX-M-71 foi detectado em espécimes de *K. pneumoniae* isolados da urina de um paciente do sexo masculino com 29 anos, internado no Hospital Universitário da Bulgária. A variante CTX- M-71 é caracterizada pela presença de uma substituição do resíduo de glicina por cisteína na posição 238 (Gly238Cys) da proteína, mutação não encontrada na variante CTX- M-15 (Schneider *et al.*, 2009). Essa é a primeira descrição do gene *bla* CTX-M-71 em amostra clínica no Brasil.

O gene *bla* CTX- M-165 foi identificado em espécimes de *K. pneumoniae* de isolados de urina de paciente no Chile e faz parte da família CTX-M-2 (NCBI,NG_048950.1/<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1035503077/?report=genbank>/acessado em 12/04/16). Já o gene *bla* CTX- M-176, foi detectado em isolados de *K. pneumoniae* recuperados do material de secreção vaginal de uma paciente na

Itália (NCBI,NG_048961/ [https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/ nuccore/ 949394541/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/949394541/), acessado em 12/04/2016). Os artigos referentes a esses genes ainda não foram publicados, por isso os detalhes sobre as características não foram mencionados. O presente estudo aponta também para a primeira descrição dos genes *bla* CTX- M-165 e CTX- M-176 no Brasil.

As enzimas SHV têm ampla distribuição mundial, sendo que betalactamases como SHV-11 e SHV-12 encontram-se disseminadas em muitos países (Liakopoulos et al., 2016). Neste estudo, através da análise de sequenciamento de DNA, foi possível identificar uma grande variedade de genes que codificam SHV. Dentre esses, destacam-se os genes *bla* SHV- 12, SHV- 38, SHV-100 que codificam ESBL, e os genes *bla* SHV- 1, SHV-11, SHV- 26, SHV- 28, SHV- 32, SHV- 44, SHV-109, SHV-110, SHV-137 que codificam betalactamases de espectro restrito ([http:// www.lahey.org/ studies/ webt.htm](http://www.lahey.org/studies/webt.htm)/acessado em 28/05/2016).

A variante enzimática SHV-12, codificada pelo gene *bla* SHV- 12, apresenta uma substituição de leucina para glutamina na posição 35 (Leu35Gln) da proteína que confere sua propriedade de ESBL. Esta mutação é ausente na SHV-1 (Nüesch-inderbinnen, et. al., 1997). O gene *bla* SHV- 12 foi detectada em plasmídeos conjugativos de *E.coli* isoladas em pacientes hospitalizados na Suíça.

O gene *bla* SHV- 38 codifica a enzima SHV- 38 que tem uma substituição do resíduo de alanina por valina na posição 146 da proteína. Este gene foi detectado em espécimes de *K. pneumoniae*, isolados de uma cultura de sangue e secreção intestinal de um paciente de do sexo masculino de 69 anos, em uma unidade de terapia intensiva na França, em 2001 (Poirel et al., 2003).

O genes *bla* SHV-12 e SHV-38 foram detectados pela primeira vez no Brasil por Tolentino et al. em 2011, em amostras clínicas de pacientes em São Paulo (Tollentino et al., 2011).

A enzima SHV-100 codificada pelo gene *bla* SHV-100 tem uma inserção de 13 aminoácidos (SerGluSerGlnLeuSerGlyArgValGlyMetIleGlu) quando comparada a enzima SHV-1. O gen *bla* SHV-100 foi observado em espécimes *K. pneumoniae* isolados de diversas amostras clínicas de pacientes internados em um hospital na Argélia (Liakopoulos et al., 2016).

O presente estudo identificou pela primeira vez na Região Norte do Brasil o gene *bla* SHV-100 em isolados de *K. pneumoniae*.

Em relação as enzimas do grupo TEM foram observados neste estudo os seguintes genes associados à codificação dessas enzimas : *bla* TEM-116 (30%) *bla* TEM-1B (26%), *bla* TEM-1^a (24,5%), *bla* TEM-150 (9%), 3% *bla* TEM-183 (3,5%), *bla* TEM-198 (3,5%), *bla* TEM-209 (3,5%). Todos esses genes são relacionados à produção de betalactamases de espectro restrito ([http:// www.lahey.org/ studies/ webt.htm/](http://www.lahey.org/studies/webt.htm/) acesso 14/05/2016). Os genes *bla* TEM 1A e TEM -1B codificam enzimas precursoras de ESBL e diferem entre si pela presença de mutações silenciosas (Leflon-Guibout *et al.*, 2000). No presente estudo a maioria dos isolados que apresentavam gene *bla* TEM estavam associados a outros genes que codificam ESBL.

Nesse estudo, os dados oriundos da análise de sequenciamento dos genes referentes à resistência às quinolonas, possibilitaram a identificação de 92% de isolados com gene *QnrB42* e 8% com gene *QnrB69*; 94% com gene *AAC(6')-Ib-cr* e 6% com gene *AACA4*; 100% de isolados com mutações no gen *GyrA* , 43% com mutações no gen *ParC*.

O gene *QnrB42* foi detectado em espécimes de *K. pneumoniae* recuperadas de amostras clínicas de pacientes hospitalizados na França (Guillard *et al.*, 2012). Já o gen *QnrB69* foi identificado em espécimes de *Citrobacter freundii* isolados de fezes de corvo nos Estados Unidos (Halová *et al.*, 2014). Estes genes apresentam 645 pares de bases. O presente estudo aponta para a primeira descrição desses genes em isolados de *K. pneumoniae* obtidos a partir de amostras clínicas no Brasil.

De acordo com Jacoby *et al.* (2015), as variantes *QnrB* podem ter se originado a partir do cromossomo de espécimes de *Citrobacter freundii*. Esta inferência é reforçada pelo grande número de variantes inicialmente identificadas em isolados de *Citrobacter spp.*, uma vez que cerca dois terços de variantes *QnrB* já foram detectadas nessas bactérias, e muitas tinham origem cromossomal. Adicionalmente, foi constatado que os genes *QnrB* são mais comuns nas espécies de *Citrobacter* do que em outras bactérias Gram-negativas (Park *et al.*, 2007). Além disso, foram verificados elementos genéticos com capacidade de serem transferidos para plasmídeos.

O fato de detectar o gene *QnrB69* em isolados de *K. pneumoniae*, oriundo de um espécime de outro gênero bacteriano, identificado a partir de amostras fecais de aves, chama a atenção para a colonização do trato gastrointestinal de animais com bactérias resistentes aos antimicrobianos e com capacidade de transferência de

genes de resistência a outras bactérias que podem ter potencial patogênico. Tal colonização pode estar associada ao uso de antimicrobianos na agricultura, em humanos, na medicina veterinária, na criação de animais e até mesmo no descarte dos antimicrobianos no ambiente (Garcia-Alvarez *et al.*, 2012). No caso das aves, o hábito migratório pode também colaborar com a disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos (Guenter *et al.*, 2011)

O nível de resistência às quinolonas encontrado nas amostras fecais de aves analisadas por Havolá *et al.* (2014) foi elevado e considerado maior em relação a estudos similares realizados na Europa. Uma explicação possível para a colonização intestinal das aves por bactérias resistentes às quinolonas pode ter sido a exposição desses animais a bactérias resistentes oriundas dos seres humanos, bem como a própria contaminação ambiental.

O gene *AAC(6')-Ib-cr* foi inicialmente identificado por Robicsek *et al.* (2006) em espécimes de *Enterobacteriaceae* oriundas da China e Estados Unidos. A enzima *AAC(6')-Ib-cr* é uma variante da acetiltransferase codificada pelo gene *AAC(6')-Ib*, que confere resistência aos aminoglicosídeos. Esta variante possui duas substituições de aminoácidos: uma no códon 102 (Trp → Arg) e outra no códon 179 (Asp → Tyr). A presença destas mutações tem sido associada à redução da suscetibilidade a ciprofloxacina. Este mecanismo pode ser explicado pela N-acetilação com um grupo piperazinil do grupo amino deste antimicrobiano (Robicsek *et al.*, 2006).

A identificação do gene *AAC(6')-Ib-cr* tem sido observada por estudos como o realizado por Viana *et al.* (2013), que identificou uma frequência de 9,4% desses genes em isolados clínicos de pacientes no Brasil. Já Shams *et al.* (2015), detectaram esse gene em 70,1% dos espécimes de *K. pneumoniae* recuperados de amostras clínicas de pacientes hospitalizados no Irã. No estudo de Yugendran & Haris (2016) foi observado em amostras clínicas de pacientes de um hospital na Índia uma frequência de 64% do gene *AAC(6')-Ib-cr* em espécimes da família Enterobacteriaceae, na qual os isolados de *K. pneumoniae* contribuíram de forma importante. A frequência de identificação do gene *AAC(6')-Ib-cr* nesse estudo aponta para uma elevada prevalência do gene, sendo o primeiro relato de identificação na Região Norte.

No presente estudo foi detectado o gene *AAC-4*, uma variante do gene *AAC(6')-Ib* isolado a partir de espécimes de *K. pneumoniae*. Esse gene foi

inicialmente encontrado em isolados de *K. pneumoniae* recuperados de amostras de sangue de pacientes hospitalizados na China (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/762041888/> acessado em 12/04/2016). Apesar do estudo completo na China não ter sido publicado, poderá elucidar possíveis correlações dos genótipos com perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos. Esse é o primeiro relato de identificação de gen AAC-4 na Região Norte.

Nesse estudo foi verificado uma frequência importante de mutações no gene *GyrA* e gene *ParC*. No entanto, as mutações detectadas divergem dos dados da literatura que apontam mutações nos resíduos 83 e 87 das proteínas associadas ao gene *GyrA* e 80 e 84 ao gene *ParC*, como as mais frequentemente detectadas nesses genes (Minarini & Darini, 2012, Fu *et al.*, 2013, Marzooq *et al.*, 2014).

A partir do projeto de vigilância *Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology* foram analisados isolados de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenems, recuperados de amostras clínicas de pacientes hospitalizados na Carolina do Norte, Estados Unidos. Nesse isolados foram identificados o gene *bla* KPC-1, o qual apresenta uma região de codificante de 879 pares de base, que resulta em uma proteína de 293 aminoácidos. A proteína contém as sequências características de β -lactamases da classe A e homologia de 43% em relação a IMI-1 de *E. cloacae*, 44% a NMC-A de *E. cloacae* e de 45% a SME-1 de *S. marcescens*, sugerindo que a KPC-1 não é oriunda de um ancestral comum dessas outras β -lactamases (YIGIT *et al.*, 2001). Após a identificação de KPC-1 foi relatado a variante KPC-2 na Costa Leste dos Estados Unidos, que, posteriormente, foi observado se tratar da mesma enzima (Queenan & Bush, 2007),

Desde do primeiro relato feito por Yigit *et al.* em 2001 sobre a enzima KPC, investigações sucessivas foram realizadas acerca desse perfil de resistência (Canton *et al.*, 2012, Tzouveleki *et al.*, 2012, Andrade *et al.*, 2014). Atualmente, cerca de vinte e três variantes enzimáticas já foram descritas: de KPC-2 a KPC-24 (<http://www.lahey.org/studies/other.asp/#table1> acesso 14/01/2016). Dentre as variantes, a KPC-2 apresenta uma maior disseminação global (Cheng *et al.*, 2016).

No Brasil a KPC-2 se propagou rapidamente em diversos estados, sendo identificados surtos associados a uma elevada mortalidade de pacientes (Seki *et al.*, 2011, Pereira *et al.*, 2013, Falagas *et al.*, 2014, Gonçalves *et al.*, 2016.)

Nesse estudo os resultados das análises do sequenciamento dos produtos da PCR possibilitaram identificar nos isolados de *K. pneumoniae* 100% de genes *bla*

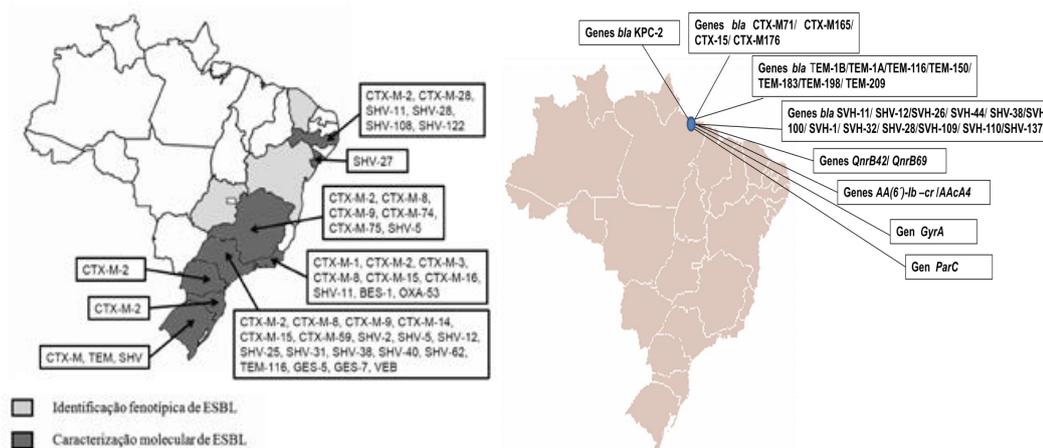
KPC-2 associados à codificação da enzima KPC-2. Essa é a primeira descrição do gene *bla* KPC-2 em isolados de *K. pneumoniae* obtidos de amostras de pacientes hospitalizados em Belém do Pará.

Estudos têm evidenciado em isolados produtores de KPC uma associação com diferentes genes de resistência a outros grupos de antimicrobianos como as cefalosporinas, quinolonas e aminoglicosídeos (Cheng *et al.*, 2016). Os dados do presente estão de acordo com esses achados.

Nos espécimes produtores de KPC observou-se que nos isolados KP95 foram detectadas as seguintes associações de genes: *bla* KPC-2/ *bla* CTXM-71/ *bla* SHV-11/ *bla* TEM-116/*Qnr42*/*GyrA*/*ParC*. No isolado KP 111 foram identificadas as seguintes associações: *bla* KPC-2/ *bla* CTXM-71/ *bla* SHV-137/ *Qnr42*/ *GyrA* /*ParC*. No espécime KP 115: genes *bla* KPC-2/ *bla* CTXM-71 / *bla* SHV-11 / *bla* TEM-116 /*Qnr42*/ *GyrA*/ *ParC*. No isolado KPx3: genes *bla* KPC-2/ *bla* CTXM-165/ *bla* TEM209/*GyrA*. Zang *et al.* (2011) relataram a coexistência dos gene *bla* KPC-2 com os genes *bla* TEM-1, *bla* SHV-12, *bla* CTX-M-14 e *QnrB2*. Cabral *et al.* 2012, descreveram associação entre os genes KPC-2 e *bla* CTXM-2. Foi verificado no estudo de Hou *et al.* (2015) uma associação significativa dos genes *bla* KPC-2, *bla* SHV-12, *bla* CTXM-9, *GyrA* e *QnrB4* nos isolados analisados. O perfil associativo de genes observado no presente estudo difere das referências apresentadas, e é o primeiro registro desse tipo de coexistência de genes de resistência a antimicrobianos encontrados no Brasil.

A presença simultânea de diferentes genes que codificam betalactamases em um mesmo isolado pode corresponder à presença de múltiplos plasmídeos, ou de integrons com múltiplos genes de betalactamases (Cantón *et al.*, 2012). A análise do contexto gênico não foi realizada nesse estudo, porém fica como perspectiva para futuras inferências.

As identificações de genes que conferem resistência bacteriana aos antimicrobianos nesse estudo, possibilitou evidenciar um cenário até então desconhecido sobre essa abordagem na cidade de Belém (PA), contribuindo com referências que irão compor informações sobre distribuições dos genes de resistência aos antimicrobianos na Região Norte do Brasil (Figura 44).



Figuras 44 - Ocorrência de ESBL em *Enterobacteriaceae* no Brasil e genes identificados no estudo.

Fonte: Silva & Lincopan, 2012; O autor.

A coexistência de diferentes genes que conferem resistência bacteriana leva à expressão de fenótipos multidroga resistentes (MDR), que repercutem na limitação de opções terapêuticas (Rossi, 2011). Este fato é observado nos isolados ESBL que frequentemente estão associados a multirresistência e comprometem a suscetibilidade às cefaloporinas, aumentando as indicações para o uso de carbapenens (Baran & Aksu, 2016). O uso de carbapenens, por conseguinte, eleva a pressão seletiva para a resistência a esses antimicrobianos, restringindo ainda mais as opções de fármacos para as infecções. No momento, a colistina está entre as principais opções terapêuticas para bactérias resistentes aos carbapenens, porém já há registros de isolados resistentes ao tratamento com colistina (Capone *et al.*, 2013). Tal perfil também é constatado em isolados produtores de KPC, que já apresentam registros de isolados resistentes à polimixina (Gaspar *et al.*, 2015).

No presente estudo, os perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos de isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL possibilitaram observar uma expressão de fenótipos MDR, uma vez que os isolados ESBL apresentaram resistência às cefalosporinas, quinolonas e aminoglicosídeos testados *in vitro*. Um perfil com espectro mais amplo de resistência aos fármacos foi verificado nos isolados produtores de KPC, que muito embora tenham apresentado um número amostral menor (4 isolado), isso não representa facilidades para o tratamento, uma vez que foi observado multirresistência aos antimicrobianos *in vitro*.

Quanto à correlação dos genes *bla* SHV, TEM e CTX-M dos isolados de *K. pneumoniae* com os perfis de resistência para amoxicilina/ácido clavulânico, alguns estudos demonstram um elevado percentual de resistência para esse antimicrobiano, como exemplo pode-se referir o estudo de Homabac *et al.* (2013), no qual foi observado uma frequência de 61,9% em espécimes de *K. pneumoniae* recuperadas de pacientes hospitalizados em Zurique. Os isolados com genes *bla* CTX-M e SHV apresentaram um percentual de resistência de 43,6% e 11,1%, respectivamente, não foi identificado o gene *bla* TEM. Viana *et al.* (2013), a partir de amostras clínicas analisadas em um hospital em Minas Gerais, relataram que 100% dos isolados de *K. pneumoniae* apresentaram resistência à amoxicilina/ ácido clavulânico, sendo que 90% dos espécimes apresentaram MIC > 64 mg/mL em isolados com os genes *bla* SHV, TEM e CTX-M. No estudo de Al-Qahtani *et al.* (2014), com espécimes de *K. pneumoniae* de amostras clínicas de pacientes hospitalizados em Riyadh, Arábia Saudita, foi notificado que em 100% dos espécimes de *K. pneumoniae* isolados com os genes *bla* SHV, TEM e CTX-M apresentaram resistência à amoxicilina/ácido clavulânico, sendo que a MIC mais frequente foi de > 256 µg/mL.

Nesse estudo foi observado um percentual de 63% de resistência para amoxicilina/ ácido clavulânico, sendo que a maior MIC para amoxicilina/ ácido clavulânico foi de 32µg/mL ($p < 0,05$) em 71,93% (41/57), 67,79% (40/59) e 66,67% (38/57) das amostras com os genes *bla* TEM, SHV e CTX-M, respectivamente. Esse achado está de acordo com os observados na literatura que tem evidenciado um aumento de isolados resistentes aos inibidores de betalactamases, como o ácido clavulânico. A resistência dos isolados de *K. pneumoniae* ao clavulonato também demonstra a ineficácia *in vitro* do fármaco contra ESBL. As ESBL tinham inicialmente pouca eficiência em degradar inibidores de betalactamase. O ácido clavulânico foi o primeiro inibidor de betalactamase utilizado em associação com beta-lactâmicos na prática clínica, demonstrando eficácia contra isolados de *E.coli* produtores de ESBL, e sendo posteriormente utilizado para infecções por outros agentes (Drawz & Bonomo, 2010)

Nessa perspectiva, ressalta-se que as ESBL são enzimas que não degradam cefamicinas, como a cefoxitina de modo eficiente (Rawat & Nair, 2010). Tal característica foi encontrada nesse estudo, que verificou uma menor tendência à resistência para esse fármaco. Por outro lado, a identificação de genes *bla* SHV,

TEM e CTX-M e a sua correlação com isolados de *K. pneumoniae* resistentes à cefoxitina com MIC 64 µg/LI e ≥ 256 µg/L, levantam inferências como a produção de enzimas AmpC, enzimas que apresentam eficiência para esse substrato, atuação de betalactamases codificadas por esses genes *bla* SHV, TEM e CTX-M com viabilidade para hidrolizar cefoxitina, e/ou perda de porina da membrana celular. A identificação de enzima AmpC e a perda de porina não foram analisadas nesse estudo. Tais investigações ficam como perspectiva para esclarecer a origem do perfil da resistência à cefoxitina observado.

As cefalosporinas são substratos para as betalactamases codificadas pelos genes *bla* SHV, TEM e CTX-M. A correlação da presença desses genes com o perfil de resistência às cefalosporinas evidencia a eficiência das enzimas betalactamases na degradação desses fármacos (Livemore, 2012). No presente estudo estudo foi constatado nos isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL um perfil de 100% de resistência a todas as cefalosporinas analisadas (cefalotina, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima), sugerindo alta eficiência da enzima para esses substratos. A correlação entre a presença dos genes *bla* SHV, TEM e CTX-M com a MIC para as cefalosporinas sugere uma eficiência qualitativa na atuação das enzimas codificadas por esses genes, uma vez que para as cefalosporinas de primeira a terceira geração houve detecção de valores estatisticamente significantes para MIC a partir de 32 µg/mL (100% para correlações dos genes *bla* SHV, TEM e CTX-M com MIC 32 µg/mL para cefalotina, acima de 90% com MIC 32 µg/mL para ceftriaxona, acima de 66% com MIC ≥ 256 µg/mL para cefotaxima, acima de 42% para ceftazidima com MIC 64 µg/mL). Para a cefepima, cefalosporina de quarta geração, houve detecção de resistência em dois valores significativos para MIC 12 µg/mL e ≥ 256 µg/mL, evidenciando níveis de eficiência distintos para o mesmo fármaco.

As altas taxas de resistência às cefalosporinas de terceira geração em isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL também foram encontradas no estudo de Flonta *et al.* (2011), que detectou 100% de resistência para esses antimicrobianos. No estudo de Kim *et al.* (2010), foi observado que 90% dos isolados de *K. pneumoniae* apresentaram resistentes à cefalosporinas, com MIC ≥ 64 µg/mL para cefotaxima, ceftazidima e cefepima. Foi verificado nos estudos de Silva-Sanches *et al.* (2011) que 90% dos isolados de *K. pneumoniae* apresentaram MIC de 64 µg/mL para cefotaxima e ≥ 256 µg/mL para ceftazidima, perfil que foi

associado à presença principalmente gene *bla* SHV. Viana *et al.* (2013) verificaram nos isolados de *K. pneumoniae* contendo os genes *bla* SHV, TEM e CTX-M 100% de resistência à cefotaxima com MIC \geq 64 μ g/mL, 100% de resistência à ceftazidima (com 60% dos isolados com MIC \geq 64 μ g/ml) e 100% de resistência a cefepima com MIC \geq 32 μ g/ml. Al-Qahtani (2014) detectou nos espécimes de *K. pneumoniae* os genes *bla* SHV, TEM e CTX-M, e observou que o perfil de resistência encontrado nesses isolados foi de 100% para cefotaxima e ceftazidima, com 100% das MICs acima de \geq 256 μ g/mL para cefotaxima e 87% acima de 64 μ g/mL para ceftazidima. Os estudos supracitados evidenciam uma alta performance das betalactamases codificadas pelos genes *bla* SHV, TEM e CTX-M em relação as cefalosporinas. Esses achados também foram observados no presente estudo.

Em relação à detecção de genes *Gyra*, *ParC*, *QnrB* e *AAC(6')-Ib*, envolvidos com a resistência às quinolonas nos isolados de *K.pneumoniae* produtores de ESBL, e sua correlação com os fenótipos de resistência a esses antimicrobianos, foi observado no presente estudo que para levofloxacina e ciprofloxacina a maior MIC foi 32 μ g/mL nos isolados de *K. pneumoniae* com esses genes. Já para norfloxacina e ácido nalidíxico a maior MIC foi de \geq 256 μ g/mL. Foram observados altos valores de MIC para quinolonas e com distribuição semelhante entre os genes *Gyra*, *ParC*, *QnrB* e *AAC(6')-Ib*. Adicionalmente, foram observadas um total de 86% de associações de genes nos isolados. A atuação isolada de um mecanismo de resistência às quinolonas nem sempre favorece a expressão de um fenótipo de resistência. Por outro lado, a atuação simultânea de vários mecanismos pode aumentar o nível de resistência às quinolonas (Rodríguez-Martínez *et al*, 2011). Sendo assim, a coexistência de genes relacionados à expressão de diferentes mecanismos de resistência às quinolonas está associada a menor suscetibilidade a esses tipos de antimicrobianos. Isso foi constatado no estudo de Viana *et al.* (2013), que detectou nos isolados de *K.pneumoniae* produtores de ESBL associações dos genes *Qnr*, *AAC (6') Ib-cr*, *GyrA* que repercutiram em resistência às quinolonas, com MICs elevadas para o ácido nalidíxico e ciprofloxacina (MIC>128 μ g/mL), norfloxacina (MIC 32 μ g/mL) e levofloxacina (MIC 64 μ g/mL).

Quanto às amostras clínicas de onde foram recuperados os espécimes de *K. pneumoniae* produtores de ESBL e KPC, pode-se verificar nesse estudo que a maiores frequências se encontraram para as amostras de urina (40,5%), de swab

retal (23%) e sangue (23%), e a menores freqüências para ponta de cateter (4,2%), secreção traqueal (2,7%), lavado brônquico alveolar (2,7%), fístula (1,3%), abscesso (1,3%) e ferida operatória (1,3%). Com exceção do swab retal, alguns estudos têm detectado isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtores de ESBL e KPC principalmente em amostras de urina, trato respiratório e sangue, e em menor escala em ponta de cateter, feridas e líquido cefalorraquidiano (Lago *et al.*, 2010, Capone *et al.*, 2012, Mosca *et al.*, 2013, Marchi *et al.*, 2014, Shams *et al.*, 2015, Mansury *et al.*, 2016, Oduro-Mensah *et al.*, 2016).

A detecção de isolados de *K. pneumoniae* a partir de swab retal evidencia uma situação de atenção, pois indica a colonização intestinal por esses espécimes, e isto pode favorecer sua disseminação no hospital, inter-hospital e para comunidade, haja vista que o paciente se torna um reservatório. Ultimamente, têm sido detectados isolados resistentes aos antimicrobianos na comunidade e existe uma forte associação dessa identificação com a alta de pacientes hospitalizados colonizados por bactérias resistentes aos antimicrobianos (Calbo & Garau, 2015). Há registros de pacientes que desenvolveram infecções, como infecções do trato urinário cujo perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi de resistência, pois foram acometidos por bactérias oriundas do ambiente hospitalar que os colonizaram e foram fontes de infecção (Minarine, *et al.*, 2007). É importante ressaltar que as bactérias que colonizam o intestino são os principais agentes etiológicos de infecção urinária, onde se destaca os bacilos da família *Enterobacteriaceae*, como *E.coli* e *K. pneumoniae* (Toubiana, *et al.*, 2016).

O conhecimento sobre os genes associados à resistência aos antimicrobianos e sua relação com perfis fenotípicos que influenciam na terapêutica dos pacientes, podem favorecer a elaboração de medidas de monitoramento, contribuindo para a diminuição de pressões seletivas para bactérias no ambiente hospitalar e promovendo uma sensibilização sobre o uso racional de antimicrobianos.

5. CONCLUSÃO

→ Nos espécimes de *K. pneumoniae* houve detecção através de testes fenotípicos da produção de ESBL e KPC, em 60% e 5% das amostras estudadas, respectivamente.

→ Foram detectados através das reações de PCR realizadas nos espécimes de *K. pneumoniae* produtores de ESBL uma frequência de 84% para o gen *bla* CTX-M, 87% para o gene *bla* SHV e 84% para o gen *bla* TEM. Para o gen *bla* KPC a frequência foi de 100%.

→ Os genes associados a produção de ESBL foram *bla* CTX-M -71, CTX-M -165, CTX-M -15, CTX-M -176, SHV- 12, SHV -38, SHV-100, e os associados a produção de KPC foi o *bla* KPC-2.

→ Destaca-se às associações de genes nas cepas produtoras de KPC e ESBL (KP95: *bla* KPC-2/ *bla* CTXM-71/ *bla* SHV-11/ *bla* TEM-116/*Qnr42*/*GyrA*/*ParC*; KP111: *bla* KPC-2/ *bla* CTXM-71/ *bla* SHV-137/ *Qnr42*/ *GyrA* /*ParC*; KP115: genes *bla* KPC-2/ *bla* CTXM-71 / *bla* SHV-11 / *bla* TEM-116 /*Qnr42*/ *GyrA*/ *ParC*; KPx3: genes *bla* KPC-2/ *bla* CTXM-165/ *bla* TEM209/*GyrA*). Estes perfis associativos diferem dos observados por outros autores, e trata-se do primeiro registro no Brasil.

→ Nos isolados *K. pneumoniae* produtores de ESBL foram detectados os genes *GyrA*, *ParC*, *QnrB*, *AAC(6')-Ib*, com presença simultânea de mais de um desses genes em um mesmo isolado. Tal associação foi correlacionada com o perfil de resistência às quinolonas observados nos espécimes estudados.

→ O presente estudo aponta também para a primeira descrição dos genes *bla* CTX- M-165, *bla* CTX-M-71, *bla* CTX- M-176, gene *QnrB42* e gene *QnrB69*, no Brasil.

→ Não foram identificados nos isolados *K. pneumoniae* produtores de ESBL e KPC os genes *QepA*, *ArmA* e *RmtB*.

→ A coexistência de diferentes genes de resistência bacteriana nos isolados *K. pneumoniae* produtores de ESBL e KPC favoreceu à expressão de fenótipos multidroga resistentes com elevados níveis de MIC para os antimicrobianos testados.

→ As amostras urina, de swab retal e sangue foram as mais representativas no isolamento dos espécimes estudados.

2723-2725, 2007.

ANDRADE, L.N., CURIAO, T., FERREIRA, J.C., LONGO, J.M., CLÍMACO, E.C., MARTINEZ, R., FERNANDO BELLISSIMO-RODRIGUES, F., BASILE-FILHO, A., EVARISTO, M.A., PELOSO, P.F.D., RIBEIRO, V.B., BARTH, A.L., PAULA, M.C., BAQUERO, F., CANTO 'N, R., DARINI, A.L.C., COQUE, T.M. Dissemination of *blaKPC-2* by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* Species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **55** (7): 3579–3583, 2011.

ANDRADE LN, VITALI L, GASPAR GG, BELLISSIMO-RODRIGUES F, MARTINEZ R, DARINI AL. Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. **Journal of Clinical Microbiology** **52**(7):2530–2535, 2014.

AUSTRIAN, B. Concerning Friedländer, Gram and the etiology of lobar pneumonia, an historical note. **Bacteriological Review** **24**: 261-265 ,1960.

AMBLER, R.P. The structure of β -lactamases. Philosophical Transactions of the Royal Society B: **Biological Sciences** **289**: 321-331, 1980.

AYRES, M., AYRES JUNIOR, M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. **Bio Estat 5.0, Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Bio-Médicas**. Belém-Pará, Mamirauá, 2007.138p.

BARAN, I.; AKSU, N. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Turkey. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 15(1), 2016.

BARBER, J.M. & GRANT, A.P. Friedländer 's pneumonia a report on six cases. **British Medical Journal** **2**: 752-755,1952.

BECEIRO, A, TOMÁS, M, BOU, G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? **Clinical Microbiology Reviews** **26**(2): 185–23, 2015.

BLAIR, J.A.M, WEBBER, M.A, BAYLAY, A.J, OGBOLU, D.A, PIDDOCK, L, J.V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology** **13**, 42–51, 2015.

BOLON, M.K. The newer fluoroquinolones. *Medical Clinics of North America*, 95(4):793- 817, 2011.Lee MK & Kanatani MS. Quinolones: which generation for which microbe? **Western Journal of Medicine** **170**(6):359-61, 1999.

- BRADFORD, P. Extend-spectrum β -lactamases in the 21st Century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance treat. **Clinical Microbiology Reviews** **14**: 933-951, 2001.
- BRATU, S., LANDMAN, D., ALAM, M., TOLENTINO, E., QUALE, J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter spp.* From Brooklyn, New York. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **49**: 776-778, 2005.
- BRIGANTE, G., LUZZARO, F., PERELLI, M., LOMBARDI, G., COLI, A., ROSSOLINI, G., AMICOSANTE, G., TONIOLO, G. Evolution of CTX-M-type β -lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. **International Journal of Antimicrobial Agents** **25**: 157-162, 2005.
- BRISSE, S., GRIMONTAND, F., GRIMONT, P. The Genus *Klebsiella*. In : **The Prokaryotes**. DWORKIN, M, FALKOW, S, ROSENBERG, E, SCHLEIFER, K, STACKEBRANDT, E (Eds). Springer, 2006. P.159-196.
- BRISSE, S., FEVRE, C., PASSET, V., ISSENHUTH- JEANJEAN, S., GRIMONT, P., TOURNEBIZE, R., DIANCOURT, L., P. Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. **PLoS ONE** **4**: 1-13, 2009.
- BRUN-BUISSON, C., LEGRAND, P., PHILIPPON, A., F. MONTRAVERS, M. ANSQUER, DUVAL, J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. **The Lancet** **2**: 302–306, 1987.
- BUENO, M.F.C., FRANCISCO, G.R. , O'HARA, J.A., ARCIA, D.O., YOHEI D.O.I. Coproduction of 16S rRNA Methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M Group Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **57** (5): 2397–2400, 2013.
- BULLOWA J.G.M, CHESS J., FRIDMAN N.B. Pneumonia due to *B. Friedländer*: report of 41 patients. **Archives Internal Medicine** **60**: 735, 1937.
- BUSH, K., JACOBY, G.A., MEDEIROS, A.A . A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **39**: 1211-1233, 1995.
- BUSH, K & JACOBY G,A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **54** (3): 969-976, 2010.
- CABRAL, A.B, MELO, R.C.A, MACIEL, M.A.V .M, LOPES, A.C.S. Multidrug resistance genes, including *bla* KPC and *bla* CTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **45**(5): 572-578, 2012.

- CALBO, E & GARAU, J. The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation . **Future Microbiology** **10** (6): 1063–1075, 2015.
- CANTON R, AKOVA M, CARMELI Y, GISKE CG, GLUPCZYNSKI Y, GNIADKOWSKI M, LIVERMORE DM, MIRIAGOU V, NAAS T, ROSSOLINI GM, SAMUELSEN, Ø, SEIFERT H, WOODFORD N, NORDMANN P. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. **Clinical Microbiology and Infection** **18** (5):413–431, 2012.
- CANTON, R, GONZÁLEZ-ALBA , J.M, GALÁN, J.C. CTX-M enzymes: origin and diffusion. **Frontiers and Microbiology** **3** :1-19, 2012.
- CAPONE, A.; GIANNELLA, M.; FORTINI, D.; MELENDRI, M.; BALLARDINI, M.; VENDITTI,M.; BORDI, E.; CAPOZZI, D.; BALICE, M.P.; TARASI, A.; PARISI, G.;LAPPA,A.;CARATTOLI, A.; PETROSILLO, N. High rate of colistin resistance among patientswith carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniaei* nfection accounts for an excess of mortality. **Clinical Microbiology and Infection** **19**,. 23–30, 2013.
- CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC); Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013.
- CERQUEIRA, S.A., MACHADO, P., MARTO, J., LITO, S., MELO-CRISTINO, J., DUARTE, A. Persistência de *Klebsiella pneumoniae* em doentes de unidades pediátricas do hospital de Santa Maria, em Lisboa. **Acta Pediátrica Portuguesa** **42**: 49-53, 2011.
- CHANDE, C, MAKHIJA, S., LILANI, S., SHIRPURKAR, R., VEER, P., CHIVATI, A., PATEKAR, P., JOSHI, A. Omission of extended spectrum β lactamases detection: Are the new Clinical Laboratory Standards Institute guidelines misleading?. **Indian Journal of Medical Microbiology** **29**: 443-444, 2011.
- CHANG, M.R., BIBERG, C.A., LOPES, F.A, TETILA, A.F., PIGNATAR, A.C.C.The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the *bla*kpc gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **1** (46):114-115, 2013.
- CHÁVEZ-JACOBO, V.M, RAMÍREZ-DÍAZ, M.I, SILVA-SÁNCHEZ, J, CERVANTES, C. Resistencia bacteriana a quinolonas: determinantes codificados en plásmidos. **REB** **34** (1): 4-9, 2015.
- CHENG, L,CAO, X-L, ZHANG, Z-F, NING, M-Z, XU, X-L, ZHOU, W, CHEN, J-H,ZHANG, J-H,SHEN, H, ZHANG, K. Clonal dissemination of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone with high prevalence of *oqxAB* and *rmtB* in a tertiary hospital in China: results from a 3-year period. **Annal of**

Clinical Microbiology and Antimicrobials 15(1):1-8, 2016.

- CHUNG THE, H, KARKEY, A, THANH, D.P, BOINETT, C.J, CAIN, A.K, ELLINGTON, M, BAKER, K.S, DONGOL, S, THOMPSON, C, HARRIS, S.R, JOMBART, T, PHUONG, T.L.T, HOANG, N.T.B, THANH, T.H, SHRETHA, S, JOSHI, S, BASNYAT, B, THWAITES, G THOMSON, N.R, RABAA, M.A, BAKER, S. A high-resolution genomic analysis of multidrug-resistant hospital outbreaks of *Klebsiella pneumoniae*. **EMBO Molecular Medicine 7**: 227–239, 2015.
- CLIMACO, E.C, MINARINI, L.A, DA COSTA DARINI, A.L. CTX-M-producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years? **Diagnostic microbiology and infectious disease 68 (2)**:186-189, 2010.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Document for Antimicrobial Susceptibility testing informational supplement document M100S15**. CLSI- Pennsylvania, USA. 2009.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Document for Antimicrobial Susceptibility testing informational supplement document M100S15**. CLSI- Pennsylvania, USA. 2010.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Document for Antimicrobial Susceptibility testing informational supplement document M100S15**. CLSI- Pennsylvania, USA. 2012.
- CHANAWONG, A; M'ZALI, F.H; HERITAGE, J; LULITANOND, A; HAWKEY, P.M. Discrimination of SHV β -lactamase genes by restriction site insertion-PCR. **Antimicrobial agents and Chemotherapy 45**: 2110-2114, 2001.
- COLODNER, R., ROCK W., CHAZAN B., KELLER, N., GUY, N., SAKRAN, W., RAZ, R. Risk factors for the development of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 23**: 163-167, 2004.
- COQUE, M., BAQUERO, F. CANTON, R.F. Increase prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. **Eurosurveillance 13**:1-11, 2008.
- CERGOLE-NOVELLA, M.C, GUTH, B.E, CASTANHEIRA M, CARMO, M.S, PIGNATARI A.C. First description of bla(CTX-M-14)- and bla(CTX-M-15)-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **Microbial Drug Resistance 16 (3)**:177-184, 2010.
- DAVIES, J & DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Review 74 (3)**: 417–433, 2010.

- DAHMEN,S., BETTAIEB, D., MANSOUR, W., BOUJAAFAR, N., BOULLE' GUEO., ARLET, G. Characterization and Molecular Epidemiology of Extended- Spectrum b – Lactamases in Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* in a Tunisian University Hospital. **Microbial Drug Resistance** **16**: 163-170, 2010.
- DENG, Y, BAO, X, JI, L, CHEN, L, LIU, J, MIAO, J, CHEN, D, BIAN, H, LI, Y, YU, G. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. **Annals of Clinical Microbiology Antimicrobials** **14** (45):1-11, 2015.
- DERAKHSHAN, S, PEERAYEH, S.N., BAKHSHI, B. Association Between Presence of Virulence Genes and Antibiotic Resistance in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates. **Laboratory Medicine** , 1-6, 2016.
- DECRÉ, D, BURGHOFFER, B, GAUTIER, V, PETIT1,J- CAND, GUILLAUME, A.Outbreak of multi-resistant *Klebsiella oxytoca* involving strains with extended-spectrum b-lactamases and strains with extended-spectrum activity of the chromosomal b-lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** **54**: 881–888, 2004.
- DOI, Y, WACHINO, J-I, ARAKAWA,Y. Aminoglycoside Resistance:The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. **Infectious Disease Clinics of North America** **30**:30523–30537, 2016.
- DIENSTMANN, R., ULRICH PICOLI, S., MEYER, G., SCHENKEL , T . , STEYER , J. Phenotypic research on *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) enzyme in *Enterobacteriaceae* from hospitals. **Jornal Brasileiro de Patologia Laboratorial** **46** (1): 23-27, 2010.
- DHILLON, R.H.P & CLARK, J. ESBLs: A Clear and Present Danger?. **Critical Care Research an Practice**, 1-11, 2012.
- DRAWZ , S.M. & BONOMO, R.A. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews** **23** (1): 160-201, 2010.
- DROPA, M. **Disseminação da resistência a antimicrobianos em cepas clínicas e ambientais de *Enterobacteriaceae*: identificação e mapeamento do ambiente genético de genes codificadores de ESBL.** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, 2012, 38-40 P.
- EFTEKHA, F & SEYEDPOUR, A.M. Prevalence of *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* Genes in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Imam Hussein Hospital in Tehran. **Iran Journal of Medical Science** **40** (6): 515–521, 2015.

- EL - JAD, M.R, PARCINA, M , SCHMITHAUSEN, R.M, STEIN, C, MEILAENDER, A, HOERAU, A, MOLITOR, E, BEKEREDJIAN-DING, I. ESBL Detection: Comparison of a Commercially Available Chromogenic Test for Third Generation Cephalosporine Resistance and Automated Susceptibility Testing in Enterobacteriaceae. **Open Access Journal** 11 (8): 1-13, 2016.
- EL FERTAS-AISSANI , R, MESSAI, Y,BALOUACHE, S,BAKOUR R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. **Pathologie Biologie** 61(5):209-216, 2013.
- ELHANI, D, BAKIR, L, AOUNI, M. The changing epidemiology of extended-spectrum β -lactamases –producing *Klebsiella pneumoniae*. **Annales de Biologie Clinique** 69 (5):523-529, 2011.
- FALAGAS, M.E, TANSARLI, G.S, DROSOS E. KARAGEORGOPOULOS,D.E Z. VARDAKAS, K.Z. Deaths Attributable to Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. **Emerging Infectious Diseases** 20 (7): 1170-1175, 2014.
- FEHLBERG, L. C, CARVALHO AM, CAMPANA EH, GONTIJO-FILHO PP, GALES AC. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraiba, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Disease** 16(6) 577-80, 2012.
- FERNANDES, R, AMADOR, P, PRUDÊNCIO, C. b-Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. **Reviews in Medical Microbiology**, 24:7–17, 2013.
- FLONTA, M, LUPȘE, CORNELIA, CRĂCIUNAȘ, M ALMAȘ, M.A, CÂRSTINA, D. Ertapenem Resistance Among Extended-Spectrum-B- Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates. **Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology**, 2:121-125, 2011.
- FRASSON, I, CAVALLARO, A, BERGO ,C, RICHTER, S, PALÙ, G. Prevalence of *aac(6')-Ib-cr* plasmid-mediated and chromosome-encoded fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae* in Italy. **Gut Pathogens** 3 (12): 1-5, 2011.
- FLUIT, A.D.C. MAARTEN, R.V., FRANZ-JOSEF, S. Molecular detecion of antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 14: 836-871, 2001.
- FREITAS, A.L.P., MACHADO, D.P., SOARES, F.S.C., BARTH, A.L. Extended spectrum β -lactamases in *Klebsiella spp* and *Escherichia coli* obtained in Brazilian teaching Hospital: detection, prevalence and molecular typing. **Brazilian Journal of Microbiology**, 34:344-348, 2003.

- FUNKE, G. & FUNJE- KISSLING, P. Evaluation of the New VITEK 2 Card for Identification of Clinically Relevant Gram-Negative Rods. **Journal of Clinical Microbiology**, 42: 4067–4071, 2004.
- FU, Y , ZHANG, W , WANG, H, ZHAO, S, CHEN, Y , MENG, F, ZHAN, Y, XU, H , CHEN, X , ZHANG, F. FU. Specific patterns of gyrA mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and Escherichia coli. **BMC Infectious Diseases** 13 (8): 1-6, 2013.
- GARCIA-ALVAREZ L, DAWSON S, COOKSON B, HAWKEY P. Working across the veterinary and human health sectors. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 67(1):37-49, 2012.
- GASPAR, G.G.; BELLISSIMO-RODRIGUES, F. ANDRADE, L.N.D.; DARINI, A.L.;MARTINEZ, R. Induction and nosocomial dissemination of carbapenem and polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 48, 483-487, 2015.
- GILLINGS, M.R. Integrons: Past, Present, and Future. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 257–277, 2014.
- GIROMETTI, N, LEWIS, R.E, GIANNELLA, M, AMBRETTI, S, BARTOLETT, M, TEDESCHI, S, TUMIETTO, F, CRISTINI, F, TRAPANI, F, GAIBAN, P , VIALE, P. *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infection. **Medicine (Baltimore)** 93 (17): 298-309, 2014.
- GISKE,C.G, MONNET, D.L, CARS, O, CARMELI, Y. Clinical and economic impact of common multidrug - resistant Gram-negative bacilli. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 52: 813- 821, 2008.
- GISKE, C.G ., Sundsfjord , A.S., Kahlmeter, G., Woodford,N., NORDMANN, P., Paterson ,D.L., Cantón,R., Walsh ,T. Redefining extended -spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 63: 1-4, 2009.
- GONÇALVE, I.R, FERREIRA, M.L, ARAUJO, B.F , CAMPOS, P.A , ROYER , BATISTÃO, D.W.F, S, SOUZA , L.P, BRITO , C.S, URZEDO, J.E GONTIJO-FILHO, P.P,RIBAS, R.M. Dissemination of colistin-resistant and colistin-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in the course of two consecutive outbreaks in a Brazilian intensive care. **Journal of Hospital Infection**,1-18, 2016.
- GROHMANN , E, MUTH , G, L ESPINOSA , M. Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, 277–301, 2003.

- GRUPTA, A., DELLA-LATTA, P., TODD, B., SAN GABRIEL, P., HAAS, J., WU, F., RUBENSTEIN, D., SAIMAN, L. Outbreak of Extended-Spectrum Beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit linked to artificial nails. **Infection Control and Hospital Epidemiology** **25**: 210-215, 2004.
- GRUPTA, N , LIMBAGO, B.M., PATEL , J.P. KALLEN, A.J. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and Prevention. **Clinical Infectious Diseases** **53**: 60-67, 2011.
- GROVER , C.N, SAHNI, B.A.K., BHATTACHARYA, C.S. Therapeutic challenges of ESBLs and AmpC beta-lactamase producers in a tertiary care center. **Medial Journal Armed Forces India** **69**: 4-10, 2013.
- GUENTHER S, EWERS C, WIELER LH. 2011. Extended-spectrum betalactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? **Frontiers in Microbiology** **2** (246) :1-13, 2011.
- GUILLARD, T, CHAMPS, C, MORET, H, BERTRAND, X, SCHEFTEL, J-M, CAMBAU, E. High-resolution melting analysis for rapid characterization of qnr alleles in clinical isolates and detection of two novel alleles, qnrB25 and qnrB42. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 67: 2635–2639 , 2012.
- GYLES, C & BOERLIN. Horizontally Transferred Genetic Elements and Their Role in Pathogenesis of Bacterial Disease. **Veterinary Pathology** **51** (2)328-340, 2014.
- HALOVÁ, D ,PAPOUSEK, I,JAMBOROVA, I,MASARIKOVA ,M,CIZEK, A,JANECKO, N,ORAVCOVA, V,ZUREK, L,CLARK, A.B,TOWNSEND, A,ELLIS, J.C,LITERAK, I.Plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Enterobacteriaceae* from American crows: high prevalence of bacteria with variable qnrB genes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** **58** (2):1257-1258, 2014.
- HARRIS, P.N.A. Clinical Management of Infections Caused by *Enterobacteriaceae* that Express Extended Spectrum β -Lactamase and AmpC Enzymes. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, 36:56–73, 2015.
- HASSAN, M .I., ALKHARSAH, K.R ., ALZHRANI, A.J., OBEID, O.E, AMAR, H., KHAMIS, DIAB, A. Detection of extended spectrum beta-lactamases-producing isolates and effect of AmpC overlapping. **The Journal of Infection in Developing Countries** **7**(8): 618-629, 2013.
- HAY,H.R. A study of *Bacillus mucosus* capsulatus Group. **Journal of Hygiene** **32**: 240- 257, 1932.
- HENDRIK, T.C, VOOR IN 'T HOLT, A F,. VOS, C.M. Clinical and Molecular

Epidemiology of Extended- Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella* spp.: A Systematic Review and Meta-Analyses. **Open Access Journal** 10 (10):1-23, 2015.

HOMBACH, M, MOUTTE, B, BLOEMBERG, G.V. Consequences of revised CLSI and EUCAST guidelines for antibiotic susceptibility patterns of ESBL- and AmpC β -lactamase-producing clinical Enterobacteriaceae isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 68: 2092–2098, 2013.

HOLMES, B. Friedländer's pneumonia . **American Journal of Roentgenology, Radium Therapy, and Nuclear Medicine**, 75: 728- 747, 1956.

HOU, X-H, SONG, X-Y, MA, X-B, ZHANG, S-Y, ZHANG, J-G. Molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, 46 (3) 759-768, 2015.

<https://www.lahey.org/studies/other.asp> acessado em 28/05/2016

<http://www.lahey.org/qnrstudies/>. Acessado em 18/05/2016.

<http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/12>. Acessado em 20/05/2016.

HUMENIUK, C., ARLET, G., GAUTIER, V., GRIMONT, P., LABIA, R., PHILIPPON, A., β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 46: 3045- 3049, 2002.

JACOBY GA, GRIFFIN CM, HOOPER DC. *Citrobacter* spp. as a source of *qnrB* Alleles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 55(11):4979-84, 2011.

JACOBY, G.A, STRAHILEVITZ, J, HOOPER, D.C. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Microbiology Spectrum** 2(5):1-24, 2015.

JACOBY, G. A. AmpC β -lactamases. **Clinical Microbiology Review** 22:161-182, 2009.

JACOBY, G.A., BUSH, K. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 54:969-976, 2010.

JEMIMA, S.A. & VERGHESE, S. Multiplex PCR for in the extend spectrum beta lactamse (ESBL) producing Gram - negative isolates. **Indian Journal of Medical Research** 128: 313-317, 2008.

- JONES, R.N., GUZMAN-BLANCO, M., GALES, A.C, GALLEGOSB, B., CASTROD,A.L.L., MARTINOE,M.D.V., VEGAF, S. ZURITAG, J., CEPPARULOH, M., CASTANHEIRA, M. Susceptibility rates in Latin American nations: report from aregional resistance surveillence program (2011). **The Brazilian Journal of infectious Diseases 6** (17): 672–681, 2013.
- KIM, M.H, LEE, H.J, PARK, K.S, SUH, J.T.Molecular Characteristics of Extended Spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and the Prevalence of *qnr* in Extended Spectrum β -Lactamase Isolates in a Tertiary Care Hospital in Korea.**Yonsei Medical Journal 51**(5): 768–774, 2010.
- KNOTHE, H., SHAH P., KRCMERY, V., ANTAL,. M., MITSUHASHIM, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Clinical Infectious Diseases 11**: 315-317, 1983.
- KRAHN,T , GILMOUR, C, TILAK, J FRAUD, S, KERR, N , LAU, C.H.F, POOLE, K.Determinants of Intrinsic Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy 56** (11): 5591–5602, 2012.
- LADDOMADA, F, MIYACHIRO, M.M, DESSEN, A. Structural Insights into Protein-Protein Interactions Involved in Bacterial Cell Wall Biogenesis. **Antibiotics (Basel) 5** (2): 1-14, 2016.
- LAGO, A, FUENTEFRIA, S.R, FUENTEFRIA, D.B. ESBL-producing enterobacteria in Passo Fundo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 43** (4):430-434, 2010.
- LAVIGNE J.P., BOUZIGES, N., CHANAL, C., MAHAMAT, A., MICHAUX CHARACHON, S., SOTTO, A., Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* Isolate producing extend-spectrum β -lactamases in a French Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, 42: 3805-3808, 2004.
- LAVILLA, S., GONZA´LEZ-LO´PEZ, J.J., SABATE, M.,A. , GARCI´A-FERNA´NDEZ, A., LARROSA, M.N., BARTOLOME, R.M., CARATTOLI,A., PRATS, G. Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 61: 291– 295, 2008.
- LAKSHMI, R., NUSRIN, K.S., SHARON ANN, G., SREELAKSHMI, K.S. Role of Betalactamases in antibiotic resistance. **International Research Journal of Farmacy 2**(5):1-14, 2014.
- LE, J., CASTANHEIRA, M., BURGESS, D.S, MCKEE, B., IQBAL, R., JONES, R.N.Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase KPC-3 in

- Long Beach, California. **Journal of Clinical Microbiology** 48: 623-625, 2010.
- LEE, C-R LEE, J.H, PARK, K.S KIM, Y.B , JEONG, B.C, LEE, S.H. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. **Frontiers in Microbiology**,7: 895, 1-30, 2016.
- LEE, IR, MOLTON, J. S, WYRES, K.L, GORRIE, C, WONG, JHAN HOH, C1, TEO, J, KALIMUDDI, S7, LYE, D.C, ARCHULETA, SHOLT, K.E , GAN, Y-H. Differential host susceptibility and bacterial virulence factors driving *Klebsiella* liver abscess in an ethnically diverse population. **Scientific Reports**,1-12, 2016.
- LEFLON-GUIBOUT , V, HEYM, B, NICOLAS-CHANOINE, M. H. Updated sequence information and proposed nomenclature for *bla*(TEM) genes and their promoters. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** 44 (11): 3232–3234, 2000.
- LERY, L.M.S , FRANGEUL, L,TOMAS, A, PASSET, V ALMEIDA, A.S,BIALEK-DAVENET, S,BARBE, V, BENGOCHEA, J.A, SANSONETTI, P, BRISSE, S, TOURNEBIZE, R. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D Family protein as a novel virulence factor. **BMC Biology** , 12:41, 2014.
- LI , B, ZHAO, Y, LIU, C, CHEN , Z, ZHOU, D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. **Future Microbiology** 9 (9):1071-1081, 2014.
- LIAKOPOULOS , A, MEVIUS, D, CECCARELLI, D. A Review of SHV Extended-Spectrum β Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. **Frontiers in Microbiology**, 7:1-13, 2016.
- LIMA, K.V.B., CARVALHO, R.G.C, CARNEIRO, I.C.R, LIMA, J.L.S., SOUSA, C.O., LOUREIRO, E.C.B., SÁ, L.L.C, BASTOS, F.C. Outbreak of neonatal infection by endemic clone of *Serratia marcescens*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44: 106-109, 2011.
- LIMSON B.M, ROMANSKY, M.J., SHEA J.G. An evaluation of twenty-two patients with acute and chronic pulmonary infection with Friedländer's bacillus. **Annals of Internal Medicine**, 44:1078-1081, 1956.
- LIN, Y.T . , LIU, C.J., YEH, Y.C., CHEN T.J., FUNG, C.P . Ampicillin and amoxicillin use and the risk of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Taiwan. **The Journal of Infectious Diseases**, 208: 211–217, 2013.
- LIVERMORE, D. M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Review** 8 (4): 557-584, 1995.

- LIVERMORE, D.M., CABTON, R., GNIADKOWSKI, M., NORDMANN, P., ROSSOLINI, G.M., ARLET, G., AYALA, J., COQUE, T.M., KERN-ZDANOWICZ, I., LUZZARO, F., POIREL, L., WOODFORD, N. CTX-M: changing the face of ESBL in Europe. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy** **59**: 167-174, 2007.
- LIVERMORE, D.M. Fourteen years in resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents** **39**: 283– 294, 2012
- LOPES AC, VERAS DL, LIMA AM, MELO RDE C, AYALA J. *bla*CTX-M-2 and *bla*CTX-M-28 extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **105** (2):163-167, 2010.
- LÓPEZ VARGAS , J.A & ECHEVERRI TORO, L.M.E. *K. pneumoniae*: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de Resistencia. **IATREIA** **23**:157-165, 2010.
- LUPO, A, COYNE, S BERENDONK, T.U. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. **Frontiers in Microbiology** **3** (18):1-13, 2012.
- MA, L, LIN, C.J CHEN, J.H , FUNG, C.P., CHANG, F.Y. , LAI, Y.K, LIN, J.C. , SIU, L.K. Widespread Dissemination of Aminoglycoside Resistance Genes *armA* and *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Taiwan Producing CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **56** (1):104–111, 2009.
- MAGALHÃES, V.D, FERREIRA, J.C., BARELLI, C., DARINI, A.L. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia-uma revisão técnica. **Revista Instituto Adolfo Lutz** **64**: 155-161, 2005.
- MANOJKUMAR SINGH, R., LOKHENDRO SINGH, H. Comparative evaluation of six phenotypic methods for detecting extended-spectrum beta- lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **The Journal of Infection in Developing Countries** **8** (4): 408-415, 2014.
- MANSURY, D MOTAMEDIFAR, M SARVARI¹, J, SHIRAZI, B, KHALEDI, A. Antibiotic susceptibility pattern and identification of extended spectrum β -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Shiraz, Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, **8** :55-61, 2016.
- MARCHI, S, GIOVANELLI, I, GARGIULO, R, NOZZI, D, BAROZZI, A, SARTI, M, ISEPPI, R, IMMACOLATA ANACARSO, I, SABIA, C. Identification and Characterization of KPC-Producing *Klebsiella Pneumoniae* in Clinical Isolates. **Universal Journal of Microbiology Research** **2** (3): 45-49, 2014.

- MARTINEZ, J., MARTINEZ,L., ROSENBLUETH, M., SILVA, J., MARTINEZ-ROMERO, E. How Are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy ? The case of *Klebsiella*. **International Microbiology 7**: 261-268, 2004.
- MARZOOQ,F-A, YUSOF, M.Y.M, TEE TAY, S. Molecular Analysis of Ciprofloxacin Resistance Mechanisms in Malaysian ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Development of Mismatch Amplification Mutation Assays (MAMA) for Rapid Detection of *gyrA* and *parC* Mutations. **BioMedcal Researcher International**, 1-10, 2014.
- MELEGH , S, SCHNEIDER, G, HORVÁTH, M, JAKAB , F³, EMÓDY, L, TIGYI, Z. Identification and characterization of CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* clone ST101 in a Hungarian university teaching hospital. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 62** (3):233-45, 2016.
- MEYER, G., PICOLI, S.U. Fenótipo de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial 47**: 25-31, 2011.
- MILLÁN, B., CASTRO, D., MARÍA ARAQUE, M., GHIGLIONE, B., GUTKIND, G. ISCR1 asociado con genes *bla*CTX-M-1 y *bla*CTX-M-2 en plásmidos IncN e IncFIIA aislados en *Klebsiella pneumoniae* de origen hospitalario en Mérida, Venezuela. **Biomédica**, 33: 268-275, 2013.
- MINARINI,L.A.R., GALES,A.C., PALZZO, I.C.V.P., DARINI, A.L. Prevalence of community-occurring Extended Spectrum β -lactamases-Producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Current Microbiology**, 54: 335-341, 2007.
- MINARINI,L.A.R., CLIMACO, E.C., GUIMARÃES, D.B., FERREIRA, J.C., PALZZO, I.C.V.P. Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella spp.* At a University Hospital in Brazil. **Current Microbiology**, 56: 587-591, 2008.
- MINARINI, L.A.R & DARINI, A.L.C. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in *Enterobacteriaceae* isolates from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiolgy 43** (4): 1309–1314, 2012.
- MOBARAK- QAMSARI, M., ASHAYERI- PANAH, M., EFTEKHAR, F. FEIZABADIINTEGRON, M.M. Mediated multidrug resistance in extended spectrum beta-lactamase producing clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Brazilian Journal of Microbiology 44** (3): 849-854, 2013.
- MONTEIRO, J, SANTOS A.F, ASENSI M.D, PEIRANO G, GALES A.C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy 53** (1): 333-334, 2009.
- MOOD, E.H, IZAD, Z.M.N, REZAEI, M, JAMEHDA, S.A, NASAB, M.N.Prevalence of

Quinolone Resistance Genes Among Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Mashhad, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology** 8 (12):1-5, 2015.

MORRISSEY, I., BOUCHILLON, S.K., HACKEL, M., BIEDENBACH, D.J., HAWSER, S., HOBAN, D., BADAL, R.E. Evaluation of the Clinical and Laboratory Standards Institute phenotypic confirmatory test to detect the presence of extended-spectrum β -lactamases from 4005 *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates. **Journal of Medical Microbiology** 63 (4):556-61, 2014.

MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S., PFALLER, A. In: **Antibacterial Agents**. Medical Microbiology, 6th edition. MOSBY, 2009. P.199-208.

MOSCA, A., MIRAGLIOTTA, L, DEL PRETE, R, TZAKIS, G, DALFINO, L, BRUNO, F, PAGANI, L, MIGLIAVACCA, R, PIAZZA, A, MIRAGLIOTTA, G. Rapid and sensitive detection of blaKPC gene in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* by a molecular real-time assay. **SpringerPlus**, 2:1-5, 2013.

MUÑOZ-LÓPEZ, M & GARCÍA-PÉREZ, J.L. DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. **Current Genomics** 11(2): 115–128, 2010.

NAAS, T., CUZON, G, VILLEGAS, M.V., LARTIGUE, M.F., QUINN, J.P, NORDMANN, P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 63:1256-1263, 2008.

NAAS, T., CUZON, G.B., BOGAERTS, P., GLUPCZYNSKI, Y., NORDMANN, P. Evaluation of a DNA Microarray (Check-MDR CT102) for Rapid Detection of TEM, SHV, and CTX-M Extended-Spectrum Beta-Lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM-1 Carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology** 49: 1608–1613, 2011.

NEVES, P.R., MAMIZUKA, E.M, LEVY, C.E, LINCOPAN, N. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an endemic problem in Brazil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 47 (4) : 409-420, 2011.

NOGUEIRA, K.S. **Prevalência e caracterização molecular de beta-lactamases de espectro esbl em enterobactérias isoladas no hospital de clínicas de Curitiba**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2011. P- 80.

NORDMANN, P., NAAS, T., POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases** 17:1791-1798, 2011.

- NÜESCH-INDERBINEN, M.T, KAYSER, F.H, HÄCHLER, H. Survey and Molecular Genetics of SHV β -Lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: Two Novel Enzymes, SHV-11 and SHV-12. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **41** (5): 943–949, 1997.
- ODURO-MENSAH, D, OBENG-NKRUMAH, N, YAYRA BONNEY, E, TWUM-DANSO, K, YAA DIFIE, O, TAWIAH SACKY, S. Genetic characterization of TEM- type ESBL-associated antibacterial resistance in *Enterobacteriaceae* in a tertiary hospital in Ghana. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 15:1-29, 2016.
- O' HARA, C. Manual and Automated Instrumentation for Identification of *Enterobacteriaceae* and Other Aerobic Gram-Negative *Bacilli*. **Clinical Microbiology Reviews** **18**: 147–162, 2005.
- ØRSKOV, I. 1984 : Bergey's manual of systematic bacteriology. **In: Genus *Klebsiella***. N. R. KRIEG & J. G. HOLT (eds). The Williams & Wilkins Co., 1984. P.475- 481.
- OPLUSTIL, C.P., ZOCCOLI, C.M., TOBOUTI, N.R., SINTO, S.I. **Procedimentos Básicos em microbiologia clínica**. São Paulo, Sarvier, 2010. 221 p.
- PACZOSA, M.K, & JOAN MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** **80** (3):629-661, 2016.
- PAIVA, M.A, NASCIMENTO, A.M.A, BARATELLA, I.L, CAMARGO, B.C, LIMA-BITTENCOURT, C.I, NARDI, R.M.D. The first report of the qnrB19, qnrS1 and aac(6')-Ib-cr genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz** **107** (5): 687-689, 2012.
- PARK, Y. J., J. K, YU, S., LEE, E. J., OH, WOO., G.J Prevalence and diversity of *qnr* alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. **Journal of Antimicrobial. Chemotherapy**, 60:868–871, 2007.
- PATERSON, D.L I. Outcome of cephalosporin treatment for serious infection due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases: implication for the clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, 2206-2212, 2001.
- PATERSON, D.L I. & BONOMO, R.A. Extended-spectrum β -lactamase: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews** **18**: 657-686, 2005.

- PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy** **53** (6): 2702, 2009.
- PEIRANO, G. SEKI LM, VAL PASSOS VL, PINTO MC, GUERRA LR, ASENSI , M.D. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, **Brazilian Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **63** (2): 265-268, 2009.
- PEREIRA, G.H.,GARCIA, D.O.G, MOSTARDEIRO, M,FANTI, K.S.V.N, LEVIN, A. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: two-year epidemiologic follow-up in a tertiary hospital **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** **108** (1): 113-115, 2013.
- PÉREZ, F, ENDIMIANI,A, HUJER, K. M, BONOMO, R.A.The continuing challenge of ESBLs. **Current Opin in Pharmacology**. 7(5):459-69, 2007.
- PIGNATARI CERGOLE-NOVELLA, M.A, GUTH,, B.E.C, CASTANHEIRA, M, V CARMO, M.S, PIGNATARI, A.C.C. First description of *bla* CTX-M 14 e *bla* CTX-M -15 producing *Escherichia* isolates in *Escherichia coli* isolates in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, 16:180-184, 2010.
- PITOUT, J. D.D, NORDMANN, P., LAUPLAND, K.B., POIREL, L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum β -lactamases in the community. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** **56**:52-59, 2005.
- PODSCHUN, R. & ULLMANN,U. *Klebsiella* spp. As nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy,typing methods and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, 11: 589-603, 1998.
- POIREL, L , HERITIER,C, PODGLAJEN, SOUGAKOFF,W , GUTMANN,L , NORDMANN, P. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a Chromosome-Encoded SHV B-Lactamase That Compromises the Efficacy of Imipenem. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, 755–758, 2003.
- QUEENAN, A. M. & BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Review** **20** (3): 440-458, 2007.
- QUEIROZ, M.L, ANTUNES, P, MOURAO, J, MERQUIOR, V.L, MACHADO, E, PEIXE, L.V. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases, antimicrobial resistancegenes, and plasmid content in *Escherichia coli* isolates from different sources in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease Journal** **74** (1):91-94, 2012.
- QI, Y., WEI, Z., Li, I., J, S., DU, X., SHEN,P., YU, Y. Detection of a Common

Plasmid Carrying blaKPC-2 in *Enterobacteriaceae* Isolates from Distinct Cities in China. **Microbial Drug Resistance** **16**: 297-301, 2010.

RAEI, F, EFTEKHAR, F , FEIZABAD,M. M.I Prevalence of Quinolone Resistance Among Extended-Spectrum β -Lactamase Producing Uropathogenic *Klebsiella pneumoniae*. **Jundishapur Journal of Microbiology** **7** (6):1-6, 2014.

RAO, S.P.N. , RAMA, P.S., GURUSHANTHAPPA, V., MANIPURA , R., .Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: A Multi-Centric Study Across Karnataka **Journal of Laboratory Physicians** **1**: 7–13, 2014.

RASHEED, J.K., JAY, C., METCHOCK, B., BERKOWITZ, F., WEIGEL, L.,CRELLIN J., STEWARD, C., HILL, B.,MEDEIROS, A.A., TENOVER, F.C. Evolution of extend-spectrum -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 41: 647-653, 1997.

RAWAT, D & NAIR, D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. **Journal of Global Infectious Diseases** **2** (3): 263–274., 2010.

REDGRAVE, L.S, SUTTON, S.B, WEBBER, M.A, PIDDOCK, L.J.V. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Trends in Microbiology**, 1-8, 2014.

REIS, H.P.L.C, VIEIRA, J.B, MAGALHÃES, D.P, SARTORI, D.P, FONSECA,D.B, VIANA, J.M, CUNHA, F.A.Evaluation of antimicrobial resistance in private hospitals in Fortaleza- Ceará. **Brasilian Journal of Pharmacy** **94** (1): 83-87, 2013.

RICE, L.B. Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to β -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. **Antimicrobial Resistance. Mayo Clinic Proceedings** **87**(2):198-208, 2012.

ROBICSEK, A, STRAHILEVITZ ,J, JACOBY, G,A, MACIELAQ , M, ABBANAT, D, PARK CH, BUSH K, HOOPER DC. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **12**(1):83-88, 2006.

RODRIGUES , F.C.B & MESQUITA, A.F.C. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing enterobacteria in urine cultures of renal transplanted patients: frequency and resistance profile. **Brasilian Journal of Clinical Analyses** **48** (2):129-132, 2016.

- ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical infectious diseases** 52 (9):1138-1143, 2011.
- RUPPÉ, E, WOERTHER, P-L, BARBIER, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram negative bacilli. **Annals of Intensive Care** 5 (21):1-15, 2015.
- SAHLY, H., NAVON- VENEZIA, S., ROESLER, L., HAY, A., CARMELI, Y. PODSHUN, R. Extended-Spectrum β -lactamases production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 52: 3029-3034, 2008.
- SALOMON, S. Primary Friedländer's pneumonia: report of 32 cases. **Journal of the American Association** 108-937, 1937.
- SEKI L.M.; PEREIRA, P. S.; DE SOUZA CONCEIÇÃO, M., Souza M.J, Marques E.A, Carbalido, J.M, Carvalho, M.A.S, Assef, A.P.D.A.C., Asense, M.A, DI. Molecular epidemiology of CTXM producing *Enterobacteriaceae* isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. **Brazilian Journal of Infectious Disease** 17 (6):640-6, 2013.
- SEKI, L.M.A, PEREIRA, P.S, SOUZA, M.P.A.H, CONCEIÇÃO, M.S, MARQUES, E.A, PORTO, C.O, COLNAGOF, E.A.L ALVES, C.F.M, GOMES, D, ASSEF, A.P.D.A.C, SAMUELSEN, Ø, ASENSI, M.D. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 70 274–277, 2011.
- SHAHID, M, SINGH, A, SOBIA, F, RASHID, M, MALIK, A, SHUKLA, I, KHAN, H.M. *bla*_{CTXM}, *bla*_{TEM}, and *bla*_{SHV} in *Enterobacteriaceae* from North-Indian tertiary hospital: high occurrence of combination genes. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** 4 (2):101-5, 2011.
- SHAH, A.A, HASAN, F., AHMED, S., HAMEED, A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. **Research in Microbiology**, 155: 409-421, 2004.
- SHAH, P.M. Parenteral carbapenems. **Clinical Microbiology and Infection**, 14:1751-1780, 2008.
- SHAIKH, S, FATIMA, S, SHAKIL, S, RIZVI, S.M.D, KAMAL, M.A. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 22: 90–101, 2015.
- SHAMS, E, FIROOZEH, F, MONIRI, R, MOHAMMAD ZIBAEI, M. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes among Extended-Spectrum β -

- Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Human Isolates in Iran. **Journal of Pathogens**, 1-7, 2015.
- SHON, A.S & RUSSO, T.A. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: the next superbug? **Future Microbiology** 7(6), 669–671, 2012.
- SILBERT, S., BOYKEN, L., HOLLINS, R.J., PFALLER, M.A. Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 47(4):619-21, 2003.
- SINGH, A., GOERING, R.S., SIMJEE, S., FOLEY, S.L., ZERVOS, M.J. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews** 19: 512-530, 2006.
- SILVA, K.C & LINCOPAN, N. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Brazil: clinical impact and implications for agribusiness. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** 48 (2): 91-99, 2012.
- SILVA-SANCHEZ, J., GARZA-RAMOS, J.U , REYNA-FLORES, F, SANCHEZ-PEREZ, A, ROJAS-MORENO,T., ANDRADE-ALMARAZ, PASTRANA, V.J, CASTRO-ROMERO, J.I , PABLO VINUESA,P, BARRIOS, H , CERVANTES, C. Extended-spectrum b-Lactamase Producing *Enterobacteriaceae* Causing Nosocomial Infections in Mexico. A Retrospective and Multicenter Study. **Archives of Medical Research**, 42 :156-162, 2011.
- SONG, W., KIM, J., BAE, II.K., JEONNG, S.H., SEO, Y.H, SHIN, J.H., JANG, S.J.,UH,Y.,SHIN,J.H., MI-KYUNG LEE, MI- K., KYUNGWON LEE, K. Chromosome- Encoded AmpC and CTX-M Extended- Spectrum - Lactamases in Clinical Isolates of *Proteus mirabilis* from Korea. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** 5:1414–1419, 2011.
- SOUSA, R.R.F. **Pesquisa de genes de resistência a quinolonas em bacilos Gram negativos de origem clínica e ambiental**. Dissertação apresentada ao programa de Pós- Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, São Paulo, 2014. 28 P.
- STRUVE, C.; BOJER, M.; KROGFELT, K. A. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. **Infection and Immunity** 76 :(9) 4055-4065, 2008.
- SUAREZ, C & GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades y Infecciosas Microbiología Clínica** 27 (2):116–129, 2009.
- SUGAWARA,E, KOJIMA , S, NIKAIDO, H. *Klebsiella pneumoniae* major porins

- OmpK35 and OmpK36 allow more efficient diffusion of β -lactams than their *Escherichia coli* homologs OmpF and OmpC. **Journal of bacteriology** **98** (239):3200-3208, 2016.
- TENOVER, F.C., ARBEIT R.D., DOERING R.V., Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology** **33**: 2233-2339, 1995.
- THOMPSON, K.S., PREVAN, A.M., SANDERS, C.C. β -lactamases in *Enterobacteriaceae* :emerging problem for new β - Lactam antibiotics. **Current Clinical Tropics Infectious Diseases** **16**: 151-163, 1996.
- THOMSON, K.S. Lowering of Third Generation Cephalosporin Breakpoints. **Clinical Infectious Diseases** **11** (57):1663-1664, 2013.
- TOLEMAN, M.A, ROLSTON, K., JONES, R.N, WALSH, T.R. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d' beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 47:2859-2863, 2003
- TOLLENTINO F.M, POLOTTO M, NOGUEIRA M.L, LINCOPAN N, NEVES P, MAMIZUKA E.M, REMELI, G.A, DE ALMEIDA, M.T, RÚBIO, F.G, NOGUEIRA, M.C.. High prevalence of bla(CTX-M) extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of bla(SHV-12), bla(SHV-31), bla(SHV-38), and bla(CTX-M-15). **Brazilian Microbial Drug Resistance**, 17:7-16, 2011.
- TORO, L.M.E., MUNOZ S.L.A.,RESTREPO,J.R. *K. pneumoniae* y betactamasas. Un problema creciente. **Medicina Universidad Pontificia Bolivariana** **28**: 135-141, 2009.
- TOUBIANA, J, TIMSI, S, FERRONI, A, GRASSEAU, M, NASSIF, X, LORTHOLARY, O, ZAHAR, J-RMD, CHALUMEAU, M. Community-Onset Extended-Spectrum b-Lactamase–Producing *Enterobacteriaceae* Invasive Infections in Children in a University Hospital in rance. **Medicine** , 95, 12,2016 .
- TUON, F.F, KRUGER, M, TERRERI, M, PENTEADO - FILHO, S. R, GORTZ, L. *Klebsiella* ESBL bacteremia-mortality and risk factors. **Brazilian Journal of Infectious Disease** **15**: 594-598, 2011.
- TUON, F.F., ROCHA, J.L., TOLEDO, P., AREND, L.N., DIAS, C.H., LEITET.M., PENTEADO-FILHO, SR., PILONETTO , M., ZAVASCKI, A.P. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. **The Brazilian Journal of Infecctiuos Desease** **5** (16):416–419, 2012.
- TRIPATH, A, DUTTA, S.K, MAJUNDAR, M, DRARA, L, BANERJEE, D, ROY, K.

High Prevalence and Significant Association of ESBL and QNR Genes in Pathogenic *Klebsiella pneumoniae* Isolates of Patients from Kolkata, India. **Indian Journal of Microbiology** 52 (4): 557–564, 2012.

TRIVEDI, M.K, BRANTON A, TRIVEDI D, GANGWAR M, JANA S . Antimicrobial Susceptibility, Biochemical Characterization and Molecular Typing of Biofield Treated *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Health & Medical Informatics** 6 (5): 1-7, 2015.

TYPAS, A, BANZHAF, M GROSS , C.A, VOLLMER, W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. **Nature Reviews Microbiology**, 10: 123-136, 2012.

TZOUVELEKIS LS, MARKOGIANNAKIS A, PSICHOGIOU M, TASSIOS PT, DAIKOS GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions.. **Clinical Microbiology Review** 25 (4):682–707, 2016.

VIANA, A.L.M, CAYO, AVELINO, C.C,GALES, A.C,2 FRANCO, M.C , MINARINI, L.A.R. Extended-spectrum b-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil carry distinct types of plasmid-mediated quinolone resistance genes. **Journal of Medical Microbiology** 62, 1326–1331, 2013.

WOZNIAK, R. A. & WALDOR, M. K. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. **Nature Reviews Microbiology**, 8, 552–563 , 2010.

VERSALOVIC, J., KOUEUTH, T., LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research** 19 (24): 6823-6831, 1991.

VIEN, L.T.M., BAKER, S, THAO, L.T.P., TU, L.T.P, NGA, C.T.T.T.T, HOANG, N.V.M. CAMPBELL, J.I., Lam Minh YEN, L.M., HIEU, N.T., CHAU, N.V.V , FARRAR, J., SCHULTSZ, C. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in commensal members of the *Enterobacteriaceae* in Ho Chi Minh City, Vietnam. **Journal of Medical Microbiology**, 58: 1585–1592, 2009.

WACHINO, J, ARAKAWA, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. **Drug Resist Update** 15 (3):133-1348, 2012.

WANG P, H.U. F., XIONG Z, Y.E. X., ZHU, D., WANG, Y.F. Susceptibility of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* with the new CLSI breakpoints. **Journal of Clinical Microbiology**, 49: 3127–3131, 2011.

- WASSEF, MA , EL SHERIF, R.H , EL SHENOIFY, A.E , GHAITH, D.M. Phenotypic and Genotype patterns of aminoglycoside Resistance in Gram negative bacilli. **Journal of American Science** 6:781-786, 2010.
- WILLEMSSEN, I., OVERDEVEST, I , NAIEMI, N.A, RIJNSBURGER,M., SAVELKOUL, P., VANDENBROUCKE-GRAULS, C., KLUYTMANS, J. New Diagnostic Microarray (Check-KPC ESBL) for Detection and Identification of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Highly Resistant *Enterobacteriaceae*. **Journal of clinical Microbiology** 49: 2985–2987, 2011.
- WON, S.Y., MUNOZ-PRICE, L.S., LOLANS, K., HOTA, B., WEINSTEIN, R.A., HAYDEN, M.K. Emergence and Rapid Regional Spread of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase– Producing *Enterobacteriaceae*. **Clinical Infectious Diseases** 6 (53): 532–540, 2011.
- XUE, G, LI, J, FENG ,Y, XU, W, LI, S, YAN, C, ZHAO, H, SUN, H. High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Pediatric Patients in China. **Microbial drug resistance**, 1-8, 2016.
- YAMACHIKA, S, SUGIHARA,C, KAMA, Y, YAMASHITA, M. Correlation between penicillin-binding protein 2 mutations and carbapenem resistance in *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, 62, 429–436, 2013.
- YANG, YS., K.U.B., CH, LINA, J.C., SHANGA, S.T, C., CHIU, CH, KUO-MING YE, K.M, L.I.N,C.C. , CHANG, F.Y. Impact of Extended-spectrum b-lactamase producing *Escherichia colia* nd *Klebsiella pneumoniae* on the Outcome of Community-onset Bacteremic Urinary Tract Infections **Journal of Microbiology, Immunology and Infection** 43 (3):194–199, 2010.
- YANG J, Y.E .L., WANG W, L.U.O Y, ZHANG Y, H.A.N L. Diverse prevalence of 16S rRNA methylase genes armA and rmtB amongst clinical multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Antimicrobial Agents** 38(4):348-51, 2011.
- YEZLI, S, SHIBL, A.M, . MEMISH, Z.A. The molecular basis of b-lactamase production in Gram-negative bacteria from Saudi Arabia. **Journal of Medical Microbiology**, 64, 127–136, 2015.
- YIGIT, H. QUEENAN, A.M, ANDERSON, G. J, DOMENECH-SANCHEZ,A, JAMES W. BIDDLE,1 D. STEWARD, C.D, ALBERTI,S BUSH,K TENOVER, F.C. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother** (45): 4, 1151-1161, 2001.

YUGENDRAN, T & HARIS, B.N High incidence of plasmid-mediated quinolone resistance genes among ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Enterobacteriaceae* at a tertiary care hospital in Puducherry, India. **PeerJ**,1-13, 2016.

ZAVASCKI, A. P. , ZOCCOLI CM, MACHADO AB, DE OLIVEIRA KR, SUPERTI SV, PILGER DA, CANTARELLI VV, BARTH AL_KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting? **International Journal of Infectious Disease** 14 (6): 539-40, 2010.

ZHANG, R. WANG,X.D, CAI, J. C, ZHOU, H.W, LV, H.X, QING FENG HU, GONG-XIANG CHEN. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing K. pneumoniae with high qnr prevalence in a Chinese hospital. **Journal of Medical Microbiology** , 60, 977–982, 2011.