

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS AMBIENTAIS DA FAMÍLIA  
*Enterobacteriaceae* QUANTO À PRESENÇA DE GENES DE RESISTÊNCIA A  $\beta$ -  
LACTÂMICOS**

DANIELE VARGAS DE OLIVEIRA

Orientador(a): Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Sueli T. Van Der Sand

Porto Alegre

Abril/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS AMBIENTAIS DA FAMÍLIA  
*Enterobacteriaceae* QUANTO À PRESENÇA DE GENES DE RESISTÊNCIA A  
 $\beta$ -LACTÂMICOS**

Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Ambiental

Orientador(a): Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Sueli T. Van Der Sand

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Abril/2016

#### CIP - Catalogação na Publicação

de Oliveira, Daniele Vargas  
Análise e caracterização de isolados ambientais da  
Família Enterobacteriaceae quanto à presença de genes  
de resistência a beta-lactâmicos / Daniele Vargas de  
Oliveira. -- 2016.  
103 f.

Orientadora: Sueli T. Van Der Sand.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Enterobactérias. 2. Amostras ambientais. 3.  
Resistência a antibióticos beta-lactâmicos. I. Van Der  
Sand, Sueli T., orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

Dedico esta Tese as duas pessoas mais importantes da minha vida: À minha avó Amazildes (*in memorian*), que até a metade do meu doutorado me acompanhou com palavras de incentivo, carinho e amor, mas ainda hoje me acompanha. E ao Manoel, meu grande amor e companheiro, por todo seu amor, carinho, paciência e compreensão (quando muitas vezes nem eu me compreendia) pelo seu apoio em todas as minhas decisões. Obrigada por me ajudar a concretizar esse sonho, não teria conseguido sem você. Essa conquista também é sua. Amo vocês!!!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos que recebo todos os dias sem muitas vezes perceber, por me abençoar e guiar nos caminhos corretos.

Aos meus pais (*in memoriam*), que mesmo sem estarem presentes, fazem parte desta conquista e estão sempre comigo em tudo que eu faço.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sueli Van Der Sand... o que falar dessa pessoa que muitas vezes foi muito mais do que orientadora, foi uma amiga. Obrigada por acreditar nessa proposta de pesquisa; pelos ensinamentos e dicas; pelo carinho, paciência e dedicação em todos esses anos de convívio. Espero que possamos estar sempre próximas. Nós fizemos uma ótima dupla!

Aos integrantes do lab 164 e 209, pelas risadas, piadas, almoços e cafés que ajudavam a enfrentar o trabalho muitas vezes árduo, mas gratificante. Em especial a Marcela Proença e a Ana Elisa Ballarini por todos os géis de agarose e retiradas de PCR do termociclador.

À Aline W Medeiros, por sua amizade e carinho desde os tempos do Mestrado... Daí para frente nossa amizade só se fortaleceu e estivemos sempre nos apoiando em todos os momentos bons ou ruins. E isso ficará para sempre.

A minha família pelo carinho, incentivo e apoio.

A todos do laboratório LABRESIS/HCPA que me receberam muito bem, em especial a Luciana Nunes por todo empenho, dedicação e amizade na etapa final da minha tese e ao Prof. Dr. Luís Afonso Barth por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu aprendesse e realizasse o PFGE. E ainda a Vanessa Ribeiro que me deu as dicas para a realização dos testes fenotípicos.

A todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/FAPERGS), pela concessão da bolsa.

# ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS AMBIENTAIS DA FAMÍLIA *Enterobacteriaceae* QUANTO À PRESENÇA DE GENES DE RESISTÊNCIA A $\beta$ -LACTÂMICOS

Autor: Daniele Vargas de Oliveira

Orientador(a): Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Sueli T. Van Der Sand

## RESUMO

A resistência das bactérias aos antibióticos é um problema recorrente que dificulta o tratamento de infecções causadas por bactérias. Alguns membros da família *Enterobacteriaceae* são responsáveis por carrear e disseminar diferentes mecanismos de resistência, entre estes está a capacidade de algumas bactérias em produzir enzimas como as  $\beta$ -lactamases. Tendo em vista esta problemática o objetivo do presente estudo foi detectar/identificar através de análises fenotípicas e genotípicas quais os genes de resistência presentes em amostras ambientais. Para tanto os primeiros ensaios realizados foram os fenotípicos: teste de Hodge Modificado (MHT), testes com inibidores como ácido fenilborônico (APB), EDTA e cloxacilina, e o teste confirmatório para Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). Foram isoladas 131 amostras as quais passaram por uma triagem inicial através do antibiograma, utilizando os antimicrobianos: cefotaxima (30 $\mu$ g), cefpodoxima (10 $\mu$ g), ceftazidima (30 $\mu$ g), ertapenem (10 $\mu$ g), meropenem (10 $\mu$ g), aztreonam (30 $\mu$ g). Destas, 62 amostras foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano as quais foram submetidas aos demais testes fenotípicos. Os resultados mostram que 40 amostras apresentaram perfil positivo para pelo menos um dos testes fenotípicos. Estas 40 amostras foram submetidas a PCR Multiplex para detecção e caracterização dos principais genes de resistência à  $\beta$ -lactamases:  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL), Carbapenemase e  $\beta$ -lactamase AmpC. Uma vez detectado os genes, foi realizado o sequenciamento dos *amplicons* para confirmação da presença dos mesmos. A relação clonal foi estabelecida utilizando *Xba*I através da Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE). Os resultados mostraram que em 85% dos isolados foi detectada a presença de genes de resistência, dentre os quais observamos as seguintes espécies: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*. A prevalência foi para os genes de  $\beta$ -lactamases com 77,5% (TEM, SHV e CTX-M) seguido por Carbapenemase (KPC e GES) com 45% e AmpC (ACT/MIR) com 2,5%. Este foi o primeiro relato desses genes de resistência em isolados ambientais no município de Porto Alegre/RS. Oito amostras apresentaram três genes de resistência, quatorze amostras dois e 12 com um gene cada. A análise da eletroforese em campo pulsado mostrou uma relação clonal entre alguns isolados de *K. pneumoniae* que foram separados em três grupos diferentes (K1, K2, K3). Entre os isolados de *Enterobacter* sp. não foi possível estabelecer uma relação clonal. Fica claro com o trabalho a ocorrência e a capacidade de disseminação desses genes de resistência em amostras ambientais e o potencial risco à saúde da comunidade em geral, tornando-se um problema de saúde pública.

<sup>1</sup>Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (101p.) Abril, 2016.



# ANALYSIS AND CHARACTERIZATION OF ENVIRONMENTAL SAMPLES FROM THE *Enterobacteriaceae* FAMILY FOR THE PRESENCE OF B-LACTAM RESISTANCE GENE<sup>1</sup>

Author: Daniele Vargas de Oliveira

Advisor: Prof. Dr. Sueli T. Van Der Sand

## ABSTRACT

Bacteria resistant to antibiotics are a recurring problem which makes difficult the treatment of bacterial infections. Some members of the *Enterobacteriaceae* family are responsible for carrying and disseminating different mechanisms of resistance. Among them are strains which produce enzymes such as  $\beta$ -lactamases. In view of this problem the objective of this study was to detect / identify through phenotypic and genotypic analysis which resistance genes present in environmental isolates. For this the first trials were the phenotypic assays: Hodge test Modified (MHT), tests with inhibitors such as phenylboronic acid (APB), EDTA and cloxacillin, and confirmatory test for Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). In the first screening 131 isolates were submitted to antibiogram using following antimicrobials: cefotaxime (30 $\mu$ g), cefpodoxime (10mg), ceftazidime (30 $\mu$ g), ertapenem (10mg), meropenem (10mg), aztreonam (30 $\mu$ g). Out of 62 isolates were resistant to at least one antimicrobial were submitted to other phenotypic tests. The results show that 40 isolates show a positive profile for at least one phenotypic test. These 40 isolates were submitted to Multiplex PCR for detection and characterization of the major resistance genes for  $\beta$ -lactamases:  $\beta$ -lactamase extended spectrum (ESBL), carbapenemase and  $\beta$ -lactamase AmpC. Once detected the genes, the sequencing of amplicons were performed in order to confirm the presence of the genes. The clonal relationship was established using XbaI endonuclease using Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). The results showed that in 85% of the isolates the presence of resistance genes was detected, among which we observed the following species: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*. The prevalence was for the  $\beta$ -lactamase gene with 77.5% (TEM, SHV and CTX-M) followed by carbapenemase (KPC and GES) with 45%, and AmpC (ACT / MIR) with 2.5%. This was the first report where these resistance genes were detected in environmental isolates in the city of Porto Alegre/RS. Eight isolates had three resistance genes, fourteen isolates two genes and 12 with one gene. The analysis of pulsed field gel electrophoresis showed a clonal profile among some *K. pneumoniae* strains which were separated into three groups (K1, K2, K3). Among *Enterobacter* sp. strains it was not possible to establish a clonal profile. It is clear from the work the occurrence and the ability of disseminate these resistance genes among environmental isolates and the potential health risk to the community and so becoming a public health problem.

<sup>1</sup>Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (101p.) April, 2016.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	4
2.1	Objetivo Geral .....	4
2.2	Objetivos Específicos .....	4
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	5
3.1	<i>Enterobacteriaceae</i> .....	5
3.2	Resistência aos antimicrobianos .....	5
3.3	Resistência a antimicrobianos fora do ambiente hospitalar .....	8
3.4	Antibióticos $\beta$ -lactâmicos .....	9
3.5	$\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL) .....	10
3.6	Resistência aos carbapenêmicos .....	12
3.6.1	Carbapenêmicos Classe A .....	13
3.6.2	Carbapenêmicos Classe B .....	14
3.6.3	Carbapenêmicos Classe D .....	15
3.7	$\beta$ -lactamase AmpC .....	16
3.8	Metodologia fenotípica para detecção de bactérias produtoras de enzimas de resistência .....	17
3.9	Disseminação de genes de resistência .....	17
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
4.1	Análises fenotípicas .....	19
4.1.1	Teste de resistência a antimicrobianos- triagem .....	19
4.1.2	Análises fenotípicas para detecção de $\beta$ -lactâmicos .....	20
4.1.2.1	Teste de Hodge Modificado (MHT) .....	20
4.1.2.2	Testes fenotípicos para detecção de ESBLs, AmpCs e carbapenemase .....	20
4.2	Análises genotípicas .....	21
4.2.1	Extração de DNA .....	21
4.2.2	Identificação molecular das amostras por sequenciamento da região 16S rDNA .....	21
4.2.3	Identificação molecular dos genes de resistência aos $\beta$ -lactâmicos .....	22
4.2.4	<i>Pulsed-field gel electrophoresis analysis</i> (PFGE) .....	23

<b>5.</b>	<b>ARTIGOS</b> .....	<b>25</b>
5.1.	Artigo 1- testes fenotípicos para detecção de enterobactérias, oriundas de amostras ambientais, resistentes a $\beta$ -lactâmicos .....	25
5.2.	Artigo 2- Caracterização molecular de $\beta$ -lactamases em amostras ambientais de <i>Enterobacteriaceae</i> através de PCR Multiplex e PFGE .....	44
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>78</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>87</b>

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Testes fenotípicos e seus respectivos inibidores.....	21
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o Sequenciamento..	22
Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores para as seis PCR Multiplex.....	24
Tabela 4. Perfis de resistência, análises fenotípicas e genotípicas e relação clonal de amostras ambientais de <i>Enterobacteriaceae</i> .....	75-76

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos.....	Página 9
---	-------------

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APB	Ácido Fenil Borônico
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EDTA	Ácido etil eno diamino tetracético
ETP	Ertapenem
ESBL	$\beta$ -Lactamase de espectro estendido
IPM	Imipenem
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
MBL	Metallo $\beta$ - lactamase
MER	Meropenem
MHT	Teste de Hodge modificado
PBP	Proteína ligadora de penicilina
PFGE	Eletroforese em campo pulsado

## 1. INTRODUÇÃO

A resistência de bactérias aos antibióticos e outras drogas antimicrobianas é um fenômeno natural e de pressão seletiva, mas que devido ao seu uso indiscriminado e recorrente, tornou-se um problema de saúde pública. Os antimicrobianos são eliminados pelos humanos e animais e despejados no ambiente sem qualquer prevenção ou cuidado (Batista et al.,2007) sendo que, nem mesmo o tratamento de esgotos é capaz de eliminar estes compostos químicos.

Algumas espécies bacterianas possuem capacidade de adaptação para mudanças ambientais e conseguem sobreviver em condições desfavoráveis, frequentemente resultando no desenvolvimento de mutações que favorecem as espécies a sobreviverem nessas condições, como água de esgoto, de rio, de lago. Além disso, muitas bactérias estão em constante contato com genes itinerantes que se movem de uma célula bacteriana para outra, realizando troca de material genético (Kümerer, 2009b).

Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos são o maior grupo de fármacos disponíveis para o consumo e o mais utilizado pelos profissionais de saúde contra uma série de doenças. Eles possuem um anel  $\beta$ -lactâmico central na sua estrutura, que é o sítio de ação onde as enzimas se ligam causando a sua inativação.

As  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) são um grupo de enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, a primeira, segunda e terceira geração das cefalosporinas e o aztreonam.

As ESBL estão frequentemente localizadas em plasmídeos que também podem carregar resistência a outros antimicrobianos como aminoglicosídeos, trimetoprima, sulfonamidas, tetraciclina e cloranfenicol (Rawat & Nair, 2010).

Existe uma grande diversidade de  $\beta$ -lactamases e estas são encontradas em

bactérias que habitam os mais variados ambientes e estão expostas a diferentes pressões de seleções (Bush & Jacoby, 2010).

As carbapenemases são enzimas produzidas por um grupo de bactérias inclusive as enterobactérias, onde conferem resistência aos carbapenêmicos, pois degradam o anel carbapenêmico existente nestes antibacterianos, além de inativar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (Meletis et al., 2010). Elas são classificadas como pertencentes a Classes A (KPC *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, IMI, NMC, SME, GES, SFC), B (metaloenzimas: VIM, IMP, NDM, GIM, SPM) e D (OXA enzimas) (Nordmann et al., 2011).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos vem sendo relatada há muitos anos e é uma forma dos microrganismos sobreviverem a muitas adversidades nos ambientes onde se encontram, porém a resistência passa a ser um problema sério quando estamos tratando de bactérias multirresistentes causando enfermidades muitas vezes de difícil tratamento. O fato é que inicialmente bactérias resistentes eram comuns em ambientes hospitalares, no entanto hoje, com o advento da pesquisa é possível verificar que esses genes responsáveis pela disseminação de resistência têm se propagado entre as mais variadas bactérias. Isto também pode ser observado inclusive naquelas bactérias comuns em ambientes naturais como água, solo e com isso a resistência bacteriana tem se tornado um problema de saúde pública. Devido a essa problemática este trabalho visa detectar e identificar os genes de resistência presentes em amostras ambientais. Já que os antimicrobianos, uma vez lançados no ambiente de forma parcialmente degradada pelo organismo humano ou animal ou ainda *in natura*, propiciam um ambiente seletivo para os microrganismos em seu ambiente natural. Desse modo o estudo pode vir a elucidar as fontes de disseminação dos focos de resistência, podendo



contribuir com informações aos órgãos de saúde e de meio ambiente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar e caracterizar isolados de *Enterobacteriaceae*, oriundos de amostras ambientais, quanto ao seu perfil de resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos e identificar a partir de técnicas moleculares quais os genes mais presentes.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Analisar o perfil de resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos: cefalosporinas e aos carbapenêmicos;
- 2.2.2 Detectar através de testes fenotípicos que utilizam inibidores os possíveis isolados carreadores de genes de resistência;
- 2.2.3 Determinar a presença dos genes de resistência para as  $\beta$ -lactamases: ESBLs, Carbapenemases e AmpC através da técnica da PCR Multiplex;
- 2.2.4 Sequenciar os genes detectados das amostras positivas na PCR Multiplex;
- 2.2.5 Identificar o perfil genético das bactérias positivas nos testes fenotípicos, através da técnica de tipagem molecular usando PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis*).

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 *Enterobacteriaceae*

*Enterobacteriaceae* é um grande grupo de bactérias bastonetes Gram-negativos, distribuídos nos mais variados ambientes, onde algumas espécies que pertencem a esta família fazem parte de microbiota intestinal de humanos e animais de sangue quente como é o caso da *Escherichia coli*. São patógenos humanos bem comuns e algumas espécies têm grande importância clínica como a *Klebsiella pneumoniae*, o *Enterobacter cloacae* e a *Salmonella* spp. Essas bactérias podem se disseminar rapidamente entre humanos (alimentos e água contaminados) e, ainda, adquirir material genético (plasmídeos e/ou transposons) através transferência horizontal de genes (Nordmann et al., 2011). Fisiologicamente, são capazes de fermentar glicose com produção de gás, catalase positivo, oxidase negativa e não formam esporos.

As enterobactérias são responsáveis por muitas infecções, seja de origem hospitalar ou não o que acaba afetando uma grande variedade de hospedeiros (Little et al., 2012; Nordmann et al., 2013).

#### 3.2 Resistência a antimicrobianos

O primeiro relato que microrganismos poderiam ser inibidos por produtos produzidos por outros microrganismos foi feito por Louis Pasteur em 1877, que observou o *Bacillus anthracis* sendo inibido por um contaminante. Em 1929, Fleming constatou a lise de *Staphylococcus aureus* por um fungo *Penicillium notatum* e dez anos depois a substância produzida por este microrganismo foi purificada, identificada e denominada de penicilina (Kümerer, 2009a).

Desde a descoberta da penicilina, os antibióticos e outros agentes

antimicrobianos tem sido utilizados em tratamentos de infecções causadas por microrganismos (Martins, et al., 2013). O termo antibiótico é usado também para os produtos com atividade contra fungos e parasitas (Kümerer & Henninger, 2003).

Os antibióticos são divididos em diferentes classes de acordo com a sua estrutura química e mecanismos de ação, podendo ser  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas, tetraciclina, macrolídeos, sulfonamidas entre outros (Kümerer, 2009a).

Desde os anos 50, antibióticos de espectro estendido, incluindo penicilinas e cefalosporinas ( $\beta$ -lactâmicos), tem sido usados para tratamentos de infecções causadas por bactérias da família *Enterobacteriaceae* (Zhou et al., 2013), mesmo sem haver, há mais de duas décadas, nenhum  $\beta$ -lactâmico realmente novo (Suárez & Gudiol, 2009).

O processo da aquisição de resistência pelas células bacterianas pode ser genericamente dividido em duas grandes etapas: 1) reorganização da membrana e sua permeabilidade e 2) mudanças genéticas (Martins, et al., 2013).

Bactérias Gram-negativas tem uma proteção extra devido a presença da membrana externa, por este fato alguns antibióticos não são eficazes contra esse grupo como são contra as bactérias Gram-positivas. A permeabilidade dessa membrana pode ser regulada por uma ação conjunta entre as porinas e as bombas de efluxo (Martins, et al., 2013).

A resistência das diversas espécies bacterianas aos antimicrobianos, pode variar entre países, regiões e de acordo com a origem do microrganismo, que pode ser hospitalar ou comunitária e pode ser um fenômeno genético ou não. Os fenômenos genéticos que estão relacionados com a existência de genes ou elementos móveis (plasmídeos, transposons e integrons) presentes nos microrganismos que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a

ação das drogas é chamada de resistência adquirida (Chroma & Kolar, 2010). Os plasmídeos são elementos extra cromossomais de DNA circular presentes em bactérias capazes de se replicar independente do hospedeiro (Mathers et al., 2015). Dessa forma, a resistência proveniente de alterações fisiológicas ou estruturais pode ser levada a diversos ambientes e de diversas formas, principalmente através da transferência horizontal de genes de resistência dentro dos plasmídeos (Mathers et al., 2015), afetando os mais variados organismos sejam eles aquáticos e/ou terrestres (Kümerer, 2009b).

O fenômeno não genético é aquela resistência que ocorre de forma natural dentro de uma espécie ou gênero bacteriano, sendo a chamada resistência intrínseca ou natural (Chroma & Kolar, 2010). Em alguns casos, a resistência natural a um determinado antibacteriano é uma característica indispensável à autodefesa e proteção dos microrganismos produtores de antibióticos, sendo esses produzidos frente à competição com outras bactérias pelo mesmo habitat (Brigotti et al., 2010).

A resistência também está presente em muitas comunidades em ambientes naturais, onde muitos microrganismos não podem ser cultivados em laboratório, mas que podem possuir uma diversidade molecular muito grande e, portanto, deveriam ser investigados (Henriques, et al., 2006).

Há três principais formas estratégicas que os microrganismos podem desenvolver resistência às drogas: 1) produzindo uma enzima que destrua o antimicrobiano; 2) alterando o alvo molecular de ligação do antimicrobiano; 3) evitando a chegada do antimicrobiano ao alvo (através de bombas de efluxo ou permeabilidade de membrana). De forma geral, após o microrganismo encontrar a sua melhor estratégia, os novos genes que conferem resistência, são disseminados

entre aqueles de sua espécie e até mesmo para microrganismos de outras espécies (Sundsjord et al., 2004), caso o gene esteja localizado dentro de um elemento móvel como o plasmídeo. Em bactérias Gram-negativas o mais comum é uma combinação das estratégias 1 (através da produção de enzima) e 3 (bomba de efluxo ou permeabilidade de membrana) (Rawat & Nair, 2010).

As resistências aos  $\beta$ -lactâmicos, em alguns casos, podem estar associada a diminuição da permeabilidade da membrana externa com super expressão de  $\beta$ -lactamases ou expressão de carbapenemase (Nordmann et al., 2011).

### 3.3 Resistência a antimicrobianos fora do ambiente hospitalar

A preocupação com a crescente resistência de bactérias patogênicas no meio ambiente, e os seus efeitos ecotóxicos já vêm sendo discutida (Kümerer, 2004) e cada vez mais a resistência aos antibióticos é vista como um problema ecológico e de saúde pública. Os antimicrobianos podem ser mais ou menos metabolizado por humanos e/ou animais, podendo após o seu uso ser o mesmo excretado para os efluentes e a parte não-metabolizada é liberada como um composto ainda ativo (Kümerer, 2009a).

Com o passar do tempo, diversos artigos têm relatado a ocorrência de bactérias resistentes a antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos nos mais variados ambientes: arroio (Oliveira et al., 2015), efluente hospitalar (Chagas et al., 2010; Chouchani et al., 2011; Korzeniewska & Harnisz, 2013; Oliveira & Van Der Sand, 2016) esgoto municipal (Korzeniewska et al., 2013; Amos et al., 2014;), animais (Hernandez et al 2013; Loncaric et al., 2013; Woodford et al., 2014), ambiente antártico (Hernández et al., 2012). E muitos desses estudos citados acima também relatam a ocorrência de

genes de resistência.

### 3.4 Antibiótico $\beta$ -lactâmicos

Os antibióticos deste grupo possuem em sua estrutura química um anel  $\beta$ -lactâmico (Figura 01). Os  $\beta$ -lactâmicos são altamente específicos e atóxicos para as células hospedeiras e compreendem os seguintes compostos: as penicilinas (naturais ou semi-sintéticas) que atuam ligando-se irreversivelmente a diversas enzimas transpeptidases conhecidas como *Penicillin Binding Proteins* (proteínas ligadoras de penicilinas) – PBPs, resultando em uma parede celular mais fraca; as cefalosporinas (naturais ou semi-sintéticas) atuam da mesma forma que as penicilinas, porém em alguns casos de maneira mais eficiente; os monobactâmicos agem ligando-se a PBP3, impedindo a divisão celular e com isso a síntese da parede celular e podem induzir a filamentação; e os carbapenêmicos que ligam-se a PBP1, causando a inibição da elongação celular e a posterior lise da célula, e PBP2 alterando a forma celular (Kohanski et al., 2010; Rawat & Nair, 2010).

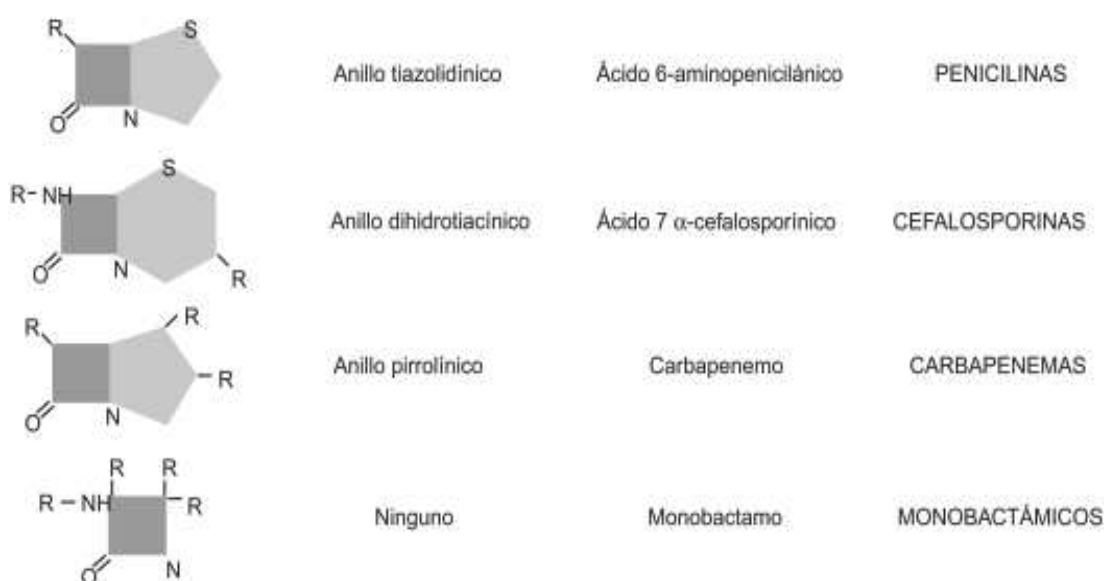


Figura 01- Estrutura química dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. (Modificado de Suárez & Gudiol, 2009)

A expressão de genes de resistência pode depender de um estímulo externo, que é a chamada resistência indutiva, onde é necessário um estímulo, por exemplo, a produção de  $\beta$ -lactamase por microrganismos quando expostos aos antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos (Koneman et al., 2001).

Os carbapenêmicos são  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro, estáveis frente a  $\beta$ -lactamase (Ferreira, 2011) por isso muitas vezes é a opção terapêutica utilizada no tratamento de infecções graves causadas por enterobactérias carreadoras de  $\beta$ -lactamase, AmpC e ESBLs.

### 3.5 $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL)

As enzimas  $\beta$ -lactamases são muito antigas, existem estimativas que elas originaram-se há mais de 2 bilhões de anos (Jacoby, 2009). As ESBLs são tipicamente  $\beta$ -lactamases que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e aztreonam e as famílias mais frequentemente encontradas são as CTX-M, SHV e TEM (Thomson, 2010).

As  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) representam o primeiro grupo no qual a resistência mediada pela  $\beta$ -lactamase é resultado de mudanças no substrato da enzima. Este mecanismo de resistência é o mais comum e preferencial em bactérias Gram-negativas (Paterson & Bonomo, 2005; Bush & Jacoby, 2010; Rawat & Nair, 2011), mas também se observa em algumas bactérias Gram-positivas (Henriques et al., 2006), tanto de origem animal como humana (Li et al., 2007).

Isolados de enterobactérias comunitárias que produzem ESBLs e capazes de causar hidrólise nas cefalosporinas (tratamento preferencial para muitas doenças infecciosas), excluindo os carbapenêmicos, vêm aumentando em todo o mundo (Nordmann et al., 2011).



A família das enzimas TEM são derivadas de TEM-1 e TEM-2. O seu nome é originário do nome da uma paciente (Temoniera) na Grécia, de quem uma *E. coli* foi isolada de amostra de sangue (Paterson & Bonomo, 2005, Dropa, 2006). Atualmente, muitas  $\beta$ -lactamases já foram descritas e a maioria delas são ESBLs (Jones et al., 2009). Essas ESBLs são responsáveis por um alto índice de resistência à ampicilina em *E. coli*, penicilina e algumas cefalosporinas em *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (Braford, 2001). As ESBLs estão presentes em várias cepas integrantes da família das *Enterobacteriaceae* e acabaram se disseminando para outros patógenos Gram-negativos.

O tipo SHV de ESBL é assim chamado, pois seu nome está relacionado com as "variações na sulfidril". A alteração que ocorre no gene *bla*<sub>SHV</sub> originando fenótipos ESBL é a substituição de uma serina por uma glicina na posição 238 do gene (Braford, 2001). Mais de 112 SHVs já foram identificadas, mas nem todas são ESBLs, e podem ser encontradas no cromossomo de *K. pneumoniae* ou em plasmídeos na *E. coli* (Braford, 2001; Jones et al., 2009).

As enzimas tipo CTX-M não possui o mesmo ancestral comum dos tipos TEM e SHV e estão apresentando uma rápida propagação entre as causas de infecções causadas por ESBLs em todo o mundo (Livermore, 2009; Braford., 2001). CTX-M possuem atividade contra ceftriaxona e cefotaxima, mas o fenótipo de resistência apresentado não é universal para todos os microrganismos produtores das enzimas CTX-M. Esse fenótipo pode variar desde a produção de  $\beta$ -lactamases adicionais ou, ainda, mutações alterando a especificidade do substrato das enzimas CTX-M o que pode mascarar a sua presença (Edelstein et al., 2003). Com isso, o tipo CTX-M torna-se o tipo mais propagado globalmente de ESBL em amostras de enterobactérias clínicas ou comunitárias (Nordmann & Poirel, 2014).

### 3.6 Resistência a Carbapenêmicos

A disseminação de resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos ocorre devido à produção de enzimas carbapenemases (Zhou et al., 2013).

As enzimas carbapenemases têm sido relatadas como causadoras de resistência em muitos membros da família das enterobactérias, sendo a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC, classe A) a mais disseminada nesta família de bactérias (Giakkoup et al., 2011). Nessa classe de enzimas ainda encontram-se: Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase (VIM, classe B), Imipenemase (IMP, classe B), Nova Delhi metalo- $\beta$ -lactamase (NDM, classe B) e Oxacilinase-48 (OXA-48, classe D) (Hong et al., 2012; Nordmann et al., 2012a). Elas são diversas e responsáveis por hidrolisar os carbapenêmicos, quase todos os  $\beta$ -lactâmicos exceto o aztreonam, MBL e outros compostos (Thomson, 2010; Birgy, et al., 2012; Cantón et al., 2012). Essa resistência pode ser devido à aquisição de plasmídeos portadores de genes de resistência (mais comum), como a KPC, ou resistência cromossômica (Little et al., 2012).

Essas diferentes enzimas estão muito relacionadas com a resistência a antibióticos e em organismos com perfil mais resistente, como é o caso da *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. que ao adquirirem uma carbapenemase, podem se tornar vetores de transmissão dessas enzimas a alguns membros da família *Enterobacteriaceae* (Thomson, 2010). Por isso, a grande preocupação com as enzimas transmissíveis e não tanto com as cromossômicas já que essas últimas podem ocorrer em microrganismos menos comuns como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* spp., *Chryseobacterium* spp., entre outros (Thomson, 2010).

A resistência devido à produção de carbapenemase em diversos isolados,

frequentemente, está acompanhada de outro fator de resistência (Cantón et al., 2012) como a produção de ESBLs (Nordmann et al., 2011). Outro ponto importante quanto à produção dessas enzimas em bactérias é que devemos observar até mesmo os perfis de suscetibilidade e suscetibilidade intermediária como possíveis produtores de carbapenemases (Dienstmann et al., 2010; Nordmann et al., 2012).

As carbapenemases são encontradas preferencialmente em *K. pneumoniae* seguidos de *E. coli* e nas demais enterobactérias (Cantón et al., 2012). Os tipos mais frequentemente encontrados em isolados clínicos e ambientais de enterobactérias são as NDM, OXA-48 e KPC (Nordmann & Poirel, 2014)

Fenótipos de resistência aos carbapenêmicos também podem ser atribuído ao aumento de produção de ESBLs e AmpC  $\beta$ -lactamases ocorrendo conjuntamente com falha na permeabilidade da membrana externa e bombas de efluxo e/ou perda ou mutação de porina (Bush, 2013).

### 3.6.1 Carbapenemase Classe A

As carbapenemases da classe A, hidrolisam todos os  $\beta$ -lactâmicos e sua atividade pode ser inibida parcialmente por ácido clavulânico, tazobactam e ácido borônico (Nordmann et al., 2013). Ainda, hidrolisam as penicilinas e cefalosporinas mais eficientemente que os carbapenêmicos (Bush, et al., 1995). Importante salientar que, infecções causadas por bactérias que produzem carbapenemases estão associadas a altas taxas de mortalidade e falhas no tratamento (Lee & Bugess, 2012).

Nesta classe, estão incluídas as famílias KPC, IMI e SME e as enzimas NMC-A e algumas GES; e estas podem ser produzidas por membros da família *Enterobacteriaceae* (Thomson, 2010). As famílias IMI, NMC-A e SME são

codificadas por genes localizados no cromossomo, o que pode contribuir para sua menor propagação (Queenan & Bush, 2007). A GES se diferencia das três últimas pela substituição de apenas dois aminoácidos e os genes que a codificam estão localizados em integrons ou plasmídeos (Queenan & Bush, 2007).

A família KPC está amplamente distribuída no mundo, onde a KPC-2 e a KPC-3 são as mais predominantes (Andrade, et al., 2011). Essa família possui maior poder de propagação nesta classe, devido à sua localização em plasmídeos e, também, por ser mais frequente em *K. pneumoniae*, um microrganismo muito ágil em acumular e transferir mecanismos de resistência (Queenen & Bush, 2007). Enterobactérias com *bla*<sub>KPC</sub> são, com frequência, microrganismos multirresistentes, apresentando resistência aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e cotrimoxazol (Poirel et al., 2007; Mathers et al., 2015).

### 3.6.2 Carbapenemase Classe B

As metalo- $\beta$ -lactamases são capazes de hidrolisar todos os  $\beta$ -lactâmicos exceto o aztreonam e somente podem ser inibidas por quelantes de zinco, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o ácido dipicolínico (Mathers et al., 2015). Os inibidores de uso clínico e comercial como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam, não conseguem afetar sua atividade (Nordmann et al., 2013). O seu mecanismo de hidrólise é dependente de uma interação entre o  $\beta$ -lactâmico e íons de zinco em seu sítio ativo (Nordmann et al., 2012 B; Queenan & Bush, 2007). Devido a sua propagação, as MBLs são consideradas como um potencial problema de saúde pública, já que são poucas as opções terapêuticas contra microrganismos carreadores desses genes (Mayer et al., 2012).

As metalo- $\beta$ -lactamases incluem NDM, VIM e IMP e a SPM-1 esta última

descrita pela primeira vez em São Paulo (Toleman et al., 2002). Têm sido encontradas em alguns membros da família *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Thomson, 2010). Outros membros desta família são GIM e SIM, cujos genes estão localizados em integrons e quando estes genes estão associados a plasmídeos ou transposons, sua transferência se torna fácil (Queenan & Bush, 2007).

### 3.6.3 Carbapenemase Classe D

As oxacilinases são capazes de hidrolisar penicilinas e carbapenêmicos, mas não conseguem hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e cefepime) (Nordmann et al., 2012b) ou, quando hidrolisam, o fazem até uma determinada concentração (Tängdén & Giske, 2015). Sua atividade pode ser inibida *in vitro* pelo NaCl e os inibidores de uso clínico também não tem efeito (Nordmann et al., 2012b).

As OXAs (os membros dessa família são referidos dessa maneira) que são comumente produzidas por *Acinetobacter* spp., são codificadas por genes localizados em plasmídeos (Queenan & Bush, 2007). Estas enzimas também têm sido detectadas em *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli* (Thomson, 2010) Nas enterobactérias o tipo de enzima mais comumente encontrado é o OXA-48 e ainda o OXA-163 que tem sido identificado em alguns países da América do Sul (Mathers et al., 2015). Cabe ressaltar que o tipo OXA-48 não é encontrado em bactérias não fermentadoras, portanto não estando relacionado com as OXAs encontradas em *Acinetobacter* spp. (Tängdén & Giske, 2015).

### 3.7 $\beta$ -lactamase AmpC, Classe C

A filogenia indica que as enzimas AmpC e  $\beta$ -lactamase das classes A e D divergiram de um ancestral comum, mas que as AmpCs antecederam a esta divergência (Jacoby, 2009).

A superexpressão constitutiva de  $\beta$ -Lactamases AmpC em organismos Gram-negativos pode ocorrer tanto pela desregulação do gene cromossômico *ampC* ou por aquisição de um gene *ampC* através de um elemento móvel (plasmídeo) (Pérez-Pérez & Hanson, 2002). Algumas variedades das famílias de AmpC, determinadas por genes cromossômicos, podem ser possíveis progenitores das enzimas determinadas por genes em plasmídeos (Jacoby, 2009).

As  $\beta$ -lactamases AmpC, tanto cromossomal (quando hiperproduzida) quanto mediada por plasmídeo, hidrolisam penicilinas, cefalosporinas de espectro estreito e estendido e cefamicinas e não são inibidas por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (Jacoby, 2009; Thomson, 2010). Estas enzimas têm sido encontradas em vários membros da família *Enterobacteriaceae* como *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis* e *E. coli* (Jacoby, 2009). As  $\beta$ -lactamases AmpC possuem vários integrantes, mas as mais encontradas são as das famílias CMY, FOX e DHA e estão sempre associadas a multirresistência (Thomson, 2010), dentre essas, a enzima AmpC mais comum é CMY-2 (Jacoby, 2009).

Os plasmídeos carreadores de genes para  $\beta$ -lactamases AmpC podem carrear outros genes para resistência de aminoglicosídeos, cloranfenicol, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclinas e ainda outras  $\beta$ -lactamases como TEM, SHV e CTX-M (Jacoby, 2009).

### 3.8 Metodologia fenotípica para detecção de bactérias produtoras de enzimas de resistência

Com o aumento da propagação e disseminação de genes de resistência vêm a urgência em identificar nos laboratórios clínicos e de pesquisa quais os mecanismos envolvidos nessa falha terapêutica aos  $\beta$ -lactâmicos. Uma opção barata, acessível que serve como opção às técnicas moleculares, são os métodos fenotípicos para detecção da produção de diversas  $\beta$ -lactamases, dentre esses se destacam o teste de Hodge Modificado (MHT), uma variação deste teste recém publicado é o teste de Hodge com o uso de Triton (THT) (Pasteran et al., 2015) e os testes de disco difusão (DD) com o uso de inibidores (Giske et al., 2010; Birgy et al 2012; CLSI, 2012; Nota técnica/ANVISA, 2013). Nesse sentido existem diversos trabalhos com amostras clínicas ou não fazendo o uso destes testes (Korzeniewska et al., 2013; Willems et al., 2013; Ribeiro et al., 2014; Stalder et al., 2014) e avaliando sua eficácia, sensibilidade e especificidade (Pasteran et al., 2009; Pasteran et al., 2010; Garrec et al., 2011; Osei Sekyere et al., 2015). Alguns desses testes também foram aplicados em *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria muitas vezes responsável por um alto índice de mortalidade (Inacio et al., 2014).

### 3.9 Disseminação de genes de resistência no Brasil

Até o momento, mais de 430 ESBL já foram caracterizadas no mundo, havendo descrição de muitas delas no Brasil. A disseminação dessas enzimas e o surgimento constante de novas variantes ocorrem de maneira muito rápida e desordenada. No Brasil, a produção de ESBL em Enterobacteriaceae é crescente, já que diversos tipos têm sido identificados no país: TEM, SHV, CTX-M, OXA, BES, GES e VEB (Silva & Lincopan, 2012).

A detecção de  $\beta$ -lactamases como ESBLs e carbapenemases tem sido relada em pesquisas em diferentes estados do Brasil tais como: Amazonas (Ferreira et al., 2011), Goiás (Santos et al., 2008), Maranhão (Carmo, et al., 2012), Minas Gerais (Mirarini, et al, 2007), Paraná (Nogueira et al., 2006; Pasta et al., 2008), Pernambuco (Monteiro, et al., 2009; Pavez, et al., 2009), Rio de Janeiro (Bonnet, et al., 2000), Rio Grande do Sul (Freitas, et al., 2003; Dienstmann, et al., 2010; Andrade et al., 2011; Meyer & Picoli, 2011; Oliveira et al., 2009; Oliveira, 2011; Ribeiro et al., 2012; Ribeiro, et al., 2013; Ribeiro et al., 2014), Santa Catarina (Zavascki et al., 2010), São Paulo (Dropa et al., 2009).

Com o aparecimento de novas variantes e o aumento da prevalência de ESBL em isolados de origem comunitária, ambiental e em alimentos de origem animal têm se demonstrado a complexidade em estabelecer a origem da resistência (Silva & Lincopan, 2012).

Oliveira (2011) detectou a presença resistência a ESBL (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub>) em amostras ambientais Gram-negativas.

Como as pesquisas na área ambiental são reduzidas, esse trabalho vem colaborar na elucidação dos possíveis mecanismos de resistência disseminados no meio ambiente e se estes são os mesmos encontrados em ambientes clínicos e hospitalares.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Um total de 131 isolados ambientais provenientes de esgoto hospitalar, água de rio (Rio dos Sinos), água de esgoto doméstico e pluvial (Arroio Dilúvio), compostagem (Departamento Municipal de Limpeza Urbana- DMLU) que fazem parte da coleção do Laboratório de Microbiologia da UFRGS, foram utilizadas neste estudo. Todos os isolados pertencem à família *Enterobacteriaceae*.

### 4.1 Análises Fenotípicas

#### 4.1.1 Teste de resistência a antimicrobianos-triagem:

O teste de resistência aos antimicrobianos foi realizado seguindo as normas preconizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) utilizando o método de difusão em disco de Kirby-Bauer. Cada isolado foi inoculado em TSB e incubado em estufa a 37°C até alcançar uma turbidez equivalente a 0,5 na escala de MacFarland (aproximadamente  $10^8$  UFC/mL). A amostra foi então semeada com o auxílio de um suabe estéril em placas contendo meio ágar Müller Hinton. Os discos contendo os antimicrobianos foram distribuídos sobre as placas e as mesmas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 16/18h. Após esse período foi realizada a medida dos halos de inibição. Para a validação do teste foi utilizada a linhagem padrão *Escherichia coli* ATCC 25922. Os antimicrobianos que foram utilizados: cefotaxima (30µg), cefpodoxima (10µg), ceftazidima (30µg), ertapenem (10µg),

meropenem (10µg), aztreonam (30µg). Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.1.2 Análises fenotípicas para detecção de β-lactamase

As amostras que apresentaram resistência a algum dos antimicrobianos no método de difusão em disco foram submetidas aos demais testes fenotípicos.

##### 4.1.2.1 Teste de Hodge Modificado (MHT)

Os isolados que apresentaram perfil intermediário ou resistente para o ertapenem e ou meropenem no antibiograma foram selecionados para a detecção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e outras carbapenemases pelo ensaio MHT.

Uma cepa de *E. coli* (25922) ATCC foi inoculada em caldo caldo tripton de soja (TSB) e incubado em estufa a 35°C ± 2 até alcançar uma turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland. Placas contendo meio de cultura ágar Müller Hinton foram semeadas com esse caldo com o auxílio de um suabe. No centro da placa foi disposto um disco de antibiótico carbapenêmico (meropenem) e a partir deste foram realizadas estrias com o isolado a ser testado e, posteriormente, incubado *overnight* (16-20h) a 35°C ±2. Como resultado positivo observa-se uma zona de inibição distorcida. A interpretação foi realizada como preconiza o CLSI (CLSI, 2012).

##### 4.1.2.2 Testes fenotípicos para detecção de ESBLs, AmpCs e Carbapenemase:

Para todos os testes fenotípicos a seguir o método de inoculação, diluição e semeadura foram os mesmos trocando somente o inibidor (Tabela 01). Portanto, os

isolados foram inoculados em solução salina 0,9% até alcançar uma turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland. A amostra foi então semeada com o auxílio de um suabe estéril em placas contendo meio ágar Müller Hinton. Os discos de antimicrobianos utilizados nos testes de detecção foram o imipenem e o meropenem com e sem inibidor, enquanto que para o teste de confirmação de ESBL os antimicrobianos utilizados foram a ceftazidima e a cefotaxima com e sem o inibidor. Os discos foram então distribuídos na placa, um ao lado do outro e incubados em estufa por 16-18h a 35°C ±2.

Tabela 01. Testes fenotípicos e seus respectivos inibidores.

Testes fenotípicos	Inibidor
Teste fenotípico para detecção de carbapenemases	Ácido fenilborônico 40mg/mL
Teste fenotípico para detecção de Metallo- $\beta$ -lactamase (MBL)	Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,1 M
Teste fenotípico para detecção de AmpC	Cloxacilina 75mg/mL
Teste fenotípico para confirmação de Extended-Spectrum $\beta$ -lactamase (ESBL)	Ácido clavulânico

Fonte: Nota técnica/ANVISA, 2013; CLSI,2012.

## 4.2 Análises Genotípicas

### 4.2.1 Extração de DNA:

A extração de DNA foi realizada de acordo com as indicações do fabricante do Kit de extração Wizard Genomic DNA purification (Promega).

### 4.2.2 Identificação molecular das amostras por sequenciamento da região 16S rDNA:

Os isolados que apresentaram resultado positivo em algum dos testes fenotípicos foram submetidos à identificação molecular em nível de espécie através da amplificação da região 16S rDNA pela técnica da reação em cadeia da

polimerase (PCR). Os *primers* utilizados encontram-se descritos na Tabela 02. As condições de amplificação foram realizadas de acordo com Garbeva et al., (2003).

Os produtos de PCR foram observados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (10mg/mL). O marcador Ladder 100pb foi utilizado para verificar se o tamanho do fragmento amplificado através da PCR está de acordo com o esperado.

Os produtos amplificados foram purificados com o kit PureLink Quick Gel Extraction & PCR Purification e encaminhados para sequenciamento na empresa Ludwig Biotecnologia.

Tabela 02- Oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados para o sequenciamento da região 16S rDNA dos isolados

Nome	Sequência (5'-3')	T <sub>m</sub>	Posição **	Referência
BacPaeF (pA*)	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	54,3°C	8-28	Stackebrandt & Liesack (1993)
Bac1542R (1542R*)	AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC	56,7°C	1525-1542	Edwards et al., 1989

\* nome citado na referência; \*\* com base em *E. coli*

#### 4.2.3 Identificação molecular dos genes de resistência aos β-lactâmicos:

Os isolados foram submetidos à identificação dos genes de resistência através da técnica da reação em cadeia da polimerase (Multiplex PCR). Os *primers* utilizados foram descritos por Dallenne et al., (2010) (Tabela 03). Os autores desenharam os *primers* para PCR Multiplex abrangendo as mais importantes classes de β-lactamases em Enterobacteriaceae. As condições de amplificação utilizadas seguiram a informação disponibilizada pelos mesmos autores.

Para confirmar e identificar os genes de β-lactamase que foram amplificados através da PCR Multiplex, foi realizado a análise das sequências dos

*amplicons* de DNA. Para tanto os *amplicons* foram purificados com o kit PureLink Quick Gel Extraction & PCR Purification- Invitrogen e encaminhados para sequenciamento na empresa Ludwig Biotec usando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

#### 4.2.4 Pulsed-Field Gel Electrophoresis analysis (PFGE):

A análise da similaridade genética dos isolados positivos para  $\beta$ -lactamase foi realizada através da análise de macrorrestrição de DNA usando a enzima *Xba*I (Promega) seguido de eletroforese em campo pulsado (PFGE), utilizando o CHEF DRII apparatus (Bio-Rad). Os resultados foram analisados através do software BioNumerics v. 6.5 (Applied Maths). Os dendrogramas foram construídos usando o Coeficiente de Dice, com similaridade de 85% tolerância de 1,5% e otimização de 1,5%.

Tabela 3- Oligonucleotídeos iniciadores para as reações de PCR

Multiplex:

Nome	$\beta$ -lactamases*	Sequência (5'-3')	Posição de anelamento	Temperatura de anelamento
Multiplex I	TEM	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC <sup>f</sup> CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC <sup>r</sup>	13-34 812-791	60°C
	SHV	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC <sup>f</sup> ATCCCGCAGATAAATCACCCAC <sup>r</sup>	71-91 783-763	
	OXA	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG <sup>f</sup> GACCCCAAGTTTCTGTAAAGTG <sup>r</sup>	201-222 764-743	
Multiplex II CTX-M	Grupo 1	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA <sup>f</sup> CGATATCGTTGGTGGTRCCAT <sup>r</sup>	61-80 748-728	60°C
	Grupo 2	CGTTAACGGCACGATGAC <sup>f</sup> CGATATCGTTGGTGGTRCCAT <sup>r</sup>	345-362 748-728	
	Grupo 9	TCAAGCCTGCCGATCTGGT <sup>f</sup> TGATTCTCGCCGCTGAAG <sup>r</sup>	299-317 859-842	
	Grupo 8	AACRCRCAGACGCTCTAC <sup>f</sup> TCGAGCCGGAASGTGYAT <sup>r</sup>	172-189 497-479	
Multiplex III AmpC	ACC	CACCTCCAGCGACTTGTTAC <sup>f</sup> GTTAGCCAGCATCACGATCC <sup>r</sup>	744-763 1089-1070	60°C
	FOX	CTACAGTGCGGGTGGTTT <sup>f</sup> CTATTTGCGGCCAGGTGA <sup>r</sup>	396-413 557-540	
	MOX	GCAACAACGACAATCCATCCT <sup>f</sup> GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA <sup>r</sup>	3-23 900-879	
	DHA	TGATGGCACAGCAGGATATTC <sup>f</sup> GCTTTGACTCTTTCCGGTATTCCG <sup>r</sup>	113-133 1109-1088	
	CMY	CGAAGAGGCAATGACCAGAC <sup>f</sup> ACGGACAGGGTTAGGATAGY	570-589 1107-1088	
	ACT e MIR	CGGTAAAGCCGATGTTGCC <sup>f</sup> AGCCTAACCCTGATACA <sup>r</sup>	189-207 871-854	
Multiplex IV	GES	AGTCGGCTAGACCGGAAAG <sup>f</sup> TTTGTCCGTGCTCAGGAT <sup>r</sup>	463-481 861-844	60°C
	PER	GCTCCGATAATGAAAGCGT <sup>f</sup> TTCGGCTTGACTCGGCTGA <sup>r</sup>	325-343 844-826	
	VEB	CATTTCCCGATGCAAAGCGT <sup>f</sup> CGAAGTTTCTTTGACTCTG <sup>r</sup>	187-206 834-815	
Multiplex V Carbapenemase	GES	AGTCGGCTAGACCGGAAAG <sup>f</sup> TTTGTCCGTGCTCAGGAT <sup>r</sup>	463-481 861-844	57°C
	OXA-48	GCTTGATCGCCCTCGATT <sup>f</sup> GATTTGCTCCGTGGCCGAAA <sup>r</sup>	230-247 490-510	
Multiplex VI Carbapenemase	IMP	TTGACACTCCATTTACDG <sup>f</sup> GATYGAGAATTAAGCCACYCT <sup>r</sup>	194-211 332-313	55°C
	VIM	GATGGTGTGGTGGTGGTGCATA <sup>f</sup> CGAATGCGCAGCACCAG <sup>r</sup>	151-169 540-524	
	KPC	CATTC AAGGGCTTTCTTGCTGC <sup>f</sup> ACGACGGCATAGTCATTTGC <sup>r</sup>	209-230 746-727	

\*-  $\beta$ -lactamases e suas variantes; <sup>f</sup> - *Primer forward*; <sup>r</sup> - *Primer reverse*  
Referência: Dallenne et al., (2010).

## 5. ARTIGOS

### 5.1 Artigo 1- Aceito para publicação na *Current Microbiology*.

Phenotypic Tests for the detection of  $\beta$ -lactamases producing *Enterobacteriaceae* isolated from different environments.

Doi: 10.1007/s00284-016-1036-6

5.2 Artigo 2- Enviado para publicação na revista *Microbial Ecology*

Genetic background of  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* isolates from environmental samples



## 6. DISCUSSÃO GERAL

Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível evidenciar a disseminação de genes de resistência a  $\beta$ -lactâmicos entre isolados ambientais da família *Enterobacteriaceae*. Para tanto, 131 isolados passaram por uma triagem através da avaliação de seu perfil de suscetibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos utilizando o método de disco difusão (CLSI, 2012). Destes 62 apresentaram uma diminuição de sensibilidade a pelo menos um antimicrobiano. Dentro da classe dos carbapenêmicos, o antimicrobiano menos eficaz foi o ETP com 45,16% de isolados resistentes. O ertapenem é um carbapenêmico de amplo espectro que normalmente possui atividade contra todas as *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL ou AmpC, já que essas enzimas sozinhas não conseguem hidrolisar esses antibióticos. Esta resistência está associada com deficiência da porina de membrana em combinação com a expressão de  $\beta$ -lactamase, com uma variedade de deleções, mutações pontuais e mecanismos desconhecidos que podem conduzir à perda de expressão da porina. O fato de o carbapenêmico ertapenem ser mais afetado do que outros carbapenêmicos pode ser explicado devido ao seu tamanho maior e por possuir carga mais negativa, o que ocasiona uma penetração mais lenta do antimicrobiano através de porinas menores que devem realizar o trabalho quando as porinas principais são perdidas ou sofrem algum tipo de modificação (Doumith et al., 2009; Yang et al., 2011). Um estudo realizado com *Enterobacter* sp. apontou como possível causa de resistência ao ETP a presença de  $\beta$ -lactamases e não a deficiência das porinas na membrana (Yang et al., 2011).

O antimicrobiano  $\beta$ -lactâmico menos eficaz foi a cefpodoxima (CPD), uma

cefalosporina de 3<sup>a</sup> geração, para o qual 91,94% dos isolados foram resistentes. A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos pode estar relacionada com a produção de enzimas capazes de hidrolisar esses fármacos. Dentre elas estão as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), sendo este o mecanismo mais comum e preferencial de resistência em bactérias Gram-negativas (Paterson & Bonomo, 2005; Bush & Jacoby, 2010; Rawat & Nair, 2011).

Com relação aos testes fenotípicos, 64,52% dos isolados foram positivos a pelo menos um teste. O MHT tem sido sugerido como um método útil para detectar a produção de carbapenemases em enterobactérias por ser um teste barato e acessível a todos os laboratórios clínicos e de pesquisa. No entanto, a sua especificidade e sensibilidade não são garantidas, sendo este um teste passível de erro de interpretação (Nordmann et al., 2012a; Nordmann et al., 2012b). O teste MHT não permite distinguir entre as classes de carbapenemases que são produzidas (Willems et al., 2013), e, portanto, não é um teste específico para detecção exclusiva de KPCs (Ribeiro et al., 2014; Nordmann et al., 2012b), e mesmo quando usado para carbapenemase é prudente uma confirmação e/ou a realização de testes complementares (Giske et al., 2011; CLSI 2012).

Neste trabalho a isolado positivo para MHT (28HC ou 46) foi confirmado quanto a presença da carbapenemase tipo KPC-2 e as outros três isolados com resultados inconclusivos (HCC2 ou 29, HCC13 ou 45, HCI10 ou 24) também confirmaram a presença de KPC-2 através da PCR Multiplex seguida por sequenciamento. Isolados com um alto nível de AmpC podem apresentar um resultado positivo para o teste de Hodge (dito como falso positivo) (Munoz-Price et al., 2013). Giske et al. (2011) somaram ao resultado falso positivo além da produção de AmpC, a perda de porina. Esse fato poderia explicar os dois isolados que não

foram confirmados com carbapenemases (HCC7 ou 35 e HCC8 ou 36), ambos portadores das  $\beta$ -lactamases TEM-1 e SHV-5, porém se faz necessário análises complementares. Cabe ressaltar que os seis isolados (HCC2 ou 29, HCC7 ou 35, HCC8 ou 36, HCC13 ou 45, HCI10 ou 24, 28HC ou 46) são oriundas do esgoto hospitalar.

Diferentes autores detectaram vários mecanismos de resistência ocorrendo concomitantemente (Cantón et al., 2012; Giske et al., 2011; Meyer e Picoli, 2011; Dienstmann et al., 2010). Giske et al. (2011), avaliaram o desempenho do teste fenotípico com APB em 34 isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC oriundas de diversos países. Os autores detectaram a positividade do teste em todas as amostras, demonstrando uma sensibilidade e especificidade no teste de 100% e 98%, respectivamente. Especificidade esta que também foi descrita pela Nota técnica nº01/2013 da ANVISA. No entanto, o presente trabalho não foi possível confirmar 20 dos 25 isolados positivos para este teste ou seja 80% de sensibilidade. Importante lembrar que o teste com ácido fenilborônico (APB) vem sendo aplicado para detecção de outras enzimas, além de carbapenemases, como o caso da  $\beta$ -lactamases AmpC (Meyer & Picoli, 2011). Estudos relatam que em amostras positivas para testes fenotípicos para KPC e negativas para ESBL e AmpC, há a confirmação da produção de carbapenemases (Munoz-Price et al., 2013; Birgy et al., 2012). Com este perfil, o presente estudo apresentou quatro isolados, no entanto, somente três foram confirmados nas análises moleculares (HCI13 ou 3, HCI12 ou 9, 4EC06 ou 19).

Dentro do grupo das carbapenemases, as enzimas GES e KPC são descritas como codificadas e propagadas por plasmídeos transferíveis os quais podem carrear genes de resistência a outras classes de antimicrobianos (Quenan &

Bush, 2007; Nordmann, 2014). No Brasil a KPC-2 é considerada endêmica e sua primeira detecção ocorreu em 2006 em *K. pneumoniae* oriundas de amostras de sangue de pacientes hospitalizados no CTI de um hospital de Recife por Monteiro et al. (2009). Esta mesma cepa já foi identificada em outros ambientes não clínicos (Chagas et al., 2011) assim como o nosso trabalho. O tipo GES/ Carbapenemase foi detectado no Brasil em 2008 também em uma *K. pneumoniae* isolada de um paciente que deu entrada em um hospital privado em São Paulo com pneumonia (Picão et al., 2010), relato esse também descrito como o primeiro caso desta enzima no Continente Americano. O tipo GES-4 está entre os membros desta família que tem atividade enzimática contra carbapenêmicos (GES/ Carbapenemase), juntamente com GES-2, GES-5, GES-6, GES-11, GES-14 e GES-18 (Queenan & Bush 2007; Picão et al., 2010; Lupo et al., 2013).

Ainda sobre os testes fenotípicos, alguns estudos têm relatado que o teste para detecção de MBLs com o uso do EDTA possui 100% de sensibilidade (Giske et al. 2011; Birgy et al., 2012). Neste trabalho os oito isolados positivos com este teste, nenhum foi confirmado na técnica de PCR Multiplex. A presença de  $\beta$ -lactamase do tipo AmpC também tem sido identificada em todo o mundo, mas ainda é menos comum que outras enzimas causadoras de resistência como as ESBLs (Jacoby, 2009), porém muitas vezes ocorrem associadas a elas (Sheng et al., 2013; Rugini et al., 2015). Esse fenótipo ficou evidente neste trabalho com o único isolado positivo para este teste, uma *Enterobacter* sp. (HC110 ou 24). Essa coprodução também já foi constatada em outro trabalho (Sheng et al., 2013).

Garrec et al. (2011) avaliaram nove testes fenotípicos quanto à eficácia em detectar/confirmar as produtoras de ESBL em 107 amostras de *Enterobacteriaceae*, destas 52 foram identificadas como positivas para ESBL

através de testes fenotípicos e somente uma não foi confirmada por PCR. Nossos resultados confirmaram a presença de  $\beta$ -lactamase em 30 dos 34 isolados previamente detectados como positivos no teste confirmatório para ESBL. No entanto, o gene mais prevalente foi o TEM-1 que, apesar da prevalência, não é uma ESBL, pois não é capaz de hidrolisar oximinocefalosporinas ou aztreonam (Paterson & Bonomo, 2005; Kiratisin et al., 2008), assim como o tipo SHV-1. No Brasil a família de  $\beta$ -lactamase mais frequentemente isolada é a CTX-M, sendo os grupos CTX-M-2, CTX-M-8 e o CTX-M-9 os mais abundantes (Silva & Lincopan, 2012). A CTX-M-8 é uma ESBL com alto poder de propagação e disseminação entre bactérias Gram-negativas da família *Enterobacteriaceae*. Este grupo foi identificado no Brasil, nesta família de bactérias no ano 2000 em pacientes internados em um hospital do Rio de Janeiro (Bonnet, 2000). O referido grupo (CTX-M-8) foi detectado nos nossos isolados. A coprodução de CTX-M e TEM no mesmo organismo foi relatado em um estudo com *K. pneumoniae* isolada de diferentes hospitais no Brasil (Chagas et al., 2011) e também foi detectada neste trabalho.

Fica claro a importância do uso de técnicas moleculares, como PCR Multiplex e posterior sequenciamento dos amplicons, para confirmação dos isolados portadores de genes de resistência. Uma vez que é necessário uma detecção elucidativa diante de tantos mecanismos de resistência para que se possa utilizar fármacos capazes de tratar as infecções causadas pelos microrganismos que carregam esses genes de resistência. A técnica de PCR Multiplex utiliza um conjunto de vários oligonucleotídeos iniciadores para detectar vários genes simultaneamente, com sensibilidade e especificidade de 100% (Doyle et al. 2012), possibilitando dessa maneira a investigação de um maior número de genes na mesma reação. Também é uma técnica genotípica considerada padrão ouro para

esse tipo de investigação e detecção (Van Der Zee et al., 2014).

Com relação ao contexto genético, a técnica de tipagem molecular (PFGE) é essencial para determinar se organismos epidemiologicamente relacionados são também geneticamente relacionados e ainda auxiliam na detecção de surtos e na identificação de transmissão cruzada (Porto et al., 2014). Algumas bactérias pertencentes ao mesmo grupo clonal (K1 ou K2 ou K3) apresentaram diferentes perfis na análise por PCR multiplex, isto pode ser explicado a partir do fato que esses genes de resistência se encontram muitas vezes em elementos genéticos móveis e que o próprio ambiente propicia a troca de informações. Cabe ressaltar que essas bactérias foram isoladas da mesma amostra de água de esgoto hospitalar, porém de meios de cultura diferentes. Além disso essas amostras apresentaram positividade nos diferentes testes fenotípicos para produção de  $\beta$ -lactamase a que foram submetidas (Oliveira & Van Der Sand, 2016), sugerindo que a diferença do resultado fenotípico para o resultado genotípico pode estar relacionado com fatores como mutações, alterações na permeabilidade da membrana e regulação da expressão do gene (Andrade et al., 2014).

Neste trabalho foi possível verificar que membros da família *Enterobacteriaceae*, tais como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Enterobacter* sp. isolados de amostras ambientais, tanto de esgoto hospitalar quanto das águas de Arroio Dilúvio, apresentaram perfis positivos aos diferentes testes fenotípicos para detecção de produção de enzimas  $\beta$ -lactamase.

Fica clara a urgência em monitorar amostras ambientais, pois onde existe a presença de amostras produtoras  $\beta$ -lactamases essas podem atuar como reservatórios de genes de resistência a antimicrobianos de diversas classes e esses genes podem ser transferidos horizontalmente a outros isolados sejam eles

ambientais ou clínicos, independentemente da espécie.

## 7. CONCLUSÃO

7.1 Enterobactérias resistentes aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos (cefalosporinas e aos carbapenêmicos) foram encontradas tanto nas amostras do esgoto hospitalar quanto nas amostras do Arroio Dilúvio;

7.2. Enterobactérias carregando genes de resistência para as  $\beta$ -lactamases: ESBLs (SHV-5, CTX-M-8), Carbapenemases (KPC-2) e AmpC (ACT-1/MIR-1) puderam ser identificadas nas águas do esgoto hospitalar e do Arroio Dilúvio;

7.3. Isolados de *K. pneumoniae* carregando genes de resistência apresentaram similaridades podendo ter uma origem comum e não foi possível constatar similaridade genética ente os isolados de *Enterobacter* sp.



## 8. REFERÊNCIAS

- Amos GCA, Hawkey PM, Gaze WH, Wellington EM. 2014. Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. *Chemotherapy* 69:1785-1791. doi:10.1093/jac/dku079
- Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA & other authors. 2011. Dissemination of bla KPC-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. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 3579–3583.
- Andrade LN, Vitali L, Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, Martinez R, Darini ALC. 2014. Expansion and Evolution of Virulence, Extensively Drug-Resistant (Polymixin B-Resistant), QnrS1-, CTX-M2, and KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* International High-Risk Clone. *J Clin Microbiol*. doi:10.1128/JCM.02580-15
- Batista, M. V. A.; Santos, M. I. S.; Menezes, L. C. S.; Carneiro, M. R. P.; Cândido, A. L. 2007 Enterobacteriaceae e Pseudomonas sp. Multiresistentes isoladas de efluentes urbanos em Aracaju, Sergipe. *Biologia Geral e Experimental, São Cristóvão, SE* 7(1):15-18.
- Birgy, A.; Bidet, P.; Genel, N.; Doit, C.; Decré, D.; Arlet, G.; Bingen, E. 2012. Phenotypic Screening of Carbapenemases and Associated  $\beta$ -Lactamases in Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 50(4):1295.
- Bonnet, R.; Sampaio, J. L.; Labia, R.; De Champs, C.; Sirot, D.; Chanal, C.; Sirot, J. 2000. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44:1936–1942.
- Braford, Patrícia. 2001. Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. p. 933–95.
- Brigotti M., Tazzari P. L., Ravanelli E., Carnicelli D., Barbieri S., Rocchi L., Arfilli V., Scavia G., Ricci F., Bontadini A., Alfieri R. R., Petronini P.G., Pecoraro C., Tozzi A. E., Caprioli A. 2010. Endothelial damage induced by Shiga toxins delivered by neutrophils during transmigration. *J Leukoc Biol*. 6: 715-20.
- Bush K. 2013. Proliferation and significance of clinically relevant  $\beta$ -Lactamases. *Ann N Y Acad Sci*. doi: 101111/nyas.12023
- Bush, K.; Jacoby, G. A.; Medeiros, A. A. 1995. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 39, n. 6, p. 1211-33.
- Bush, K. & Jacoby, G. A. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. p. 969–976, Mar. 2010.
- Cantón, R., Akóva, M., Carmeli, Y., Giske, C. G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D. M., Miriagou, V., Naas, T., Rossolini, G. M., Samuelsen, Ø., Seifert, H., Woodford, N., Nordmann, P. 2012. the European Network on carbapenemase. Rapid evolution and spread of carbapenemase among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect*; 18:413-431.
- Carmo, M. S., Marques, A. M., Gonçalves, L. H. B., Ferro, T. A. F., Monteiro, C. A., Bomfim, M. R. Q., Turri, R. J. G., Monteiro-Neto, V., Figueiredo, P. M. S. 2012. Deteção de betalactamases de espectro estendido (ESBL) em

- isolados de *Escherichia coli* uropatogênicas (UPECS) oriundos de pacientes da comunidade. Rev Pat Trop; 41:419-426.
- Chagas TPG, Seki LM, Cury JC, Oliveira JAL, Dávila AMR, Silva DM, Asensi MD. 2011. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. J Applied Microbiol. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05072.x
- Chouchani C, Marrakchi R, Ferchichi L, El Salabi A, Walsh T. 2011. VIM and IMP metallo- $\beta$ -lactamases and other extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from environmental samples in a Tunisia hospital. APMIS 119: 725-732.
- Chroma, M. & Kolar, M. 2010. Genetic methods for detection of antibiotic resistance: Focus on extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic. 154(4):289–296.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22th informational supplement," Approved Document M100-S22, CLSI, Wayne, PA.
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., Arlet, G. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -Lactamases in Enterobacteriaceae. J antimicrob chemother. 65: 490-495.
- Dienstmann, R.; Picoli, S.; Meyer, G.; Schenkel, T.; Steyer, J. 2010. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. J Bras Patol Med Lab, v.46, n.1, p. 23-27.
- Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JDD. 2012. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce Carbapenemase. J Clin Microbiol. 50(12): 3877-3880. Doi: 10.1128/JCM.02117-12
- Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. 2009. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. J Antimicrob Chemother. 63: 659-667. Doi: 10.1093/jac/dkp029
- Dropa, M.; Balsalobre, L. C.; Lincopan, N.; Mamizuka, E. M.; Murakami, T.; Cassettari, V. C.; Franco, F.; Guida, S. M.; Balabakis, A. J.; Passadore, L. E.; Santos, S. R.; Matté, G. R.; Matté, M. H. 2009. Extended-Spectrum-beta-lactamases among Enterobacteriaceae isolated in a public hospital in Brazil. Revista Instituto Medicina Tropical. 51(4):203-209.
- Dropa, M. 2006. Caracterização Genotípica De Cepas Da Família Enterobacteriaceae produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública/ USP.
- Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., Stratchounski, L. 2003. Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 3724–3732pg.
- Edwards, U; Rogall, T; Blockerl, H; Emde, M; Bottger, Ec. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Research 17(19):7843-7853.
- Ferreira, C. M., Ferreira, W. A., Almeida, N.C.O.S., Naveca, F. G., Barbosa, M. G.

- V. 2011. Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria isolated from hematologic Patients in Manaus, state of Amazonas, Brazil. *Braz J Microbiol*; 42: 1076-1084.
- Freitas, A. L. P.; Machado, D. P.; Soares, F. S. C.; Barth, A. L. 2003. Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella spp* and *Escherichia coli* obtained in a Brazilian teaching hospital: Detection, prevalence and molecular typing. *Braz J Microbiol* 92, 34: 344-248.
- Garbeva, P.; Van Veen, J.A.; Van Elsas, J.D. 2003. Predominant *Bacillus spp.* In agricultural soil under different management regimes detected via PRC-DGGE. *Microbial Ecology*; 45, 302-316.
- Garrec, H.; Drieux-Rouzer, L.; Golmard, J.L.; Jarlier, V.; Robert, J. 2011. Comparison of Nine Phenotypic Methods for Detection of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase Production by Enterobacteriaceae. *J clin microbiol*, Mar. 2011, p. 1048–1057
- Giakkoupi, P., Papagiannitis, C. C., Miriagou, V., Pappa, O., Polemis, M., Tryfinopoulou, K., Tzouvelekis, L. S.; Vatopoulou-Satopoulos, A. C. 2011. An update of the evolving epidemic of bla<sub>KPC-2</sub> –carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009–10). *J Antimicrob Chemother* 66, 1510–1513.
- Giske, C. G., Gezelius, L., Samuelsen, Ø., Warner, M., Sundsfjord, A., Woodford, N. 2011. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin *Clin Microbiol Infect* 17:55-556.
- Henriques, I.; Moura, A.; Alves, A.; Saavedra, M. J.; Correia, A. 2006. Analysing diversity among  $\beta$ -lactamase encoding genes in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 56: 418–429.
- Hernández J, Stedt J, Bonnedahl J, Molin Y, Drobni M, Calisto-Ulloa N, Gomez-Fuentes C, Astorga-España MS, González-Acuña D, Waldenström J, Blomqvist M, Olsen B. 2012. *Appl Environ Microbiol.* 78:2056. 10.1128/AEM.07320-11
- Hernandez J, Johansson A, Stedt J, Bengtsson S, Porczak A, Granholm S, González-Acuña D, Olsen B, Bonnedahl J, Drobni M. 2013. Characterization and comparison of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) resistance genotypes and population structure of *Escherichia Coli* isolated from Franklin's Gulls (*Leucophaeus Pipixcan*) and humans in Chile. *PLOS ONE*.8: e76150. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0076150
- Hong, S. S., Kim, K., Huh, J. Y., Jung, B., Kang, M. S., Hong, S. G. 2012. Multiplex PCR for Rapid Detection of Genes Encoding Class A Carbapenemases. *Ann Lab Med*; 32: 359-361.
- Inacio HSM, Bomfim MR, França RO, Farias LM, Carvalho MA, Serufo JC, Santos SG. 2014. Phenotypic and genotypic diversity of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections recovered in the Hospitals of Belo Horizonte, Brazil. *Chemotherapy.* 60: 54-62. doi: 10.1159/000365726
- Jacoby, G. A. 2009. AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev*, v.22, n. 1, p. 161-82.
- Jones, C. H.; Tuckman, M.; Keeney, D.; Ruzin, A.; Bradford, P. A. 2009. Characterization and sequence analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. *Antimicrob agents chemother.* 465-475pg.

- Kiratisin T, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P (2008) Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrob Agents Chemother* 2818-2824
- Kohanski, M. A.; Dwyer, D. J.; Collins, J. J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature reviews: Microbiology*. Vol 8. 423-435.
- Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Schreckenberger, P. C.; Winn, W. C. 2001. *Diagnóstico Microbiológico– Texto e Atlas colorido*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Medsi.
- Korzeniewska E, Harnisz M. 2013. Beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospital effluents. *Journal of Environmental Management*, 123, 1-7.
- Korzeniewska E, Korzeniewska A, Harnisz M. 2013. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 91: 96-102. [dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.014](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.014)
- Kümmerer, Klaus. 2004. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54: 311-320.
- Kümmerer, Klaus. 2009. Antibiotics in the aquatic environment- A review- Part I. *Chemosphere* 75: 417–434. a
- Kümmerer, Klaus. 2009. Antibiotics in the aquatic environment- A review- Part II. *Chemosphere* 75: 435-441. b
- Kümmerer, K. & Henninger, A. 2003. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. *Clin Microbiol Infect*.
- Lee, G. C. & Burgess, D. S. 2012. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*; 11:32.
- Li, X. Z.; Mehrotra, M.; Ghimire, S.; Adewoye, L. 2007.  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary Microbiology*, 121:197-214.
- Little, M. L., Qin, X., Zerr, Weissman, S. J. 2012. Molecular diversity in mechanisms of carbapenem resistance in paediatric Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents*; 39 (1): 52-57.
- Livermore DM. 2009. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother*. doi:10.1093/jac/dkp255
- Loncaric I, Stalder GL, Mehinagic K, Rosengarten R, Hoelzl F, Knauer F, Walzer C. 2013. Comparison of ESBL – and AmpC producing *Enterobacteriaceae* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from migratory and resident population of Rooks (*Corvus frugilegus*) in Austria. *PLOS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0084048
- Lupo A, Papp-Wallace K M, Sendi P, Bonomo R A, Endimiani A. 2013. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Diag Microbiol Infect Dis*. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.001
- Martins, A., Hunyadi, A., Amaral, L. 2013. Mechanisms of Resistance in Bacteria: An Evolutionary Approach. *The Open Microbiology Journal*, 7, (Suppl 1-M4) 53-58.
- Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. 2015. The role of epidemic plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol*. doi:10.1128/CMR.00116-14
- Monteiro, J., Santos, A. F., Asensi, M. D., Peirano, G., Gales, A. C. 2009. First

- report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:333–334.
- Mayer, L. E., Hörner, R., Tizotti, M. K., Martini, R., Roehrs, M. C. S. M., Kempfer, C. B. 2012. Evaluation of bacterial growth inhibition by mercaptopropionic acid in metallo- $\beta$ -lactamase detection on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Rev Bras Med Trop.* 45 (2): 253–254.
- Meletis, G., Tzampaz, E., Protonotariou, E., Sofianou, D. (2010). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying bla<sub>VIM</sub> and bla<sub>KPC</sub> genes. *HIPPOKRATIA*; 14, 2: 139-140.
- Meyer, G.; Picoli, S. U. 2011. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. *J Bras Patol Med Lab.* v.47,n. 1, p. 25-31.
- Minarini, L. A. R.; Gales, A. C.; Palazzo, I. C. V.; Darini, A. L. C. 2007. Prevalence of Community-Occurring Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Brazil. *Current Microbiol*, Vol. 54, 335–341.
- Monteiro, J., Santos, A. F., Asensi, M. D., Peirano, G., Gales, A. C. 2009. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:333–334.
- Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. 2013. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 13: 785–796
- Nogueira, K. S.; Higuti, I. H.; Nascimento, A. J.; Terasawa, L. B.; Oliveira, S.; Matos, A. P.; Souza, H. A.; Cogo, L. L.; Costa, L. M. D. 2006. Occurrence of Extended-Spectrum-Beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from hospitalized in Curitiba, southern Brazil. *Braz J Infec Dis.* 10(60): 390-395.
- Nordmann, P., Naas, T., Poirel, L. 2011. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infections Diseases.* Vol 17, n10.
- Nordmann, P., Poirel, L., Dortet, L. 2012. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infections Diseases.* Vol 18, n9. a
- Nordmann, P., Gniadkowski, M., Giske, C. G., Poirel, L., Woodford, V. and the European Network on carbapenemase. 2012. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect*; 18: 432-438. b
- Nordmann, P., Poirel, L. 2013. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*; 68: 487-489.
- Nordmann P & Poirel L. 2014. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect.* doi: 10.1111/1469-0691.12719
- Nota Técnica Nº 01/2013. 2013. Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília.
- Oliveira, C. F.; Dal Forno, N. L. F.; Alves, I. A.; Horta, J. A.; Rieger, A.; Alves, S. H. 2009. Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* *Klebsiella spp* no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*, 42(5):556-560, set-out.
- Oliveira, DV. 2011. Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos de

- Bactérias Gram-negativas isoladas nas águas do arroio Dilúvio. Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente/UFRGS.
- Oliveira DV, Carvalho T S, Medeiros AW, Frazzon APG, Van Der Sand S. 2015.  $\beta$ -Lactamresistance genes in Gram Negative bacteria isolated from a stream in Porto Alegre. *Journal of Advanced Scientific Research*. 19-24.
- Oliveira DV & Van Der Sand ST. 2016. Phenotypic Tests For The Detection Of  $\beta$ -Lactamases Producing *Enterobacteriaceae* Isolated From Different Environments. *Current Microbiol*
- Osei Sekyere J, Govinden U, Essack SY. 2015. Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol*. 119: 1219-1233. doi: 10.1111/jan.12918
- Pasta AAC, Fração FA, Magalhães GLG, Quesada RMB. 2008. Prevalência e perfil de susceptibilidade antimicrobiana em cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), isoladas de pacientes do Hospital Universitário/UEL. *RBAC* 40(2):137-141
- Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. 2009. Sensitive Screening Tests for Suspected Class A Carbapenemase Production in Species of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 1631-1639. doi: 10.1128/JCM.00130-09
- Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. 2010. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of enterobacteriaceae by incorporating boronic Acid. *J Clin Microbiol*. 48;1323-32. doi: 10.1128/JCM.01771-09
- Pasteran F, Gonzalez LJ, Albornoz E, Bahr G, Vila AJ, Corso A. 2015. Triton Hodge Test: improved protocol for Modified Hodge Test for enhanced detection of NDM and other carbapenemase producers. *J Clin Microbiol*. doi:10.1128/JCM.01298-15
- Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. 2005. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*. 657-686.
- Pavez, M.; Mamizuka, E. M.; Lincopan, N. 2009. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2702.
- Picão RC, Santos AF, Nicoletti AG, Furtado GH, Gales A. 2010. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. doi: 10.1093/jac/dkq024
- Perez-Perez, F. J.; Hanson, N. D. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, v.40, 7n. 6, p. 2153-62.
- Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. 2007. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* 2:501-512.
- Porto JP, Batistão DWF, Ribas RM. 2014. Emergence of antibiotic-resistant bacterial strains, methicillin-resistant, and multi-drug resistance are problems similar to global warming. *Rev Soc Bras Med Trop* 47:817-818
- Queenan, A. M. & Bush, K. 2007. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*; p. 440–458.
- Rawat, D. & Nair, D. 2010. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram negative bacteria. *J Global Infect Dis*, vol 2. 263-273.
- Ribeiro, V. B.; Linhares, A. R.; Zavascki, A. P.; Barth, A. L. 2014. Performance of Quantification of Modified Hodge Test: An Evaluation with *Klebsiella*

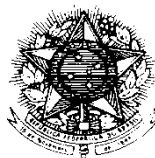
- pneumoniae* Carbapenemase- Producing Enterobacteriaceae Isolates. BioMed Research International, V. 2014, Article ID 139305.
- Ribeiro, V. B.; Andrade, L. N., Linhares, A. R.; Barin, J., Da Costa, A. L.; Zavascki, A. P.; Barth, A. L. 2013. Molecular characterization Fe *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Braz J Med Microbiol, 62, 1721–1727.
- Rugini CL, Sobottka AM, Fuentefria DB. 2015. Occurrence and sensitivity profile of extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae at a tertiary hospital in Southern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 48:692-698
- Santos, D. F.; Pimenta, F. C.; Alves, R.; Montalvão, E. R.; Santos, D. B.; Filho, J. R. C. 2008. Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in two hospitals in Goiânia/ Brazil: detection, prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing. Braz J Microbiol, 39:608-612.
- Sheng Wh, Badal Re, Hsueh Pr, Smart Program. 2013. Distribution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, ampc  $\beta$ -lactamases, and carbapenemases among enterobacteriaceae isolates causing intra-abdominal infections in the asia-pacific region: reults of the study for monitoring antimicrobial resistance trends (smart). Antimicrob agents chemother. doi: 10.1128/Aac.00971-12
- Silva & Lincopan. 2012. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. J Bras Patol Med Lab, v.48, n.2, p.91-99.
- Stackebrandt E & Liesack W. 1993. Nucleic Acids and Classification. Academic Press, London, UK.
- Stalder G, Loncaric I, Walzer C. 2014. Diversity of enterobacteria including  $\beta$ -lactamase producing isolates associated with the Spanish slug (*Arion vulgaris*). Science of the total Environmental. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.01.103
- Suárez C & Gudíol F. 2009. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 27(2):116-129. Doi: 10.1016/j.eimc.2008.12.001
- Sundsjord, A.; Simonsen, G. S.; Haldorsen, B. C.; Haaheim, H.; Hjelmevoll, S.; Littauer, P.; Dahl, K. H. 2004. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. APMIS, 112: 815-37.
- Tängdén T & Giske CG. 2015. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment an infection control. J Intern Med. 277:501-512. Doi: 10.1111/joim.12342
- Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. J Antimicrob Chemother 50 (5): 673-679.
- Thomson, K. 2010. Extended-Spectrum- $\beta$ -lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. J Clin Microbiol. p. 1019–1025.
- Van der Zee A, Roorda L, Bosman G, Fluit A, Hermans M, Smits P H M, Zanden A G M, Witt R, Coppensraet L, Stuart J C, Ossewaarde. 2014. Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. BMC Infect Dis 14:27
- Yang FC, Yan JJ, Hung KH, Wu JJ. 2011. Characterization of Ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese University Hospital. J Clin Microbiol. 223-226pg. Doi: 10.1128/JCM.01263-11

- Willems, E.; Verhaegen, J.; Magerman, K.; Nys, S.; Cartuyvels, R. 2013. Towards a phenotypic screening strategy for emerging  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacilli. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 41, 99-109.
- Woodford N, Wareham DW, Guerra B, Teale C. 2014. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? *J Antimicrob Chemother*. 69: 287–291. doi:10.1093/jac/dkt392
- Zavascki, A. P., Zoccoli, C. M., Machado, A. B., De Oliveira, K. R., Superti, S. V., Pilger, D. A., Cantarelli, V. V.; Barth, A. L. 2010. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting? *Int J Infect Dis* 14, e539–e540.
- Zhou, T., Zhang, X., Guo, M., Ye, Jianbo., Lu, Y., Bao, Qiyo, B., Chi, W. 2013. Phenotypic and molecular characteristics of carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* from a Teaching Hospital in Wenzhou, Southern China. *Jpn J Infect Dis*; 66, 96-102.



## **9. ANEXOS**

### 9.1 Convite para a banca examinadora



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Porto Alegre, 23 de Março de 2016.

Prezados Senhores:

Atendendo resolução da Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, temos a satisfação de convidar Vossa Senhoria para participar da Comissão Examinadora da apresentação do trabalho de tese ao qual deve submeter-se a aluna DANIELE VARGAS OLIVEIRA cujo título é "ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS AMBIENTAIS DA FAMÍLIA *ENTEROBACTERIACEAE* QUANTO À PRESENÇA DE GENES DE RESISTÊNCIA A  $\beta$ -LACTÂMICOS."

A apresentação realizar-se-á na seguinte data e local:

Data 06/04/16 (quarta-feira)

Horário: 09h30 min.

Local: Salão Nobre do ICBS

Atenciosamente,

Patricia Valente da Silva

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação  
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente