

GABRIELA DORN NÓBREGA

**INVESTIGAÇÃO DE BETA-LACTAMASES EM *Escherichia coli* E *Klebsiella* spp.
ISOLADAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS OBTIDAS DE UM HOSPITAL PÚBLICO
DE ENSINO DE CAMPO GRANDE, MS**

CAMPO GRANDE - MS

2012

GABRIELA DORN NÓBREGA

**INVESTIGAÇÃO DE BETA-LACTAMASES EM *Escherichia coli* E *Klebsiella* spp.
ISOLADAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS OBTIDAS DE UM HOSPITAL PÚBLICO
DE ENSINO DE CAMPO GRANDE, MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilene Rodrigues Chang

CAMPO GRANDE - MS

2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmã, por todo amor, carinho e pelos esforços dedicados para investir na minha educação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me guia e ilumina constantemente e me concedeu mais essa graça.

À minha mãe, pelo seu apoio, dedicação, palavras de consolo e de repreensão, que me impulsionaram a conquistar o bem mais valioso que tenho hoje, o estudo.

À minha irmã, que sempre esteve ao meu lado, sempre disposta a me ajudar.

Ao meu pai, pelo seu exemplo de inteligência e dedicação.

A todos da minha família, que sempre acreditaram em mim.

À minha orientadora, Marilene Rodrigues Chang, pelas orientações e pelos momentos de dedicação, mesmo em sua casa.

Aos funcionários do laboratório de pesquisas microbiológicas, que ajudaram preparando os meios de cultura e pela amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, que sempre nos passaram seus conhecimentos com muito carinho e paciência. Foi um privilégio tê-los como educadores.

A todos os amigos, em especial Deborah Ledesma Taira e Chrystiane Pasa, que foram companheiras em todos os momentos difíceis para a construção deste trabalho.

“A verdadeira riqueza de um homem é o bem que ele faz ao seu semelhante”.

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

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

A incidência de infecções originadas em ambientes hospitalares é bastante frequente e conhecida como infecção hospitalar (IH). Esse tipo de contaminação provoca sérios agravantes à saúde dos pacientes, tornando-os mais debilitados e expostos a novas doenças. O controle das IHs é dificultado quando as bactérias apresentam algum mecanismo de resistência ao uso do antibiótico adotado. No caso das bactérias Gram negativas, essa resistência geralmente é manifestada com a produção de enzimas beta-lactamases. Neste estudo investigou-se a produção de enzimas beta-lactamases em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., isoladas de pacientes atendidos em hospital público de ensino da cidade de Campo Grande-Mato Grosso do Sul. As amostras clínicas utilizadas na pesquisa foram coletadas no período de julho a dezembro de 2010 e caracterizadas por métodos fenotípicos padronizados. Os mecanismos de resistência pesquisados foram Beta-Lactamase de Espectro Estendido (ESBL) (16,1%), AmpC (5,5%) e *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) (5,5%). A espécie mais isolada foi *Escherichia coli* (73,6%). O estudo teve um caráter investigativo dos mecanismos de resistência, contribuindo dessa maneira para o diagnóstico das IHs, visando à melhoria das práticas hospitalares.

Palavras-chaves: Resistência bacteriana; Infecção hospitalar; Beta-lactamase.

ABSTRACT

NÓBREGA, G. D. Investigation of beta-lactamase in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolated from clinical specimens obtained in a public teaching hospital of Campo Grande, MS. Campo Grande-MS, 2013. [Dissertation Program Graduate Health and Development Midwest Region - Federal University of Mato Grosso do Sul].

The incidence of infections originated in hospitals is quite common and known as nosocomial infection (NI). This type of contamination causes serious aggravating the health of patients, making them weaker and further exposed to illness. The control of the IHS is hindered when the bacteria have some mechanism for resistance to the antibiotic adopted. In the case of Gram-negative bacteria, this resistance is often manifested in the production of beta-lactamase enzymes. This study investigated the production of beta-lactamase enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp., isolated from patients in public teaching hospital in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Clinical samples used in the research were collected from July to December 2010 and characterized by phenotypic methods standardized. Resistance mechanisms were surveyed Beta-Lactamase Extended Spectrum (ESBL) (16.1%), AmpC (5.5%) and *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) (5.5%). The most frequent species was *Escherichia coli* (73.6%). The study had an investigating mechanisms of resistance, thus contributing to the diagnosis of IHS aimed at improving hospital practices.

Keywords: Bacterial resistance; infection; Beta-lactamase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número e porcentagem de Enterobactérias segundo espécie e frequência, HU-UFMS, julho a dezembro - 2010 (n = 490).	32
Tabela 2 - Número e porcentagem de amostras estudadas segundo material biológico do isolamento e frequência, HU-UFMS, julho a dezembro - 2010 (n = 490).	32
Tabela 3 - Número e frequência de bactérias produtoras de beta-lactamases segundo espécie e mecanismo de resistência, HU-UFMS, julho a dezembro - 2010 (n = 490).	33
Tabela 4 - Número e frequência de resistência segundo antibióticos testados para bactérias produtoras de ESBL, HU-UFMS, julho a dezembro - 2010 (n = 79).	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Desenho esquemático da disposição de discos de antibióticos para pesquisa de ESBL e AmpC.....	26
Figura 2 Foto ilustrativa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> com teste fenotípico positivo para produção de ESBL..	28
Figura 3 Foto ilustrativa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> com teste fenotípico positivo para produção de AmpC beta-lactamase.	28
Figura 4 Foto ilustrativa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> com teste fenotípico positivo para produção de ambas beta-lactamases (ESBL e AmpC).	29
Figura 5 Foto ilustrativa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> com teste de Hodge modificado positivo para produção de carbapenemase.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Ácido Clavulânico
AF	Ágar Fosfatase
AFB	Ácido Fenil Borônico
AmpC	Beta-lactamase AmpC
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	Brain-Heart Infusion
CAZ	Ceftazidima
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CFO	Cefoxitina
CFO/AFB	Cefoxitina/ácido fenilborônico
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CTX	Cefotaxima
CTX/AC	Cefotaxima/ácido clavulânico
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ERT	Ertapenem
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
HU	Hospital Universitário

IH	Infecção Hospitalar
IRAs	Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
MBL	Metallo-beta-lactamase
MS	Mato Grosso do Sul
PBPs	Proteína Ligadora de Penicilinas
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	Infecção Hospitalar	12
2.2	Família <i>Enterobacteriaceae</i>	13
2.3	Mecanismos de Resistência	13
2.4	Beta-lactamases	14
2.4.1	Breve Histórico das Beta-Lactamases	15
2.4.2	Classificação das Beta-Lactamases	16
2.5	Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL)	18
2.5.1	Tipos de ESBLs	18
2.6	Beta-lactamases AmpC	19
2.7	Carbapenemases	20
2.7.1	Metallo-beta-lactamase (MBL)	21
2.7.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC)	21
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo Geral.....	23
3.2	Objetivos Específicos	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Tipo de Estudo	24
4.2	Período e Local	24
4.3	Fontes de dados.....	24
4.4	Identificação e Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana.....	25
4.5	Testes para Determinação de Beta-Lactamases	26
4.5.1	Pesquisa da Produção de ESBL e AmpC	26
4.5.2	Teste de Hodge para Pesquisa da Produção de Carbapenemase.....	29
4.6	Estratégias para Análise de Dados	30
4.7	Considerações Éticas	31
5	RESULTADOS	32
6	DISCUSSÕES	36
7	CONCLUSÕES.....	40
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

Infecção Hospitalar (IH) é um problema de saúde pública com grande impacto sobre a morbimortalidade dos pacientes internados. É, por definição, a infecção adquirida após a admissão do paciente, e que se manifesta durante a internação ou após alta, relacionada a procedimentos hospitalares (BRASIL, 1998).

Na medicina, com os avanços da tecnologia, houve um aumento na sobrevida dos pacientes. Por outro lado, a aquisição de IH se tornou maior, uma vez que o tempo de permanência dos mesmos é estendido nas instalações hospitalares. De acordo com Banderó Filho, Reschke e Horner (2006) as IHS representam as mais frequentes complicações em Unidade de Terapia Intensiva (UTI)..

Devido às IHS estarem intimamente relacionadas a procedimentos de risco, como o uso de cateteres e ventilação mecânica, as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, uma vez que são ubiqüitárias, estão entre um dos mais importantes agentes destas infecções. Podem causar os mais variados tipos de doenças como infecções do trato urinário, pneumonias, meningites e septicemias. Em virtude da gravidade das mesmas, o rápido isolamento, identificação e conhecimento da suscetibilidade aos antibióticos dos isolados para um melhor prognóstico do paciente é essencial. Entre as elas, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* estão, notavelmente, entre as mais importantes no âmbito hospitalar (NOGUEIRA, 2005; PITOUT, 2010).

Apesar do grande avanço no desenvolvimento de antimicrobianos, o cenário atual demonstra um aumento no número de isolamento de bactérias anteriormente sensíveis aos antimicrobianos de uso hospitalar mais potentes como carbapenêmicos e a emergência de micro-organismos intrinsecamente resistentes (POWERS, 2004).

Dentro do grupo das bactérias da família *Enterobacteriaceae*, o mecanismo de resistência que se destaca é a produção de beta-lactamases, enzimas que conferem resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. Entre as beta-lactamases, as mais descritas são as Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL), AmpC-beta-

lactamase e KPC (*Klebsiella* produtora de Carbapenemase) (BLACK, MOLAND, HOMSON, 2005; JACOBY, MUNOZ-PRICE, 2005; NOGUEIRA, 2005; NOYAL *et al.*, 2009).

A primeira beta-lactamase descoberta, TEM-1, foi descrita em 1960. Porém, ao longo dos anos foram sendo descritas novas enzimas, com pequenas modificações através de mutações. Conforme as mutações foram acontecendo, o perfil de resistência foi alcançando novas classes de antibióticos (PICÃO, GALES, 2007).

As enzimas ESBL têm como característica conferir resistência aos beta-lactâmicos de espectro estendido como cefalosporinas de terceira e quarta geração e aos monobactâmicos. Entretanto, não conferem resistência às cefamicinas e carbapenêmicos. Antibióticos carbapenêmicos são considerados fármacos de escolha no tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL. Por meio de estudo publicado é possível perceber que bactérias produtoras deste mecanismo estão amplamente disseminadas pelo mundo (GARCIA, GÁNDARA, GARCIA, 2010).

AmpC beta-lactamase utiliza alguns antibióticos como substrato. Entre eles estão penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Entretanto, diferentemente das ESBL, bactérias produtoras de AmpC hidrolisam cefamicinas e não são inibidas por inibidores de beta-lactamases. Normalmente, em associação com outros mecanismos, conferem resistência a múltiplos antibióticos. Resultados de falsa sensibilidade têm sido observados nos testes de suscetibilidade na rotina laboratorial e autores como Coudron (2005), Andrade (2008) e Polsfuss *et al.* (2011), têm relatado falha terapêutica quando utilizadas cefalosporinas de terceira geração no tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de AmpC beta-lactamase. Entretanto, a sensibilidade às cefalosporinas de quarta geração e aos carbapenêmicos é observada (PHILIPPON, ARLET, JACOBY, 2002; BLACK, MOLAND, THOMSON, 2005; COUDRON, 2005).

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) foi primeiramente descrita em 2001, em um isolado de *Klebsiella pneumoniae*, nos Estados Unidos. É uma enzima codificada por plasmídeos que inativam penicilinas, cefalosporinas, aztreonam e carbapenêmicos. Portanto, as opções terapêuticas para infecções causadas por

estas bactérias fica muito restritas a antibióticos de largo espectro e com alta toxicidade como aminoglicosídeos e polimixina (QUEENAN, BUSH, 2007).

Dada à habilidade das bactérias produzirem diferentes tipos de mecanismos de resistência, a detecção desses continua um grande desafio para o laboratório clínico. Além disso, existe uma dificuldade muito grande em se detectar com rapidez a produção destas enzimas devido à falta de métodos padronizados e aplicáveis a rotina laboratorial (BRADFORD, 2001).

A ocorrência destes mecanismos de resistência deve ser pesquisada com o propósito de determinar a prevalência de micro-organismos produtores dos mesmos nas unidades hospitalares de modo que os dados passam a ser úteis em estudos epidemiológicos e possam auxiliar a CCIH na tomada de medidas de prevenção e controle de infecção por esses patógenos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Infecção Hospitalar

Infecção Hospitalar (IH) é um problema de saúde pública, com grande impacto sócio-econômico. Tem como consequência a elevação na taxa de morbimortalidade, ampliação no tempo de permanência dos pacientes no hospital e aumento no custo do tratamento (BRASIL, 1998). São infecções de difícil controle devido às condições do próprio ambiente hospitalar, da utilização de procedimentos invasivos e doenças de base dos pacientes internados. Os procedimentos cirúrgicos, uso de cateteres, imunossupressores, ventilação mecânica são descritos como importantes condições de risco para estas infecções (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

Outro fator crítico são os reservatórios hospitalares tais como equipamentos de soluções de limpeza, panos de chão, desinfetantes, pias e torneiras que podem ser colonizadas por bactérias (BRAGA *et al.*, 2004).

A insuficiência das práticas de higienização das mãos por parte dos profissionais da saúde ao lidar com os pacientes é outro elemento importante a ser considerado que dificulta o controle da disseminação de micro-organismos nos hospitais (TIPLE *et al.*, 2010).

Em vista da necessidade do controle e da redução da incidência e gravidade destas infecções, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), determinou por meio da Portaria nº 2.616/98, de 12 de maio de 1998, o início do Programa de Controle de Infecção Hospitalar. Este programa estabelece a formação de uma Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), formada por profissionais da saúde, de nível superior, para que estes sejam encarregados da execução de ações necessárias para o controle das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAs), bem como a realização de vigilância epidemiológica.

Neste contexto, as bactérias da família *Enterobacteriaceae* se destacam como importantes agentes de IH, pois frequentemente exibem fenótipos de resistência a múltiplos antibióticos, o que dificulta o controle dessas infecções.

2.2 Família *Enterobacteriaceae*

Bactérias da família *Enterobacteriaceae* são bacilos Gram negativos, fermentadores de glicose, oxidase negativos, capazes de reduzir nitratos a nitritos, catalase positivo, aeróbios ou anaeróbios facultativos e são isolados em meios de cultura como ágar sangue, MakConkey e Cled (KONEMAN *et al.*, 2006).

Esses micro-organismos são ubiqüitários, estão presentes na água, solo, intestino de animais e humanos, em frutas, vegetais, grãos e árvores. Dependendo das condições favoráveis, podem causar uma série de infecções, incluindo do trato urinário, meningites, pneumonia, bacteremias, entre outras infecções, na comunidade e, também, no ambiente hospitalar (SOUZA, TORRES, OLIVEIRA, 2010).

2.3 Resistência Antimicrobiana em enterobactérias

Desde a introdução do uso clínico dos primeiros agentes antimicrobianos, a resistência aos antibióticos vem sendo descrita. Mesmo em 1940, ano que deu origem à “Era dos Antibióticos”, Ernst Chain e Edward Abraham descobriram uma substância produzida por *Escherichia coli* que tinha poder de inativar a penicilina. No mesmo ano, concluiu-se que o desenvolvimento de resistência ocorria em resposta ao próprio uso de antibióticos (POWERS, 2004; ROSSI, ANDREAZZI, 2006).

Antibióticos beta-lactâmicos são amplamente utilizados no tratamento de infecções por enterobactérias. Entretanto, tem se observado um crescimento no isolamento de bactérias, membros dessa família, com resistência a várias classes de antibióticos, fato que tem limitado as opções terapêuticas. No grupo das Enterobactérias, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* destacam-se como as espécies mais comumente relacionadas com a produção de beta-lactamases (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Nos anos 60 e 70, o uso indiscriminado de penicilinas, penicilinas resistentes à beta-lactamases e cefalosporinas favoreceu a emergência de bactérias resistentes

à antibióticos que anteriormente eram sensíveis. Entre as bactérias Gram negativas, os mecanismos de resistência mais descritos foram: produção de beta-lactamases, bombas de efluxo e impermeabilidade da membrana por perda de porinas (LIVERMORE, WOODFORD, 2006).

A resistência aos antibióticos é uma importante questão que afeta a saúde pública e, sua detecção pelos laboratórios clínicos é essencial para auxiliar a equipe médica. A identificação acurada desses micro-organismos ajuda no controle da disseminação dessas bactérias e na seleção de antibióticos mais adequados para a terapêutica (PITOUT, LAUPLAND, 2008).

Outro fator agravante é a disseminação epidêmica dos genes de resistência, não só dentro de uma mesma espécie, mas também entre bactérias de outras espécies. Estes patógenos têm demonstrado a capacidade de transferência dos mesmos por meio de plasmídeos e transposons (LUIZ, 2006). Plasmídeos são moléculas circulares de DNA, que se replicam independentemente do DNA cromossomal e carregam importantes informações genéticas, como a codificação de mecanismos de resistência. Em contrapartida, os transposons são elementos genéticos móveis, autônomos, capazes de mudar de posição dentro do genoma bacteriano (HAMER *et al.*, 2001; ROSSI, ANDREAZZI, 2006).

A resistência aos antimicrobianos ocorre por meio de diversos mecanismos. A inativação enzimática por intermédio das beta-lactamases se destaca entre as bactérias Gram negativas. Genes que codificam essas enzimas sofrem mutação continuamente em resposta à grande pressão exercida pelos antibióticos usados para lidar com o desenvolvimento de novas beta-lactamases (JACOBY, MUNOZ-PRICE, 2005; NOYAL *et al.*, 2009).

2.4 Beta-lactamases

Beta-lactâmicos são antibióticos que exercem sua atividade por meio da ação de um anel beta-lactâmico presente em sua estrutura molecular. Dentre eles estão: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. Supõe-se que este anel se ligue em proteínas responsáveis pela formação da parede celular bacteriana,

as PBPs. Quando ligadas as mesmas não podem exercer seu papel o que gera o rompimento da parede celular, levando à morte bacteriana.

As beta-lactamases são enzimas capazes de clivar o anel beta-lactâmico, e, portanto, inativar a ação dos antibióticos contendo este anel em sua estrutura molecular, como pode ser observado na Figura 3. (HAUSER *et al.*, 2009; ROSSI, ANDREAZZI, 2006).

2.4.1 Histórico das Beta-Lactamases

A primeira beta-lactamase foi descrita em 1960, originalmente demonstrada em um isolado de *Escherichia coli* de hemocultura de uma paciente internada na Grécia, chamada Temoniera. Por isso, o plasmídeo foi denominado TEM-1. Dentro de pouco tempo, a beta-lactamase codificada pelo plasmídeo TEM-1 foi difundida pelo mundo, e agora, é também encontrada em diferentes membros da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*. De acordo com dados da literatura, mais de 90% da resistência à ampicilina em *Escherichia coli* é devido à produção de TEM-1 (BRADFORD, 2001; PICÃO, GALES, 2007).

Mais tarde, outra beta-lactamase plasmídeo-mediada foi descrita em *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli*, a SHV-1. Essa enzima é comumente encontrada em *K. pneumoniae* e é responsável por mais de 20% da resistência à ampicilina nestas espécies. Algumas vezes também é relatada integrando o cromossomo bacteriano de *K. pneumoniae* (BRADFORD, 2001).

Ambas enzimas, TEM-1 e SHV-1, são consideradas beta-lactamases de espectro restrito, hidrolisam ampicilina e cefalosporinas de primeira geração e não apresentam atividade contra cefalosporinas de espectro ampliado as quais possuem uma cadeia lateral oximino (STURENBURB *et al.*, 2005).

Assim, com o surgimento das enzimas TEM-1 e SHV-1, as cefalosporinas de espectro ampliado passaram a ser a principal opção de escolha para o tratamento contra bactérias produtoras de beta-lactamases. Entretanto, seu amplo uso

favoreceu a seleção de isolados produtores de beta-lactamases de espectro ampliado (BRADFORD, 2001; PICÃO e GALES, 2007).

Em 1983, foi descrita, na Alemanha, a primeira beta-lactamase capaz de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro. Derivada da clássica SHV, a SHV-2 foi isolada de *Klebsiella ozaenae*, denominada de beta-lactamase de Espectro Estendido (ESBL). Com o passar dos anos, variantes da ESBL “clássica” foram identificadas e mais de 370 variantes são conhecidas (STURENBURB *et al.*, 2005; DALMARCO, BLATT, CÓRDOVA, 2006).

2.4.2 Classificação das Beta-Lactamases

Em 1980, Ambler, baseado na similaridade entre sequências de aminoácidos, propôs uma classificação. Mais tarde, em 1989, Bush-Jacoby-Medeiros, propuseram outra classificação baseada nas características físicas e funcionais de cada enzima. Foi atualizado em 2010 por Bush & Jacoby.

2.4.2.1 Classificação de Ambler (1980)

Ambler dividiu as beta-lactamases em quatro classes: A, B, C e D, sendo agrupadas de acordo com a similaridade entre as sequências de aminoácidos. As classes A, C e D possuem o sítio de ação composto por serinas, enquanto a classe B, também chamadas metallo-beta-lactamases, utilizam o zinco (Zn) como cofator (AMBLER, 1980; DALMARCO, BLATT, CÓRDOVA; 2006).

2.4.2.2 Classificação de Bush-Jacoby-Medeiros (1989)

Essa classificação leva em consideração o perfil do substrato, propriedades de inibição, além de características físicas como peso molecular e ponto isoelétrico das enzimas. Quatro grupos são definidos:

Grupo 1: enzimas que não sofrem inibição pelo ácido clavulânico. Ex.: as cefalosporinases;

Grupo 2: enzimas de amplo espectro que são inibidas pelo ácido clavulânico. Ex.: as penicilinas e cefalosporinas;

Grupo 3: enzimas que necessitam do íon Zn como cofator e atuam sobre penicilinas, cefalosporinas e carbapenênicos. Não são inibidas pelo ácido clavulânico. Entretanto, tem sua atividade inibida na presença de Ácido Etilenoaminotetracético (EDTA) devido a sua ação quelante sobre o íon Zn. Ex.: as metalo-beta-lactamases;

Grupo 4: enzimas penicilinas que não são inibidas pelo ácido clavulânico. Ex.: as beta-lactamases codificadas pelo plasmídeo OXA (ROSSI, ANDREAZZI, 2006).

2.4.2.3 Classificação de Bush-Jacoby (2010)

Nesta última atualização, Bush, Jacoby (2010) defendem que uma classificação baseada na atividade da enzima, ou seja, em grupos funcionais, permite ao clínico correlacionar as propriedades de cada enzima com o perfil de resistência observado por cada isolado clínico. Portanto, eles dividiram as beta-lactamases em apenas três grupos:

Grupo 1: É o grupo das cefalosporinas. Enzimas pertencentes à classe molecular C, de Ambler, que são mais ativas contra cefalosporinas e não são inibidas por inibidores de beta-lactamases, como o ácido clavulânico e tazobactam.

Grupo 2: São as serino beta-lactamases, enzimas pertencentes ao grupo A e D, de Ambler, representadas pelo maior grupo de beta-lactamases. É dividido em subgrupos conforme o espectro de ação de cada enzima. Alguns dos representantes são ESBL, CTX-M e KPC.

Grupo 3: Neste grupo as enzimas necessitam do íon zinco em seu sítio de ação para produzir atividade contra os antimicrobianos. São as metalo-beta-lactamases (MBLs). Tem habilidade de hidrolisar carbapenênicos e são inibidas por quelantes de íons, como o EDTA.

2.5 Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL)

As ESBL são enzimas codificadas por plasmídeos, na maioria das vezes, derivadas dos genes TEM e SHV, capazes de hidrolisar beta-lactâmicos de amplo espectro como cefalosporinas de terceira (ceftazidima, ceftriaxona e cefotaxima) e quarta geração (cefepime), monobactâmicos (aztreonam), mas não cefamicinas (cefotitina e cefotetan) e carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem). São inibidas por inibidores de beta-lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (GARCIA, GÁNDARA, GARCIA, 2010). Pertencem ao grupo 2 de Bush e à classe molecular A de Ambler. São enzimas mediadas por plasmídeos, na maioria das vezes, derivadas dos genes TEM e SHV (ROSSI, ANDREAZZI, 2006).

Além disso, bactérias produtoras de ESBL são, comumente, resistentes também a fármacos não beta-lactâmicos, como fluorquinolonas e aminoglicosídeos, o que diminui ainda mais as opções terapêuticas nestes casos (WEINBREN, BORTHWICK, 2005). Primeiramente foram descritas na Alemanha, em 1983 e, mais tarde, em um surto na França, em 1985. Ocorrem predominantemente no gênero *Klebsiella* e em menor quantidade em *E. coli*. Porém, podem ser encontradas também em *Proteus mirabilis*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Salmonella spp.* e *Pseudomonas aeruginosa* (VARAIYA et al., 2008).

2.5.1 Tipos de ESBLs

De acordo com estudos prévios, acredita-se que as ESBLs são derivadas de outras beta-lactamases, após a ocorrência de mutações genéticas. As diferenças estão em uma ou mais substituições de aminoácidos que alteram as propriedades do sítio de ação. Estas alterações permitem um aumento na atividade contra cefalosporinas de amplo espectro (BRADFORD, 2001).

A maioria das ESBLs pertence à classe molecular A de Ambler e são agrupadas e denominadas de acordo com a sua similaridade com enzimas precursoras. São derivadas na maior parte das enzimas SHV e TEM. Entretanto,

outras enzimas com fenótipo de ESBL têm sido descritas, como IRT, CTX-M, BES, PER, GES, VEB (ANDRADE, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009; GARCIA, GÁNDARA, GARCIA, 2010; KHAN *et al.*, 2010).

2.6 Beta-lactamases AmpC

As beta-lactamases conhecidas como cefalosporinas cromossomais ou AmpC são enzimas codificadas por genes de origem cromossômica ou plasmidial. As AmpC mediadas por plasmídeos são derivadas dos genes CMY, MIR, MOX, LAT, FOX, DHA, ACT, ACC e CFE. Essas beta-lactamases são capazes de hidrolisar penicilinas, monobactâmicos e cefalosporinas de até terceira geração, inclusive cefamicinas, sendo que a resistência à cefoxitina é o principal marcador da expressão de AmpC. Essa enzima não hidrolisa cefalosporinas de quarta geração e carbapenêmicos e não são inibidas por inibidores de beta-lactamases. As bactérias produtoras de AmpC são, comumente, resistentes também a fármacos não beta-lactâmicos, como aminoglicosídeos, cloranfenicol, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclina e trimetopim (JACOBY, 2009; PHILIPPON, ARLET, JACOBY, 2002).

A expressão de AmpC de origem cromossômica pode ocorrer de forma constitutiva (*Escherichia coli*, *Shigella* spp.) ou induzível (exemplo: *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Serratia* spp.). Na ausência de beta-lactâmicos indutores, a produção de AmpC constitutiva ocorre em níveis baixos, enquanto que a produção de AmpC induzível ocorre na presença de beta-lactâmicos indutores. Em ambos os casos, a hiperprodução ou hiperindução dessa enzima pode ser atribuída a mutação nos genes reguladores de AmpC (PHILIPPON, ARLET, JACOBY, 2002; JACOBY, 2009).

São considerados beta-lactâmicos indutores fortes para AmpC: benzilpenicilina, ampicilina, amoxicilina e cefalosporinas (JACOBY, 2009).

As enzimas AmpC de origem plasmidial tem sido associada a uma falta sensibilidade *in vitro* às cefalosporinas (BLACK, MOLAND, THOMSON, 2005). Além disso, a produção de AmpC está relacionada, muitas vezes, com AmpC cromossômica de outras espécies de bactérias que atuaram como fonte para o gene

de AmpC . Por exemplo, seis variedades para AmpC (CMY-1,-8, -9, -10, -11, E -19) estão relacionadas com AmpC cromossômica de *Aeromonas* spp. e as demais variedades, a qual inclui-se a variedade mais comum (CMY-2), são derivadas da AmpC cromossômica de *Citrobacter freundii* (JACOBY, 2009).

Segundo o mesmo autor, a produção de AmpC plasmidial ocorre principalmente de forma constitutiva, nas espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella* spp..

As beta-lactamases AmpC pertencem ao grupo 1 de Bush e à classe molecular C de Ambler e já se sabe que o ácido 3-amino-fenilborônico atua como inibidor de AmpC nos testes *in vitro* (BEESLEY *et al.*, 1983, COUDRON *et al.*, 2005).

2.7 Carbapenemases

Diversos mecanismos podem estar relacionados a resistência aos antibióticos carbapenêmicos, tais como: modificação na permeabilidade de membrana e aumento na regulação das bombas de efluxo, associado a hiperprodução de AmpC ou ESBL ou a produção de enzimas carbapenemases (NORDMANN, CUZON, NAAS, 2009).

As beta-lactamases conhecidas como carbapenemases são codificadas por genes de origem cromossômica ou plasmidial. As carbapenemases de origem cromossômica são derivadas de genes SME, NMC e IMI e descritas nas espécies *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae*. Já as carbapenemases de origem plasmidial são derivadas dos genes KPC e GES e descritas na espécie *Klebsiella pneumoniae*, mas também são encontradas em outras espécies da família *Enterobacteriaceae* (QUEENAN, BUSH, 2007).

As carbapenemases conferem resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Os carbapenêmicos são as drogas de escolha no tratamento de infecções graves por bactérias Gram negativas multirresistentes, tais como infecções causadas por enterobactérias produtoras de ESBL (WOODFORD *et al.*, 2004).

Entre as carbapenemases, destacam-se as metallo-beta-lactamases e as *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC).

2.7.1 Metallo-beta-lactamase (MBL)

As Metallo-Beta-Lactamase (MBLs) pertencem ao grupo 3 de Bush e à classe molecular B de Ambler.

Em 1991, as MBLs foram descritas na espécie *Pseudomonas aeruginosa*, pela primeira vez, e posteriormente em espécies da família *Enterobacteriaceae*, tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii* (QUEENAN, BUSH, 2007).

Para esses mesmos autores, essas enzimas são resistentes às penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, não hidrolisam aztreonam, não são inibidas por inibidores de beta-lactamases, mas são inibidas por quelantes de íons metálicos. Além disso, as MBLs requerem íons Zn^{+2} ou outros cátions divalentes como cofator no sítio ativo e por isso, são inibidas por agentes quelantes, como o ácido etilenodiamino tetracético (EDTA).

2.7.2 Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)

As *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPCs) pertencem ao grupo 2 de Bush e à classe molecular A de Ambler.

Em 1996, a primeira KPC foi identificada na Carolina do Norte, EUA (YIGIT *et al.*, 2001). No Brasil, o primeiro relato feito por Monteiro *et al.* (2009) faz a descrição de quatro casos de KPC no Recife.

Essas enzimas são resistentes às penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos e são fracamente inibidas por inibidores de beta-lactamases (YIGIT *et al.*, 2001; NORDMANN, CUZON, NAAS, 2009).

Diante do aumento do número de casos de KPC em todo o mundo nos últimos anos, o *Control Laboratory Standard Institute* (CLSI) revisou os critérios de interpretação de susceptibilidade aos carbapenêmicos. Além disso, foi padronizado um método fenotípico confirmatório para detecção de carbapenemase em *Enterobacteriaceae*, com alta sensibilidade e especificidade (>90%) para carbapenemase do tipo KPC. A investigação de carbapenemases é recomendada para fins epidemiológicos ou para auxiliar o controle de infecções (CLSI, 2011).

No Brasil, enterobactérias produtoras de KPC foram destaque entre 2009 e 2010 devido ao aumento do número de casos relatados a ANVISA. Diante dessa disseminação no país, em 2010, a ANVISA publicou a Nota Técnica N°1/2010 com orientações sobre identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por micro-organismos multirresistentes (BRASIL, 2010).

A emergência de micro-organismos multiresistentes é um dos principais fatores responsáveis pela dificuldade no controle das IHS como um todo. Diante do exposto, é importante identificar os perfis de resistência destes micro-organismos nas unidades hospitalares, a fim de se estabelecer medidas de controle e prevenção de infecções por bactérias multirresistentes, de acordo com as características e peculiaridades do hospital e dos pacientes ali assistidos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a produção de beta-lactamases em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. isoladas de amostras clínicas obtidas em um hospital público de ensino de Campo Grande, MS.

3.2 Específicos

- Estimar a prevalência de *E. coli* e *Klebsiella* spp. em um hospital público de ensino de Campo Grande, MS;
- Verificar as espécies clínicas de maior isolamento de *E. coli* e *Klebsiella* spp.;
- Avaliar a produção de ESBL, AmpC e carbapenemase em *E. coli* e *Klebsiella* spp.;
- Determinar o perfil de resistência das enterobactérias produtoras de ESBL, AmpC e carbapenemase
- Propor uma metodologia para detecção simultânea de ESBL, AmpC e KPC.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

Estudo descritivo de desenho transversal.

4.2 Período e Local

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisas Microbiológicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), em conjunto com o Laboratório de Bacteriologia do setor de Análises Clínicas do Hospital Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HU/UFMS).

O mesmo é caracterizado como instituição de ensino terciário e pesquisa, e possui 256 leitos, sendo 41 leitos de unidades críticas, distribuídos em: oito de UTI adulto, seis de UTI neonatal, 12 unidades intermediárias, cinco UTI's pediátricas e duas unidades de isolamento.

Foram selecionadas *Escherichia coli* e *Klebsiella* sp de materiais biológicos diversos, não repetitivos, de pacientes atendidos pelo hospital, no período de julho a dezembro de 2010.

4.3 Fontes de dados

Foram incluídos no estudo, isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella* sp obtidos a partir de culturas de amostras biológicas de pacientes atendidos pelo HU-UFMS.

Dentre as amostras isoladas foram selecionadas as que atendessem aos critérios de inclusão para a realização de testes fenotípicos de identificação dos mecanismos de resistência pesquisados no estudo.

Os critérios utilizados para escolha das bactérias a serem estudadas foram:

- Resistência a uma ou mais cefalosporinas de 3ª geração e/ou;
- Resistência à cefoxitina e/ou;
- Resistência ou sensibilidade aos carbapenêmicos: imipenem, meropenem e ertapenem.

Foram excluídas culturas repetidas de um mesmo paciente, com mesmo perfil de suscetibilidade, isoladas em datas muito próximas.

Os micro-organismos foram armazenados em caldo BHI (Brain-Heart Infusion - MERCK®) a -15°C e Ágar Fosfatase (AF) (“in house”) à temperatura ambiente.

4.4 Identificação e Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana

A identificação e o antibiograma foram realizados pelo sistema automatizado VITEK 2® Compact (BioMérieux). Este sistema de automação utiliza cartões com reagentes a partir dos quais é determinado o perfil fenotípico da bactéria, por meio de leituras de reações colorimétricas e de turbidimetria.

Foram utilizados os cartões GN Test Kit do VITEK 2 para identificação de Gram negativos e o cartão AST N 104 Test Kit (Antibiograma para Gram negativos urinários) e AST N 105 Test Kit (Antibiograma para Gram negativos hospitalares) para o teste de suscetibilidade antimicrobiana, conforme instruções do fabricante no que diz respeito ao preparo do inóculo, incubação, leitura e interpretação.

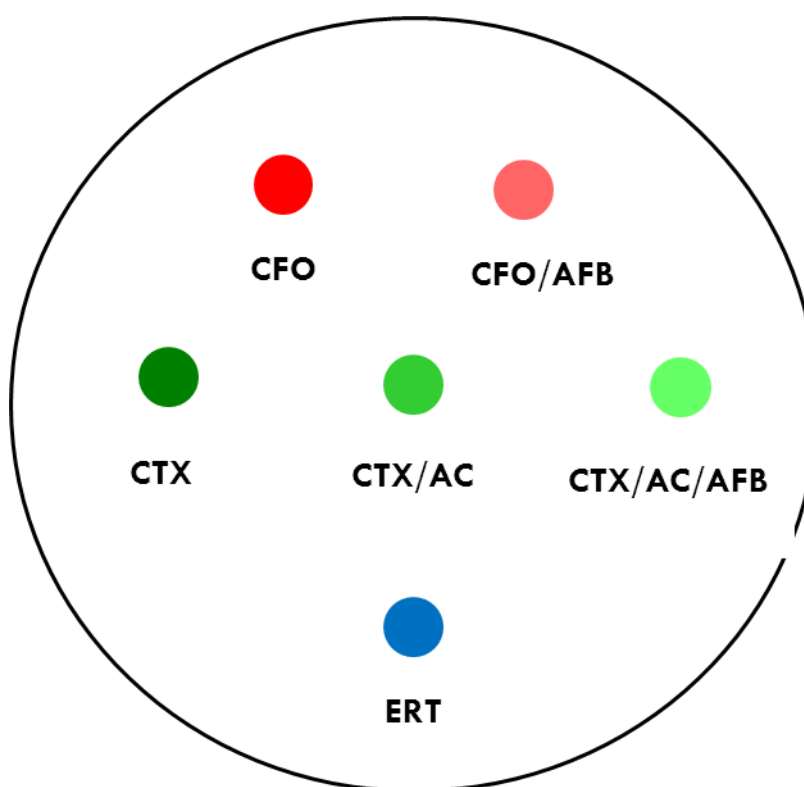
As suspensões bacterianas foram preparadas a partir de colônias puras e recentes e a turbidez foi ajustada em um turbidímetro (DensiCheck™, BioMérieux) em solução salina equivalente 0,5% da escala Mc Farland. Os cartões foram preenchidos e selados por meio de um sistema à vácuo e incubados no aparelho a 35,5°C.

Durante o período de incubação, leituras cinéticas fluorescentes foram realizadas a cada 15 minutos. Os dados foram então analisados pelo software do VITEK 2 e o resultado reportado (LING, 2001).

4.5 Testes Fenotípicos para Determinação de Beta-Lactamases

4.5.1 Pesquisa da Produção de ESBL e AmpC

Para a pesquisa de ESBL e AmpC foi utilizada a técnica de disco-difusão, com antibióticos isolados e combinados com inibidores de beta-lactamases (ácido clavulânico – AC e ácido fenilborônico – AFB) conforme desenho esquemático na Figura 1.



Nota: CFO: cefoxitina; CFO/AFB: cefoxitina/ácido fenilborônico; CTX: ceftaxima; CTX/AC: cefotaxima/ácido clavulânico; ERT: ertapenem; CTX/AFB: cefotaxima/ácido fenilborônico; CTX/AC/AFB: cefotaxima/ácido clavulânico/ácido fenilborônico.

Figura 1 Desenho esquemático da disposição de discos de antibióticos para pesquisa de ESBL e AmpC.

Fonte: NÓBREGA, 2010.

Em uma placa de 4 a 5mm de agar Mueller Hinton, foram dispostos os discos de cefotaxima (CTX) (30µg/SENSIDISC®) e cefotaxima associada ao ácido clavulânico (CTX/AC) (30/10µg/Bio-Rad®), como preconizado pelo CLSI (2010), para a detecção fenotípica da produção de ESBL.

Para a pesquisa de AmpC beta-lactamase foram dispostos sobre a mesma placa, os discos de cefoxitina (CFO) (30µg/SENSIDISC®) e cefoxitina associada ao ácido fenil borônico (CFO/AFB) (400µg/SIGMA ALDRICH®) como descrito por Coudron *et al.* (2005).

Em razão das AmpC beta-lactamases não serem inibidas pelo ácido clavulânico, os micro-organismos produtores de AmpC e ESBL concomitantemente poderiam demonstrar um resultado falso negativo no teste fenotípico para detecção de ESBL. Por isso, foram colocados discos de cefotaxima (CTX) e cefotaxima associada ao AC (CTX/AC), ambos em associação com o AFB na mesma placa de antibiograma. A adição do AFB teve como objetivo inibir a AmpC para que a mesma não mascarasse a produção de ESBL.

Amostras que desenvolveram halos iguais ou maiores que 5mm nos discos de cefotaxima contendo AC em relação ao disco de cefotaxima foram considerados positivos para a produção de ESBL (Figura 2).

Isolados que demonstraram halos de inibição iguais ou maiores que 5mm nos discos de cefoxitina contendo AFB em relação ao disco de cefoxitina isolado foram considerados positivos para a produção de AmpC (Figura 3).

Além disso, quando os isolados eram produtores concomitantemente de AmpC e ESBL, o mesmo critério foi aplicado para os disco de cefotaxima e cefotaxima + AC adicionados de AFB (Figura 4).

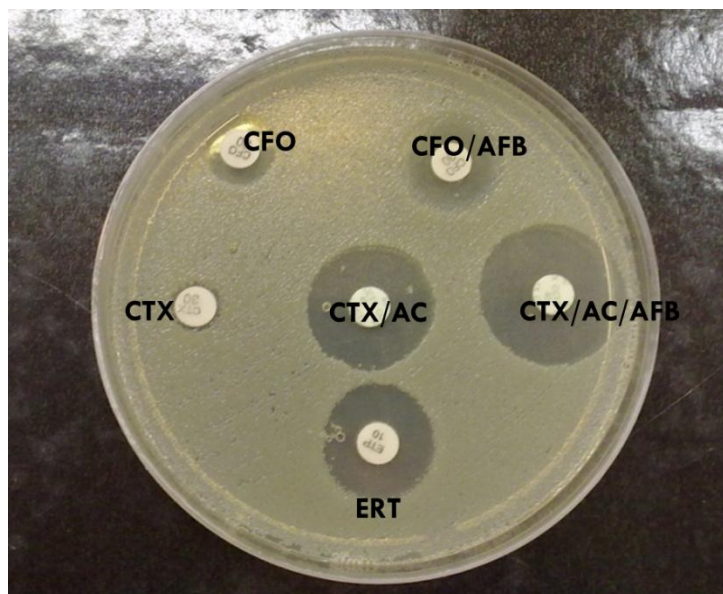


Figura 2 Foto ilustrativa de *Klebsiella pneumoniae* com teste fenotípico positivo para produção de ESBL. Nota: CFO: cefoxitina; CFO/AFB: cefoxitina/ácido fenilborônico; CTX: cefotaxima; CTX/AC: cefotaxima/ácido clavulânico; CTX/AC/AFB: cefotaxima/ácido clavulânico/ácido fenilborônico; ERT: ertapenem.

Fonte: NÓBREGA, 2010.

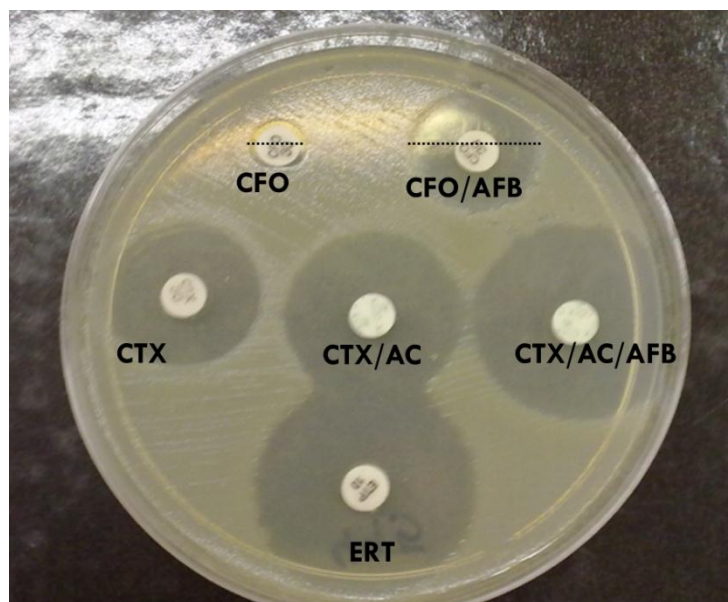


Figura 3 Foto ilustrativa de *Klebsiella pneumoniae* com teste fenotípico positivo para produção de AmpC beta-lactamase. Nota: CFO: cefoxitina; CFO/AFB: cefoxitina/ácido fenilborônico; CTX: cefotaxima; CTX/AC: cefotaxima/ácido clavulânico; CTX/AC/AFB: cefotaxima/ácido clavulânico/ácido fenilborônico; ERT: ertapenem.

Fonte: NÓBREGA, 2010.

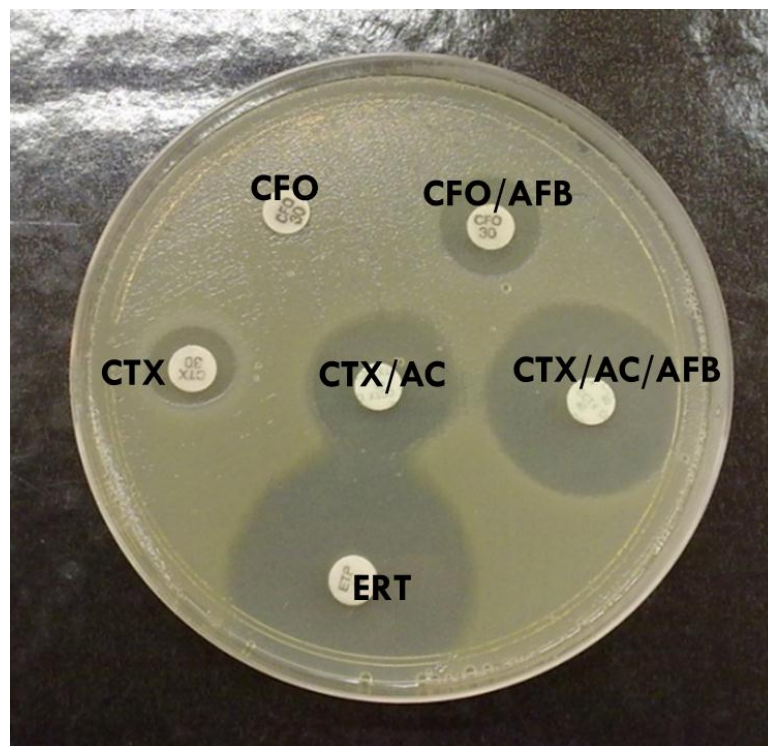


Figura 4 Foto ilustrativa de *Klebsiella pneumoniae* com teste fenotípico positivo para produção de ambas beta-lactamases (ESBL e AmpC). Nota: CFO: cefoxitina; CFO/AFB: cefoxitina/ácido fenilborônico; CTX: cefotaxima; CTX/AC: cefotaxima/ácido clavulânico; CTX/AC/AFB: cefotaxima/ácido clavulânico/ácido fenilborônico; ERT: ertapenem.

Fonte: NÓBREGA, 2010.

4.5.2 Teste de Hodge para Pesquisa da Produção de Carbapenemase

A pesquisa de carbapenemase foi realizada pelo método de Hodge modificado, como descrito pelo CLSI (2010).

Uma suspensão bacteriana foi preparada de uma cultura de 24hs da cepa de *E. coli* ATCC 25922, ajustada a 0,5 da escala de MCFarland e diluída, em seguida, na proporção de 1:10 com água destilada estéril.

Com um swab semeou-se esta suspensão em ágar Müller-Hinton (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra). Posteriormente, foram dispostos na placa os discos de Meropenem 10µg (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) e Ertapenem 10µg (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra). Então, foi feita uma estria da borda do disco de antibiótico em direção a periferia da placa de colônias frescas, cultivadas a 24 horas, da amostra a ser testada.

Realizou-se a leitura após 16 a 20 horas de incubação em estufa a 37°C. Quando houve invaginação do halo de inibição da cepa *E. coli* ATCC 25922 próximo ao crescimento da estria da amostra testada, foi considerado positivo para o teste de Hodge modificado, exemplificado na Figura 5.



Figura 5 Foto ilustrativa de *Klebsiella pneumoniae* com teste de Hodge modificado positivo para produção de carbapenemase.

Fonte: NÓBREGA, 2010.

4.6 Estratégias para Análise de Dados

Os dados foram digitados em planilhas no programa Excel® (Microsoft Office 2007) e analisados pelo programa EpiInfo™ 3.5.1 (2008).

4.7 Considerações Éticas

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), protocolo nº 1752 ano 2010 (ANEXO A). Como foram utilizados isolados bacterianos armazenados nos bancos de cepas do hospital, foi aprovada dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

5 RESULTADOS

Entre as Enterobactérias isoladas no período, 361 (73,7%) eram *Escherichia coli*, 125 (25,5%) *Klebsiella pneumoniae* e 4 (0,8%) *Klebsiella oxytoca*, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Número e porcentagem de Enterobactérias segundo espécie e frequência, HU-UFMS, julho a dezembro - 2010 (n = 490).

Espécie	N	%
<i>Escherichia coli</i>	361	73,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	125	25,5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	0,8
Total	490	100

Os micro-organismos foram isolados de espécimes clínicos diversos, principalmente de urina (87,3%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Número e porcentagem de amostras estudadas segundo material biológico do isolamento e frequência, HU-UFMS, julho a dezembro - 2010 (n = 490).

Material Biológico	N	%
Urina	428	87,3
Sangue	33	6,7
Aspirado Traqueal	10	2,0
Secreções	9	1,8
Exsudato de ferida	4	0,8
Líquido Abdominal	3	0,6
Biópsia de pele	1	0,2
Fragmento ósseo	1	0,2
Líquor	1	0,2

Os resultados dos testes fenotípicos realizados para pesquisa de beta-lactamases do tipo ESBL, AmpC e carbapenemase (KPC) estão mostrados na Tabela 3.

Nesta observa-se entre todas as bactérias estudadas, *Klebsiella* spp. Que mais expressou a produção de beta-lactamases.

Tabela 3 - Número e frequência de bactérias produtoras de beta-lactamases segundo espécie e mecanismo de resistência, HU-UFMS, julho a dezembro - 2010 (n = 490).

	ESBL		AmpC		KPC	
	Positivo		Positivo		Positivo	
Espécie	N	%	N	%	N	%
<i>E. coli</i>	21	5,8	1	0,3	1	0,3
<i>K. oxytoca</i>	1	25,0	0	0,0	0	0,0
<i>K. pneumoniae</i>	57	45,6	26	20,8	26	20,8
Total	79	16,1	27	5,5	27	5,5

Nota: A produção de ESBL, AmpC e KPC estimada por meio testes fenotípicos.

As amostras positivas para ESBL apresentaram altos índices de resistência frente à ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX) e aztreonam (AZT), como pode ser observado na Tabela 4. Em relação à representante das cefamicinas, a cefoxitina (CFO), a taxa de resistência foi de 54,4%. Para cefepime (CEF), as amostras produtoras de ESBL apresentaram alta porcentagem de resistência, sendo 92,4%.

Outras classes de antibióticos também foram avaliadas. Das quinolonas, foram testadas ciprofloxacino (CIP) e levofloxacino (LEV), das quais ciprofloxacino menor porcentagem de resistência foi vista frente às amostras ESBL positivas. Dos carbapenêmicos testados, ertapenem e meropenem, a mesma taxa de resistência, 21,5%, foi observada. Menor valor de resistência foi observado por um aminoglicosídeo, a amicacina, com resistência em apenas 5 (6,3%) dentre as 79 amostras produtoras de ESBL. Observar Tabela 4.

Tabela 4 - Número e frequência de resistência segundo antibióticos testados para bactérias produtoras de ESBL, HU-UFMS, julho a dezembro - 2010 (n = 79).

Antibiótico	N	Resistente (%)
CAZ	74	93,7
CTX	74	93,7
ATM	74	93,7
CEF	73	92,4
LEV	58	73,4
CIP	54	68,4
CFO	43	54,4
GEN	23	29,1
IPM	17	21,5
ERT	17	21,5
MER	17	21,5
AMI	5	6,3

Nota: CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; ATM: aztreonam; CEF: cefepime; CFO: cefoxitina; CIP: ciprofloxacina; LEV: levofloxacina; IPM: imipenem; ERT: ertapenem; MER: meropenem; GEN: gentamicina; AMI: amicacina.

Analisando as amostras positivas para a produção de AmpC, 83,3% apresentou resistência *in vitro* frente a cefoxitina.

Para o fenótipo KPC, foram avaliados os carbapenêmicos ertapenem (ERT), meropenem (MER) e imipenem (IPM). As bactérias com teste de Hogde positivo mostraram 70,4% de resistência ao ertapenem e meropenem e 55,6% foram resistentes frente ao imipenem (Tabela 6).

Tabela 5 - Suscetibilidade antimicrobiana de *E.coli* e *Klebsiella* spp. com teste de Hogde positivo segundo carbapenêmicos testados, HU-UFMS, julho a dezembro - 2010 (n = 490).

Carbapenêmicos														
KPC	ERTAPENEM						MEROPENEM				IMIPENEM			
	I		R		S		R		S		R		S	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº	%	Nº	%
Negativo	3	0,6	1	0,2	459	99,1	1	0,2	462	99,8	0	0,0	53	100,0
Positivo	7	25,9	19	70,4	1	3,7	19	70,4	8	29,6	5	55,6	4	44,4
TOTAL	10	2,0	20	4,1	460	93,9	20	4,1	470	95,9	5	8,1	57	91,9

Nota: I: intermediário, R: resistente, S: sensível

6 DISCUSSÃO

O aumento na frequência de enterobactérias resistentes a diferentes classes de antimicrobianos tem sido considerado um grande desafio para microbiologistas e médicos, devido à dificuldade em se detectar os mecanismos de resistência e interpretá-los. Além disso, a presença de micro-organismos multi droga resistentes acarreta falha terapêutica e falta de opções medicamentosas para tratamento.

De acordo com os resultados, foi possível observar que dentre os dois gêneros, houve maior prevalência de *Escherichia coli* (73,7%), resultado que corrobora com dados nacionais e internacionais (LUZZARO *et al.* 2006; AUGUSTI, SUPERTI, ZAVASKI, 2007; SOUZA, TORRES, OLIVEIRA; 2010).

Devido ao expressivo aumento de bactérias produtoras de ESBL, AmpC e KPC observado em todo o mundo (ROSSI, 2011) e à capacidade de rápida disseminação, métodos de triagem e confirmatórios são necessários no controle da infecção por esses agentes. O laboratório de microbiologia desempenha um importante papel junto à CCIH. Para tanto, deve-se utilizar técnicas padronizadas, como as descritas no presente trabalho.

No intento de facilitar a operacionalização de detecção simultânea de ESBL, AmpC e KPC, foi feita uma adaptação da técnica preconizada pelo CLSI (2010).

Em uma mesma placa de antibiograma foram colocados discos de antibióticos apropriados visando, através de um único método fenotípico, investigar a expressão de ESBL e AmpC e triar amostras possivelmente produtoras de KPC, pela observação de halo de inibição de crescimento diminuindo ao redor de ertapenem.

Para a detecção de ESBL foi escolhido o método disco-combinado. O antibiótico utilizado foi cefotaxima combinado ao ácido clavulânico. De acordo com estudos prévios, essa técnica, por ser prática e de baixo custo, é recomendada e pode ser utilizada no laboratório de microbiologia de rotina (JACOBY, WALSH, WALKER, 2006).

Entre todos os isolados, a prevalência de ESBL (16,1%) encontrada foi menor que descrita em outro estudo nacional. AUGUSTI, SUPERTI, ZAVASCKI (2007)

encontraram 35,2% de bactérias produtoras de ESBL em amostras de *E.coli* e *Klebsiella pneumoniae* de bacteremias.

Klebsiella pneumoniae foi a espécie que apresentou maior positividade para a produção de ESBL (45,6%), semelhante a estudos realizados por outros pesquisadores. (BRADFORD, 2001; NOGUEIRA, 2005; AUGUSTI, SUPERTI, ZAVASCKI, 2007).

O perfil fenotípico clássico de uma bactéria produtora de ESBL *in vitro* apresenta sensibilidade frente às cefamicinas, mais especificamente, a ceftioxina. Neste trabalho, 54,4% das bactérias ESBL positivas foram resistentes a ceftioxina, dado semelhante ao encontrado por Nogueira (2009). Este fenômeno pode ser justificado pelo fato desses micro-organismos apresentarem diversos mecanismos de resistência, como a produção de enzimas AmpC e/ou a perda de porinas, associadas a produção de ESBL (YAN et al., 2004; JACOBY, WALSH, WALKER, 2006).

Uma vez que a produção de AmpC não é inibida pelo ácido clavulânico, foi adicionado o ácido borônico ao teste confirmatório para ESBL. Dessa forma, evitou-se a interferência da produção de AmpC na interpretação dos testes para ESBL, que poderia mascarar os resultados (COUDRON, 2005).

Dentre os isolados, a expressão fenotípica de AmpC foi determinada em 27 isolados, (5,5%) das amostras. Dados semelhantes foram demonstrados por Alvarez et al. (2004). Porém, valores maiores foram encontrados por Hemalatha et al. (2007).

Isolados produtores de AmpC demonstraram elevada resistência a CFO, antibiótico que pode ser considerado um bom marcador para a suspeita de produção de AmpC. Sendo sua detecção importante, uma vez que o tratamento desta bactérias com cefalosporinas pode levar a falha terapêutica (COUDRON, 2005).

Para a triagem de KPC foi colocado um disco de ertapenem na mesma placa onde foram realizados os testes confirmatórios para ESBL e AmpC. Esse procedimento foi considerado prático, porque pode detectar, simultaneamente, três mecanismos de resistência em enterobactérias.

A determinação da resistência aos carbapenêmicos pelos sistemas automatizados ainda é problemática. Dados da literatura demonstram em torno de 87% dos casos de bactérias produtoras de KPC são reportadas como sensíveis aos carbapenêmicos quando o laboratório utiliza sistema automatizado (NORDMANN, 2009). Tal fato pode ser explicado pelos diferentes mecanismos de resistência expressos por diferentes bactérias e muitas vezes pelo uso de inóculo abaixo dos valores recomendados.

Por si só, ertapenem não é um marcador de KPC, uma vez que a resistência a ele pode ser determinada também por outros fatores, como a produção de ESBL ou AmpC associados a perda de porina. Porém, dados da literatura comprovam que ertapenem tem alta sensibilidade para detecção de produtores de KPC. Por isso, o mesmo foi escolhido como marcador para a realização da triagem para se detectar possíveis produtores de KPC nas amostras de *E. coli* e *Klebsiella* sp. isoladas neste estudo (NORDMANN, 2009).

A técnica de Hodge foi escolhida para avaliar a produção de KPC devido à praticidade e baixo custo para a realização. Além disso, é uma técnica recomendada pelo CLSI (2010). Existe disponível no comércio fitas de E-test e ágar cromogênico para a identificação de KPC com alta sensibilidade. Porém, muitas vezes são de difícil interpretação e de alto custo (ERRECALDE *et al.*, 2012).

De acordo com estudos prévios, as técnicas moleculares são altamente específicas e sensíveis. Porém, estas técnicas requerem conhecimento técnico especializado e equipamentos de alto custo. Por isso, testes moleculares confirmatórios ficam restritos a laboratórios de referência e laboratórios de pesquisa. A confirmação da presença de carbapenemase do tipo KPC é realizada pela pesquisa do gene *bla_{KPC}*, através da utilização de técnicas de biologia molecular como PCR e seqüenciamento (BRATU *et al.*, 2005; LEAVITT *et al.*, 2007; MONTEIRO, PEIRANO, GALES, 2009; PAVEZ, LINCOPAN, 2009; PEIRANO *et al.*, 2009)

Cerca de 5% (27) das amostras apresentaram positividade no teste de Hodge, fenótipo positivo para KPC. Dentre essas, 26 foram expressos por *Klebsiella pneumoniae* e apenas um por *Escherichia coli*. Esses dados corroboram com dados da literatura que mostram que carbapenemases do tipo KPC são expressas em maior número por *Klebsiella pneumoniae*. Monteiro (2009) relata o primeiro caso de

KPC no Brasil, em 2006, obtido de amostras de *Klebsiella pneumoniae*. Bratu *et al.*, em 2005, realizaram estudo no Brooklyn, US, e mostraram que dentre 257 isolados de *Klebsiella pneumoniae*, 24% dos isolados carregavam o gene *bla*_{KPC}.

Em relação a outros estados e países, é possível observar que a taxa de KPC na cidade de Campo Grande/MS ainda é baixa, porém não menos relevante (YIGIT *et al.*, 2001; WOODFORD *et al.*, 2004; VILLEGAS *et al.*, 2006; MENDES *et al.*, 2008, NOYAL *et al.*, 2009; TSAKRIS *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2012; CHANG, 2013).

7 CONCLUSÕES

Escherichia coli é a espécie de enterobactéria mais isolada de pacientes internados no Hospital de estudo.

Dentre as espécies bacterianas estudadas, *Klebsiella pneumoniae* é a espécie que apresenta maior número de beta-lactamases ESBL, AmpC e carbapenemase (KPC).

A enzima ESBL apresenta maior prevalência do que AmpC e KPC em *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas do HU-UFMS.

Similar ao observado, *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentadas em outras instituições hospitalares no Brasil, a elevada resistência no teste *in vitro* frente as cefalosporinas de terceira e quarta geração pode ser decorrente da produção de ESBL. Os antibióticos carbapenêmicos e aminoglicosídeos são os fármacos mais ativos *in vitro*.

Os testes fenotípicos realizados se mostraram práticos e de baixo custo, facilmente adaptáveis a rotina do laboratório de microbiologia.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida AA, Manfré LLM, Garcia MTRCG, Chang MR, Oliveira KMP. Fatores associados a bacteremia por *Klebsiella* spp. em hospital universitário. Evidência. 2012; 12(2):165-174.

Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of Conjugative Plasmid-Mediated AmpC beta-lactamases in The United States. Antimicrobial Agents and Chemother. 2004; 48(2):533-7.

Ambler RP. The Structure of β -lactamases. Philosophical Transactions of the Royal Society B. 1980; 289:321-31.

Andrade, L. N. Estudo fenotípico e molecular de beta-lactamses de espectro estendido e AmpC em enterobactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2008

Augusti GR, Superti S, Zavascki AP. Prevalência de produção de beta-lactamases de espectro estendido em bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Scientia Medica. 2007; 17(4):192-96.

Banderó Filho VC, Reschke CR, Hörner R. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares na Unidade de terapia infantil do Hospital de Caridade e Beneficência de Cachoeira do Sul, RS, Brasil. RBAC. 2006; 38(4):267-70.

Beesley T, Gascoyne N, Knott-Hunziker V, Petursson S, Waley SG, Jaurin B, Grundström T. The inhibition of class C beta-lactamases by coronic acids. Biochem J. 1983; 209(1):229-233.

Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC Disk Test for Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in Enterobacteriaceae Lacking Chromosomal AmpC β -Lactamases. Journal of Clinical Microbiology. 2005; 43(7):3110-3.

Bradford PA. Extended-Spectrum Beta-lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. New York: Clinical Microbiology Review. 2001; 14(4):933-51.

Braga K, Souza I, Santana W, Coutinho H. Micro-organismos mais freqüentes em Unidades de Terapia Intensiva. Revista Médica Ana Costa, out, 2004.

Brasil. Nota Técnica N° 1/2010 - Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por micro-organismos multirresistentes. Unidade de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 25 de outubro de 2010.

Brasil. Portaria nº 2616 de 12 de maio de 1998. Diretrizes e normas para prevenção e controle das infecções hospitalares. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 13 de maio de 1998.

Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Gullans C, Pettinato B, Karumudi U, Tolaney P, Quale J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005; 49(7):3018-20.

Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of Beta-lactamases. Antimicrob Agents and Chemotherapy. 2010; 54(3):969-976.

Chang MR, Biberg CA, Lopes FA, Tetila AF, Pignatari ACC. The first report of infection with *Klebsiella pneumonia* carrying the *blaKPC* gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. 2013; 46(1):114-115.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th informational supplement. Wayne; Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.

Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -Lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. Clinical Microbiology Reviews. 2005; 43(8):4163-7.

Dalmarco EM, Blatt SL, Cordova CM. Identificação laboratorial de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) – Revisão. Revista Brasileira de Análises Clínicas. 2006; 38(3):171-7.

De Moraes, BA, Cravo, CAN, Loureiro, MM, Solari, CA, Asensis, MD. Epidemiological analysis of bacterial strains involved in hospital infection in a University Hospital from Brazil. 2000; 42 (4):201-207.

Errecalde L, Cogut S, Erbin M, Vargas LJ, Cattani E, Posse T, Tutzer S, Hermes R, Kaufman S. CHROMagar KPC. Comparacion con el metodo propuesto por los centros para el control y prevencion de enfermedades (CDC, EE.UU.) para el estudio

de portacion rectal y evaluacion de falsos positivos. Revista Argentina de Microbiologia. 2012; 44:89-93.

García, CS, Gándara, MP, García, FJC. Betalactamasas de espectro extendido em enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica. 2010; 28(1):12-18.

Hamer L, DeZwaan TM, Montenegro-Chamorro MV, Frank AS, Hamer JE. Recent advances in large-scale transposon mutagenesis. Current Opinion in Chemical Biology. 2001; 5(1):67-73.

Hauser, P, Rabodonirina, M, Nevez, G. Hypothetical *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. Emerg Infect Dis, 2009; 15 (3):506-508.

Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamase. N Engl J Med. 2005; 352:380-391.

Jacoby GA, Walsh KE, Walker VJ. Identification of extended-spectrum, AmpC, and carbapenem-hidrolysing beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* by disk tests. J Clin Microbiol. 2006; 44(6):1971-1976.

Jacoby GA. AmpC-lactamases. Clinical Microbiology Reviews. 2009; 22(1):161-82.

Khan E, Schneiders T, Zafar A, Aziz E, Parekh A, Hassan R. Emergence of CTX-M group 1 ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* from tertiary care in Karachi, Pakistan. J Infect Dev Ctries. 2010; 4(8):472-476.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Scherckenberger PC, Win Jr WC. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. 5 ed: Medsi, 2006.

Leavitt A, Venezia SN, Chmelnisky, Schwaber MJ, Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumonia* strains in an Israeli Hospital. Antimicrobial Agents and Chemotheraphy. 2007; 3026-9.

Ling TKW, Tam PC, Liu ZK, Cheng AFB. Evaluation of Vitek 2 rapid identification and susceptibility testing system against Gram-negative clinical isolates. J Clin Microbiol. 2001; 39(8):2964-2966.

Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. Trends in Microbiology. 2006; 14(9): 413-20.

Luiz SO. Caracterização da resistência de amostras de *Acinetobacter baumannii* isoladas no Hospital de Clínicas de Curitiba. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2006.

Mendes RE, Bell JM, Turnidge JD, Yang Q, Yu Y, Sun Z, Jones RN. Carbapenem resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* in China and detections of a conjugative plasmid (*bla*_{KPC-2} plus *qnrB4*) and a *bla*_{IMP-4} gene. Antimicrobial agents and Chemother. 2008; 52(2):798-99.

Monteiro J, Santos A, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009; 333-4.

Nogueira, K. S. Ocorrência de beta-lactamases de espectro ampliado em enterobactérias isoladas em dois hospitais universitários. Dissertação de mestrado, 2009.

Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis. 2009; 9:228–36.

Noyal MJC, Menezes GA, Harish BN, Sujatha S, Parija SC. Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of nonfermentative gram-negative bacteria. Indian J Med Res. 2009; 129:707-12.

Oliveira CF, Forno NLFD, Alves IA, Horta JÁ, Rieger A, Alves SH. Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de beta-lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp no Hospital universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. Rev da Soc Bras de Med Tropical. 2009, 42 (5):556-560.

Pavez M, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009, p. 2702.

Peirano G, Seki LM, Passos VLV, Pinto MCFG, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2009; 63:265-8.

Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-Determined AmpC-Type β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002; 46(1):1-11.

Picão RC, Gales AC. Beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: pesadelo ou só imaginação? *Prática Hospitalar*. 2007; 49:79-84.

Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008; 8:159-66.

Pitout JDD. The latest threat in the war on antimicrobial resistance. *Lancet Infect Dis*. 2010; 10:578-579.

Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Böttger EC, Hombach M. Practical Approach for reliable detection of AmpC Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011; 49(8):2798-2803.

Powers JH. Antimicrobial drug development – the past, the present, and the future. *Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2004; 10(4):23-31.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007; 20(3):440-58.

Rossi F, Andreazzi DB. Resistência Bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo: Ed Atheneu; 2005.

Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*. 2011; 52(9):1138-1143.

Souza AS, Torres JB, Oliveira RC. Identificação laboratorial de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) em espécimes clínicos de origem hospitalar. *RBAC*. 2010; 42 (4): 303-306.

Sturenburg E, Storm N, Sobottka I, Horstkotte MA, Scherpe S, Aepfelbacher M, Muller S. Detection and Genotyping of SHV beta-lactamase variants by mass spectrometry after base specific cleaved of in vitro generated RNA transcripts. *J Clin Microbiol*. 2005; 44 (3):909-915.

Tiple AFV, Sá AS, Mendonça KM, Sousa ACS, Santos SLV. Técnica de higienização das mãos: a prática entre acadêmicos de enfermagem. *Ciencia y Enfermaria*. 2010; 16(1):49-58.

Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Digalaki KT, Ikonomidis A, Petropoulou D, Pournaras S, Sofianou D. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*. 2009; 47(2): 362-7.

Varaiya AY. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 2008; 51(3):370-2.

Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez AA, Vallejo M, Quinn JP. First detection of the plasmid-mediate class a carbapenemases KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006; 50(8):2880-2.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1991; 35:147-51.

Weinbren MJ, Borthwick MA. Rapid detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing organisms in blood culture. *J Antimicrobial Chemoth*. 2005; 55:131-132.

Woodford N, Tierno PM, Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, Painter RE, Suber DF, Shungu D, Silver LL, Inglima K, Kornblum J, Livemore DM. New York medical center. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(12):4793-99.

Yan JJ et al. Complexity of *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant to both cephamycins and extended-spectrum cephalosporins at a teaching hospital in Taiwan. *Journal Antimicrobial Chemother*. 2004; 42:5337-40.

Yigit H et al. Novel carbapenem-hydrolyzing betalactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(4):1151-61.

ANEXO A



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS



Carta de Aprovação

O protocolo nº 1752 da Pesquisadora Marilene Rodrigues Chang intitulado "Investigação de beta-lactamases em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes atendidos em dois Hospitais Universitários de Mato Grosso do Sul", aprovado em reunião ordinária no dia 20 de maio de 2010, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. *Ernesto Antônio de Aguiar Filho*

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 21 de maio de 2010.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187