

Evelin Rodrigues Martins

Investigação de genes de resistência a carbapenêmicos, cefalosporinas e quinolonas e tipagem molecular de *Enterobacter* spp isolados de pacientes internados em um hospital terciário do Estado de São Paulo.

São José do Rio Preto
2015

Evelin Rodrigues Martins

Investigação de genes de resistência a carbapenêmicos, cefalosporinas e quinolonas e tipagem molecular de *Enterobacter* spp isolados de pacientes internados em um hospital terciário do Estado de São Paulo.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara C. Lelles Nogueira.

São José do Rio Preto
2015

Martins, Evelin Rodrigues.

Investigação de genes de resistência a carbapenêmicos, cefalosporinas e quinolonas e tipagem molecular de *Enterobacter* spp isolados de pacientes internados em um hospital terciário do Estado de São Paulo / Evelin Rodrigues Martins -- São José do Rio Preto, 2015

89 f. : il., tab.

Orientador: Mara C. Lelles Nogueira

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia médica. 2. Agentes anti-infecciosos. 3. Enterobactérias. 4. Drogas - Resistência em microorganismos. 5. Antibióticos beta-lactâmicos. 6. Tipagem molecular. 7. Infecção hospitalar - São José do Rio Preto (SP)
I. Nogueira, Mara Corrêa Lelles. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Evelin Rodrigues Martins

Investigação de genes de resistência a carbapenêmicos, cefalosporinas e quinolonas e tipagem molecular de *Enterobacter* spp isolados de pacientes internados em um hospital terciário do Estado de São Paulo.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Mara Correa Lelles Nogueira
FAMERP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Doroti de Oliveira Garcia
Instituto Adolfo Lutz - São Paulo

Prof. Dr. Aripuanã S. Aranha Watanabe
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman
USP- São Paulo

Prof. Dr. Mânlio Tasso de Oliveira Mota
FAMERP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
03 de Junho de 2015

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Nilson Martins da Silva e Adelaide Rodrigues Martins
pelo apoio e carinho constantes*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e coragem, e por permitir que mesmo com medo eu sempre supere meus obstáculos.

À minha família, meu pai, minha mãe, e meu irmão Marcelo R. Martins que mesmo a muitos quilômetros de distância, sempre estiveram do meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis.

À Professora Dra. Mara Correa Lelles Nogueira, pelos ensinamentos, orientação e compreensão ao longo deste trabalho. Muito obrigada pela confiança.

Ao Professor Dr. Mauricio Lacerda Nogueira por conceder-me um espaço no Laboratório de Pesquisa em Virologia para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório de Microbiologia do Hospital de Base, Dr^a Maria Gabriela de Lucca, Lucy, José Carlos, Adenice, Débora, Rogéria, Dionízia, Rosa, Paulo, Raphael e Rosana, pelo auxílio na coleta das “bactérias fofas” e à CCIH, pela transmissão de informações importantes para a escrita deste trabalho.

As amigas, Simone Quintão Silva nossa... Como eu te perturbei nesses dois anos! Obrigada por todas as conversas e incentivo para eu não desanimar. E a Ana Carolina Tegen de Freitas (Carolinda) a iniciação científica mais querida e esforçada que conheci. Obrigada por sempre me ajudar.

Aos colegas do laboratório CIM – Centro de Investigação de Microrganismos Fernanda, Tiago e Mayra pelo auxílio e amizade.

Aos colegas do LPV-Laboratório de Pesquisa em Virologia: Nathália, Tauyne, Ari e Milene pelo apoio e força nos fins de semana e muitas vezes feriados em que precisávamos estar nos laboratórios realizando nossos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Micologia da FAMERP Professora Dra. Margarete Gottardo de Almeida, Eduardo, Máisa Sartim, e especialmente a Luceli que adoro de paixão.

Aos Professores e à Coordenação do Curso de Pós Graduação em Microbiologia da UNESP por contribuírem para o enriquecimento de meu conhecimento.

À agência CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo auxílio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mecanismo de Ação dos β -lactâmicos. Adaptados de Suárez e Gudiol.....	21
Figura 2.	Distribuição de sessenta isolados de <i>Enterobacter</i> spp em diferentes amostras biológicas.....	52
Figura 3.	Distribuição das amostras biológicas por espécies de <i>Enterobacter</i> spp.....	52
Figura 4.	Distribuição dos sessenta pacientes presentes nas diferentes Unidades de Internação do Hospital de Base.....	54
Figura 5.	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de <i>Enterobacter</i> spp.....	56
Figura 6.	Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene <i>bla_{KPC}</i>	57
Figura 7.	Eletroforese em gel agarose mostrando o produto de amplificação do gene <i>bla_{TEM-like}</i> e <i>bla_{SHV-like}</i>	58
Figura 8.	Eletroforese em gel agarose mostrando o produto de amplificação do gene <i>bla_{CTX-M}</i>	59
Figura 9.	Eletroforese em gel agarose mostrando o produto de amplificação dos grupos de <i>bla_{CTX-M}</i>	60
Figura 10.	Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene <i>aac(6')-Ib</i>	61
Figura 11.	Dendrograma ilustrando a relação epidemiológica entre os isolados clínicos de <i>Enterobacter cloacae</i> estudados (AnexoI).....	89
Figura 12.	Dendrograma ilustrando a relação epidemiológica entre os isolados clínicos de <i>Enterobacter aerogenes</i> estudados.....	67

LISTA DE QUADROS e TABELA

Quadro 1.	Classificação de algumas quinolonas e suas respectivas gerações.....	21
Quadro 2.	Padrões de Interpretação de valores de CIM para Enterobacteriaceae segundo CLSI, 2013 e Norma técnica 1/2013 da Anvisa.....	37
Quadro 3.	<i>Primers</i> utilizados para investigação de genes carbapenemases das classes A, B e D.....	39
Quadro 4.	Protocolo Duplex PCR para detecção das carbapenemases do tipo KPC e NDM	40
Quadro 5.	Protocolo Triplex PCR para detecção carbapenemases do tipo IMP, VIM e OXA-48.....	40
Quadro 6.	<i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR para investigação de genes de resistência às cefalosporinas de 3 ^a e 4 ^a geração.....	41
Quadro 7.	Protocolo Multiplex-PCR detecção dos genes <i>bla</i> _{TEM-like} e <i>bla</i> _{SHV-like}	42
Quadro 8.	Protocolo Multiplex-PCR detecção dos genes <i>bla</i> _{GES-like} , <i>bla</i> _{PER-like} e <i>bla</i> _{VEB-like}	43
Quadro 9.	Protocolo Single PCR para detecção do gene <i>bla</i> _{CTX-M-like}	44
Quadro 10.	Protocolo Multiplex-PCR para investigação dos Grupos 1, 2 e 9 de CTX-M.....	44
Quadro 11.	Protocolo Single PCR para investigação dos Grupos 8 e 25 de CTX-M.....	45
Quadro 12.	<i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR para investigação de genes de resistência PMQR.....	46
Quadro 13.	Protocolo Multiplex-PCR para detecção de <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> e <i>qnrB</i>	46
Quadro 14.	Protocolo Single PCR para detecção da bomba efluxo <i>qepA</i>	47
Quadro 15.	Protocolo Single PCR para detecção do gene da N-acetiltransferase <i>aac</i>	48
Quadro 16.	<i>Primer</i> e Protocolo para ERIC-PCR utilizado no estudo.....	50
Tabela 01.	Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentado por 60 <i>Enterobacter</i> spp e seus respectivos genótipos de resistência.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µM – Micromolar

x *g* – giros

Kb – Quilobases

mL – Mililitro

mg – miligrama

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

pb - Pares de bases

pH - Potencial hidrogeniônico

pmol – Picomol

ATCC - “*American Type Culture Collection*”

BEL- “*Belgium ESBLs*”

BES- “*Brazilian ESBLs*”

CDC- *Centers for Disease Control and Prevention*

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”

CHDL - “*Carbapenem Hydrolysing class D beta-Lactamases*”

CTX-M- “*Cefotaximase-Munich*”

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Deoxynucleoside Triphosphate

DRS - Divisão Regional de Saúde

EA- *Enterobacter aerogenes*

EC- *Enterobacter cloacae*

ECDC- *European Centers for Disease Prevention and Control*

ERIC-PCR - “*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR*”

ESBL - “*Extended-spectrum beta-lactamase*”

EUA - Estados Unidos da América

FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

GES- “*Guyana ESBLs*”

HB - Hospital de Base

IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITU-RAS- Infecção do Trato Urinário-Relacionada Assistência à Saúde
LC-HB- Laboratório Central - Hospital de Base
LPS – Lipo Polissacarideo
MBLs - *Metallo-beta-lactamases*
MDR – “*Multi Drug Resistant*”
OXA- “Oxacilinasas”
PAV - Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica
PCR - “*Polymerase chain reaction*”
PBP- “*Penicillin Binding Protein*”
PER- “*Pseudomonas Extended Resistance*”
PMQR- “*Plasmid Mediated Quinolone Resistance*”
Qnr- “*Quinolone resistance*”
QRDR- “*Quinolone-Resistance Determining Region*”
SCOPE - *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance*
SENTRY - “*Antimicrobial Surveillance Program*”
SHV- “*Sulphydryl Variable*”
SFO- “*Serratia fonticola*”
TEM- **Tem**oriana (paciente grega da qual foi isolada o primeiro microrganismo com essa beta-lactamase)
TLA- “**Tl**ahuicas (Indian tribe)”
TSA- Teste Susceptibilidade Antimicrobiana
U- Unidade
UFC- Unidade Formadora de Colônia
UTI- Unidade Terapia Intensiva
Zn²⁺ íons Zinco

RESUMO

O gênero *Enterobacter* compreende bactérias anaeróbias facultativas, fermentadores de glicose e ubíquo na natureza. Atualmente, existem 28 espécies de *Enterobacter* spp que podem ser identificadas por métodos bioquímicos, moleculares ou por espectrometria de massa. As infecções mais causadas por *Enterobacter* spp são de pele e tecidos moles, pneumonias e bacteremias, e, para o tratamento destas, os antimicrobianos mais utilizados são carbapênemicos, cefalosporinas e quinolonas. Entretanto, a resistência aos antimicrobianos tem aumentado no gênero *Enterobacter*, principalmente, devido à mecanismos enzimáticos codificados por genes plasmidiais. Os objetivos deste estudo foram avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, investigar genes de beta-lactamases (*bla*_{TEM-like}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{VEB-like}, *bla*_{PER-like}, *bla*_{GES-like}, *bla*_{CTX-M-like}), carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{GES} e *bla*_{OXA-48}) e de enzimas que conferem resistência as quinolonas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA*) e determinar a similaridade genética entre os isolados de *Enterobacter* spp. Sessenta isolados de *Enterobacter* spp resistentes aos carbapenêmicos, cefalosporinas de terceira e quarta geração e quinolonas provenientes de pacientes admitidos em diferentes unidades de internação do Hospital de Base de São José do Rio Preto (HB) foram encaminhados ao laboratório CIM-Centro de Investigação de Microrganismos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), onde foram realizadas a extração de DNA, a investigação dos genes por PCR e a tipagem molecular por ERIC-PCR. O gene de resistência *bla*_{KPC} foi detectado em 22% dos isolados. Os genes *bla*_{TEM-like} e *bla*_{CTX-M-like} em 82% e *bla*_{SHV-like} em 3% dos isolados respectivamente. O grupo 1 de CTX-M foi detectado em 56,5%, do grupo 2 em 41,3% e do grupo 8/25 em 2,2% dos isolados. Os genes de resistência a quinolonas detectados foram *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* em 40%, 22% 2% dos isolados respectivamente. A tipagem por ERIC-PCR gerou doze grupos genéticos (G1 a G12) para *E. cloacae* e um grupo (G1) para *E. aerogenes*, foi observada a transmissão horizontal de genes de resistência em alguns grupos, porém os grande polimorfismo genético entre as cepas de *Enterobacter* spp dificultou determinar clones epidêmicos nas diferentes unidades de internação do HB.

Palavras-Chaves: *Enterobacter* spp. Resistência. Beta-lactâmicos. Quinolonas. Tipagem molecular.

ABSTRACT

The *Enterobacter* genus comprises facultative anaerobic bacteria, glucose fermenters and ubiquitous in nature. Currently, there are 25 species of *Enterobacter* spp and two which can be identified by biochemical, molecular methods or by mass spectrometry. Infections caused by *Enterobacter* spp are skin and soft tissues, bacteremia and pneumonia, and for the treatment of these, the most commonly used antimicrobials are carbapenems, cephalosporins and quinolones. However, antimicrobial resistance has increased the *Enterobacter* spp mainly due to enzymatic mechanisms encoded by plasmid genes. The objectives of this study were to evaluate the antimicrobial susceptibility profile, investigate beta-lactamase genes (*bla*_{TEM-like}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{VEB-like}, *bla*_{PER-like}, *bla*_{GES-like}, *bla*_{CTX-M-like}), carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{GES} and *bla*_{OXA-48}) and enzymes that confer resistance to quinolones (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac* (6') - *Ib-cr* and *qepA*) and determine the genetic similarity among isolates of *Enterobacter* spp. Sixty isolates of *Enterobacter* spp resistant to carbapenems, cephalosporins (third and fourth generation) and quinolones from patients admitted to the Base Hospital (HB), were sent Laboratory - Microorganisms Research Centre the School of Medicine of São José do Rio Preto (FAMERP), where DNA extraction, the investigation of genes and molecular typing by ERIC-PCR were carried out. The *bla*_{KPC} resistance gene was detected in 22% of the isolates. The genes *bla*_{TEM-like} and *bla*_{CTX-M-like} 82%, *bla*_{SHV-like} 3% of the isolates. The group 1 CTX-M was detected in 56.5%, of group 2 in 41.3% and 8/25 group at 2.2% of the isolates. The quinolone resistance genes *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* were detected in 40% 22% 2% of the isolates, respectively. The ERIC-PCR typing by genetic generated twelve groups (G1 to G12) for *E. cloacae* and one group (G1) for *E. aerogenes*, horizontal transfer of resistance genes in some groups was observed, but the extensive genetic polymorphism among *Enterobacter* spp strains difficult to determine epidemic clones in different inpatient units of HB.

Keywords: *Enterobacter* spp. Resistance. Beta-lactams. Quinolones. Molecular typing.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 O gênero <i>Enterobacter</i> e suas espécies.....	17
2.2 <i>Enterobacter</i> spp e as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS)	18
2.3 Antimicrobianos utilizados no tratamento de <i>Enterobacter</i> spp	20
2.3.1 Beta-lactâmicos.....	20
2.3.2 Quinolonas	21
2.3.3 Aminoglicosídeos, Polimixinas e Tigeciclina.....	22
2.4 Resistência a antimicrobianos em <i>Enterobacter</i> spp.	23
2.4.1 Resistência aos beta-lactâmicos	24
2.4.1.1 Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL).....	25
2.4.1.2 Carbapenemases.....	26
2.4.2 Resistência às Quinolonas	29
2.4.2.1 Resistência às quinolonas codificada por genes localizados em plasmídeos.....	29
2.4.2.1a Enzimas Qnr.....	30
2.4.2.1b Aminoglicosídeo Acetiltransferase – cr / Aac(6')Ib-cr.....	30
2.4.2.1c Sistemas de Efluxo	31
2.5 Tipagem Molecular.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1 Amostras de <i>Enterobacter</i> spp.....	36
4.2 Identificação e determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.....	36
4.3 Armazenamento e manutenção dos isolados	37
4.4 Extração de DNA genômico bacteriano	38
4.5 Investigação de genes resistência por Reação em Cadeia da Polimerase	38
4.5.1 Genes de carbapenemases das classes A, B e D (Multiplex-PCR).....	38
4.5.2 Genes de beta-lactamases do tipo ESBL.....	41
4.5.3 Genes resistência a quinolonas.....	45
4.6 Tipagem molecular de <i>Enterobacter</i> spp. pelo método de ERIC-PCR	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Perfil clínico-epidemiológico.	52
5.2 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentado pelos isolados de <i>Enterobacter</i> spp.....	54
5.3 Investigação de genes carbapenemases	57
5.4 Investigação de genes de Beta Lactamases de Espectro Estendido (ESBL)	58
5.4.1 Investigação de <i>bla</i> _{TEM-like} e <i>bla</i> _{SHV-like}	58
5.4.2 Investigação de <i>bla</i> _{CTX-M}	58
5.5 Investigação de genes de resistência a quinolonas localizados em plasmídeos (PMQR)	60
5.6 Tipagem molecular das cepas de <i>Enterobacter cloacae</i> e <i>E. aerogenes</i>	64
6. CONCLUSÕES.....	69
7. REFERÊNCIAS	71
ANEXO I.....	89

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um dos principais problemas de saúde pública mundial, que limita o sucesso terapêutico, resultando no prolongamento da internação hospitalar, aumento da complexidade e dos custos financeiros do tratamento, e das taxas de mortalidade e morbidade (HOWARD et al., 2010; OMS - Organização Mundial de Saúde <http://eventos.opasbrasil.org/temas:DMS>).

Neste contexto, destacam-se os patógenos do gênero *Enterobacter* spp, que são conhecidos por causarem no Brasil e no mundo uma diversidade de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), tais como infecções de pele e do trato urinário, pneumonia e bacteremia (BRATU et al., 2005; MARCHAIM et al., 2008; ANDRADE et al., 2008; MARRA et al., 2011; DOTIS et al., 2013; IRENGE et al., 2014). Estas infecções são consideradas de difícil tratamento, pois *Enterobacter* spp apresentam resistência natural (intrínseca) a vários antimicrobianos (HILTY et al., 2013), e evoluem constantemente com ampliação de seu perfil de resistência, em decorrência do desenvolvimento de novos mecanismos adquiridos por mutação de genes cromossomais ou transmissão horizontal de genes (LEVI; MARSHALL, 2004; COLLINGON, 2012).

Os principais antimicrobianos usados para o tratamento de infecções *Enterobacter* spp são os beta-lactâmicos de amplo espectro, tais como cefalosporinas de 3º e 4º geração (ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima e cefepime) e carbapenêmicos (ertapenem, imipenem, meropenem e doripenem); e as fluoroquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina) (PFEIFER et al., 2010). Entretanto, as taxas de resistência a estes antimicrobianos têm aumentado em todo o mundo (MEZZATESTA et al., 2012). Esta realidade tem sido também observada no Hospital de Base (HB) da Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, onde bactérias do gênero *Enterobacter* spp., principalmente *Enterobacter aerogenes* e do complexo *Enterobacter cloacae* multirresistentes têm sido associadas, com crescente frequência, às infecções graves em pacientes admitidos em diferentes unidades de internação (CCIH, comunicação pessoal).

O HB é um importante hospital-escola de nível terciário do Estado de São Paulo, que atende a uma população de dois milhões de habitantes dos 102 municípios pertencentes à Divisão Regional de Saúde de São José do Rio Preto (DRS 15). Possui 727 leitos, incluindo-se as unidades de terapia intensiva (UTIs). Na instituição são realizadas cirurgias cardíacas, neurocirurgias, atendimento ao trauma e transplantes. Em média, a instituição realiza 2.250

cirurgias mensalmente, 12.000 atendimentos de emergência e 4.000 no Instituto do Câncer (<http://hospitaldebase.com.br/hb-numeros> - pesquisado em 09.03.15).

Devido à complexidade da assistência médica prestada na instituição e à gravidade dos quadros clínicos dos pacientes atendidos, programas de prevenção e controle das infecções são de grande importância. Neste contexto, estudos visando o conhecimento dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos e o perfil de disseminação de patógenos multirresistentes, podem auxiliar no estabelecimento de protocolos de antibioticoterapia e de prevenção de contato e isolamento.

Neste estudo, foram investigados os determinantes genéticos responsáveis pela resistência aos carbapênemicos, cefalosporinas e quinolonas, bem como a similaridade genética entre *Enterobacter* spp isolados de pacientes admitidos no HB.

Revisão Bibliográfica

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Enterobacter* e suas espécies

O gênero *Enterobacter* pertence família *Enterobacteriaceae* e compreende espécies de bactérias Gram-negativas que se apresentam como bacilos fermentadores de glicose, anaeróbios facultativos, móveis, não fastidiosos, catalase positivos, oxidase e DNase negativos. É ubíquo na natureza, sendo encontrado no solo, água, animais e humanos, onde fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal (PONTES, et al. 2007; WEESE, 2008; MEZZATESTA et al., 2012).

O gênero foi descrito pela primeira vez por Hormaeche e Edwards em 1960, e nos últimos 50 anos tem sofrido modificações taxonômicas significantes como por ex., *Enterobacter agglomerans* classificada como gênero *Pantoea* e *E. sakazakii* ao gênero *Cronobacter* (IVERSEN, et al 2008).

Atualmente, existem 28 espécies do gênero *Enterobacter* (*E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. arachidis*, *E. asburiae*, *E. cancerogenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. dissolvens*, *E. gergoviae*, *E. helveticus*, *E. hormaechei*, *E. intermedius*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. massiliensis*, *E. mori*, *E. nimipressuralis*, *E. oryzae*, *E. pulveris*, *E. pyrinus*, *E. radicincitans*, *E. sacchari*, *E. siamensis*, *E. soli*, *E. taylorae*, *E. turicensis* e *E. xiangfangensis*) e 02 subespécies *E. cloacae* subsp. *cloacae* e *E. cloacae* subsp. *dissolvens* (LPSN - www.bacterio.cict.fr/e/enterobacter.html - Pesquisado em 21/06/15). Seis destas espécies (*E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. nimipressuralis*) formam o complexo *Enterobacter cloacae*, sendo que a maior parte destas espécies compartilha de 61 a 67% da sequência do DNA de *E. cloacae* (HOFFMANN; ROGGENKAMP, 2003).

Vários são os sistemas de identificação para o gênero *Enterobacter* e suas espécies. Os sistemas de identificação comercial com reações bioquímicas miniaturizadas são amplamente utilizados nos laboratórios de microbiologia clínica. Entretanto, cepas com um perfil bioquímico atípico podem não ser identificadas de forma correta. Deste modo, a identificação genotípica tem sido desenvolvida como uma alternativa ou complemento aos métodos fenotípicos (DELMAS et al., 2006).

As técnicas de PCR e sequenciamento do gene 16S DNA ribossomal (DNAr), juntamente com a determinação das sequências de outros genes, tais como *rpoB*, *infB*, *gyrB*, *tuf*, *atpD*, *oriC* e *dnaJ* são considerados ferramentas moleculares complementares para delinear as espécies do gênero *Enterobacter* (NHUNG et al., 2007).

Nos últimos anos a espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of flight*), também vem ganhando importância, por se tratar de uma metodologia rápida na identificação de diferentes gêneros bacterianos, inclusive *Enterobacter* e suas espécies (PASTERNAK 2012; PAVLOVIC et al., 2012; RICHTER et al., 2013).

2.2 *Enterobacter* spp e as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS)

O gênero *Enterobacter* spp encontra-se entre as principais *Enterobacteriaceae* causadoras de infecções, tanto no âmbito hospitalar como na comunidade. A sua ubiquidade contribui para a introdução e manutenção no âmbito hospitalar. Nas últimas décadas, vários estudos de vigilância relatam *Enterobacter* spp como um dos patógenos mais comuns ocasionando bacteremias, pneumonias, infecções do trato urinário e pele (STREIT, et al., 2004; HIDRON, et al., 2008).

Nos EUA, espécies de *Enterobacter* formam o segundo grupo de patógenos mais comumente responsável por pneumonias e o quinto patógeno causador de infecções de corrente sanguínea em pacientes internados de unidades de terapia intensiva (BRATU, et al., 2005; MARCHAIM et al., 2008). O estudo realizado por Dotis e colaboradores (2013) relata *Enterobacter cloacae* como o terceiro causador de infecções do trato urinário (ITUs) em pacientes pediátricos de um hospital geral terciário da Turquia. Nos anos de 2009 a 2011, *Enterobacter* spp foi o quarto patógeno mais isolado em pacientes de unidades de terapia intensiva da Europa e dos Estados Unidos (SADER et al, 2014).

No Brasil, existem poucos dados relacionados à IRAS por *Enterobacter* spp. O programa de vigilância antimicrobiana SENTRY realizou um estudo entre os anos de 2003 a 2008, onde foram investigadas as principais *Enterobacteriaceae* responsáveis por IRAS em quatro hospitais brasileiros. Entre elas, *Enterobacter* spp foi o quarto principal patógeno associado às infecções de pele e tecidos moles (10,8%), o quinto patógeno associado à pneumonia (7,4%) e o sétimo associado às infecções de corrente sanguínea (6,4%) (ANDRADE, et al., 2008). Outro grupo de estudo (SCOPE- *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance*) relatou que em 2447 casos de bacteremias, o *Enterobacter* spp foi 6º patógeno mais isolado em 16 hospitais brasileiros no período de 2007 a 2010 (MARRA et al., 2011).

A bacteremia nosocomial é assim confirmada quando há isolamento de um ou mais microrganismos após 24 horas de admissão hospitalar na presença de sintomas de infecção

(AL MOHAJER; DAROUICHE, 2012). Muitos estudos relatam os fatores de risco de bacteremia por *Enterobacter* spp, como pela utilização prévia de antimicrobianos, tempo de internação prolongado, presença de dispositivos intravasculares e doenças de base tais como: neoplasias, doenças cardíacas, renais e diabetes (YE et al, 2006; MARCOS et al, 2008; HILTY et al, 2013).

A infecção do trato urinário relacionada à assistência à saúde no adulto é definida como qualquer infecção relacionada ou não a procedimento urológico, diagnosticada após admissão em serviço de saúde e para a qual não são observadas quaisquer evidências clínicas e não estar em seu período de incubação no momento da admissão (CHEBABO et al., 2013). No Brasil, o programa de vigilância de bactérias resistentes a múltiplas drogas em infecções relacionadas à assistência à saúde de Curitiba, realizou um estudo entre os anos de 2010 e 2011, onde *Enterobacter* spp foi o terceiro patógeno causador de infecções do trato urinário em 26 hospitais do Sul do País (TOLEDO et al, 2012).

A pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) é definida como infecção que se desenvolve após 48 horas de intubação endotraqueal. É o tipo de infecção mais frequente em unidades de terapia intensiva (UTIs), com taxas que variam de 9 a 27%, dependendo do tipo de UTI e do diagnóstico (GARNER et al, 1998; TEJERINA et al, 2006; BOWTON et al., 2013). *Enterobacter* spp é um importante agente etiológico de PAV e existem alguns fatores de riscos associados a essas infecções, tais como ventilação mecânica prolongada, episódios anteriores de sepse, reintubação e utilização prévia de antimicrobianos (ROCHA et al, 2008; HO et al, 2010; AUBRON et al, 2011).

Enterobacter cloacae e *E. aerogenes* são importantes patógenos nosocomiais, bem como, são as espécies mais comumente encontradas em amostras clínicas (WINN et al., 2010). De acordo com a Agência de Saúde Pública do Canadá, *E. cloacae* e *E. aerogenes* são responsáveis por 65-75% e 15-25 %, das infecções por *Enterobacter* spp, respectivamente (<http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/enterobacter-eng.php> pesquisado em 19/05/2015). Outras espécies ocorrem raramente, mas ainda assim ocasionando doenças graves (GARAZZINO et al., 2004; CAMPOS et al., 2007; DALBEN et al., 2008; KESIEME et al., 2012; DEMIR et al., 2014; SATLIN et al., 2013; ALMEIDA et al., 2014; KHAJURA et al., 2013).

No Brasil, *E. aerogenes* produtora de carbapenemase ocasionou infecções graves em dezesseis pacientes internados do hospital universitário Evangélico em Curitiba (TUON, 2015).

2.3 Antimicrobianos utilizados no tratamento de *Enterobacter* spp

O tratamento de infecções por *Enterobacter* pode ser realizado, principalmente, com beta-lactâmicos associados ou não a inibidores de beta-lactamases, aminoglicosídeos, quinolonas, polimixinas e tigeciclina (PINTADO et al, 2008; NAMDARI et al, 2012).

2.3.1 Beta-lactâmicos

Os antimicrobianos beta-lactâmicos possuem em comum um anel beta-lactâmico que pode apresentar-se isolado ou conjugado a outro anel, resultando em estruturas bicíclicas. São representados pelas penicilinas, cefalosporinas, monobactâmico e carbapenêmicos e estão entre os mais prescritos em todo o mundo (DRAWZ; BONOMO, 2010).

São agentes bactericidas que agem através da inibição da síntese da parede celular bacteriana (figura 1), que por sua vez é composta por unidades alternadas de ácido N-acetilmurânico (NAM) e N-acetilglicosamina (NAG) formando camadas de peptideoglicano. Cada NAM possui um terminal pentapeptídico com dois resíduos de D-alanina na sua extremidade. A ligação covalente entre esses dois resíduos (transpetidação) é catalisada pelas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). Essas ligações, que se repetem ao longo de toda a parede celular, são essenciais para conferir rigidez e estabilidade à célula. O anel beta-lactâmico tem a estrutura semelhante ao terminal D-alanina-D-alanina do NAM, o que permite a sua ligação às PBPs tornando-as incapazes de catalisar outras reações de transpetidação (SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

Entre os beta-lactâmicos as cefalosporinas de terceira e quarta geração, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e cefepima respectivamente, têm sido amplamente utilizadas no tratamento de infecções *Enterobacter* spp no âmbito hospitalar. Além destas, beta-lactâmicos associados a um inibidor de betalactamase, como a piperacilina/tazobactam, tem sido considerado eficientes para o tratamento de infecções por *Enterobacter* spp pois, estas bactérias não apresentam resistência natural a esta combinação, como ocorre a com amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas de primeira e de segunda geração (ROSSI; ANDREAZZI, 2005; HARRIS; FERGUSON, 2012). Finalmente, os carbapenêmicos são os beta-lactâmicos de escolha para o tratamento de infecções por cepas produtoras de enzimas resistentes às cefalosporinas de terceira geração (KANIGA et al, 2010; HILTY et al, 2013).

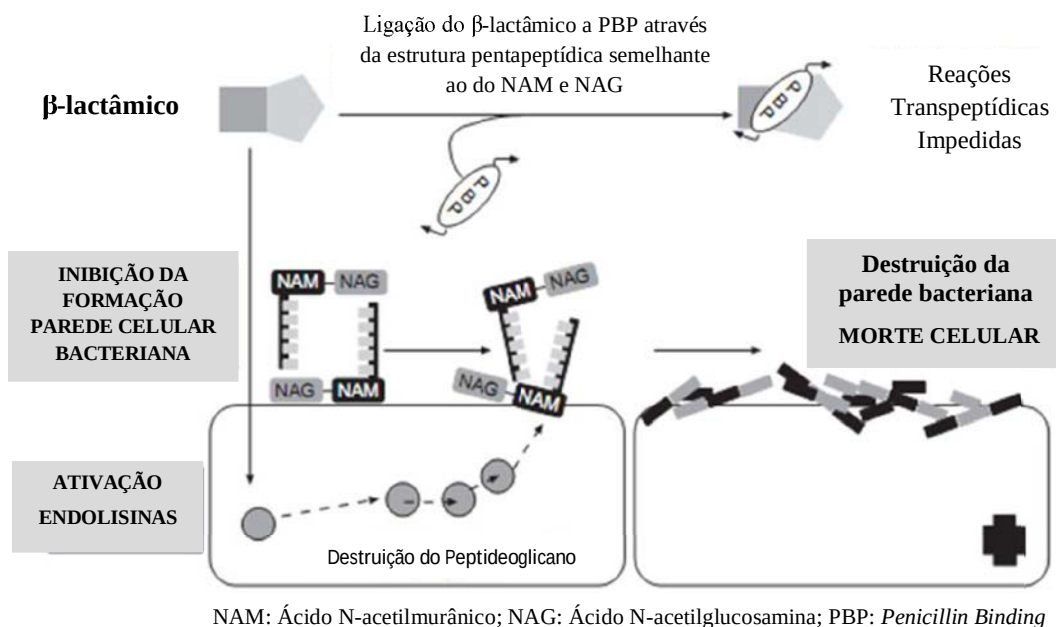


Figura 1. Mecanismo de ação dos β -lactâmicos. Adaptado de Suárez e Gudiol (2009).

2.3.2 Quinolonas

As quinolonas são quimioterápicos descobertos durante o desenvolvimento de um agente antimalárico, a partir de um composto chamado quinina. Estes quimioterápicos possuem ação bactericida e de amplo espectro, abrangendo tanto Gram positivos quanto Gram negativos (ANDERSSON; MACGOWAN, 2003; VAN BAMBEKE et al., 2005). As quinolonas são distribuídas em quatro grupos (quadro 1), segundo classificação utilizada por Lee e Kanatani (1999) e Bolon (2011). Representantes de cada uma das quatro “gerações” podem ser observadas no quadro 1.

Quadro 1. Classificação de algumas quinolonas e suas respectivas gerações.

Primeira Geração	Segunda Geração	Terceira Geração	Quarta Geração
Ácido Nalidíxico	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Moxifloxacina
Ácido Pipemídico	Norfloxacina	Esparfloxacina	Trovafloxacina
	Ofloxacina	Grepafloxacina	Gemifloxacina

Fonte: Adaptado de LEE e KANATANI (1999) e BOLON (2011).

O ácido nalidíxico foi a primeira quinolona a ser produzida e introduzida na clínica médica em 1962. Possui espectro de ação contra Gram negativos e baixa atividade contra Gram positivos, e é predominantemente utilizado nas infecções do trato urinário (BALL, 2000).

Na década de 1980, foram introduzidas as fluoroquinolonas, assim chamadas devido ao acréscimo de uma molécula de flúor, na região do carbono – 6. Estas por sua vez, adquiriram espectro de ação ampliada com alta eficácia contra Gram negativos (BALL, 2000; EMMERSON; JONES, 2003; HAWKEY, 2003).

As quinolonas agem inibindo as enzimas responsáveis pela replicação do DNA bacteriano, as topoisomerases. A DNA-girase (Topoisomerase II) é formada por duas subunidades A e duas subunidades B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB* respectivamente. Esta enzima é responsável por diminuir o número de torções durante a replicação do DNA, e também tem a função de enovelar e superelicoidizar o DNA (HAWKEY, 2003). A Topoisomerase IV é um tetrâmero formado por duas subunidades C e duas subunidades E, codificadas respectivamente pelos genes *parC* e *parE*. Esta enzima tem a função de separar a nova cópia de DNA do antigo cromossomo para permitir a formação de uma célula-filha (DRLICA et al., 2008; FALCONER et al., 2011).

O mecanismo de ação das fluoroquinolonas consiste em se ligar às enzimas alvo, formando um complexo (quinolona-enzima-DNA) e impedir o desempenho da função das mesmas. Ao inibirem estas enzimas, não permitem que o processo de replicação continue e promovem rupturas nas cadeias de nucleotídeos, gerando pontas livres, e consequentemente a degradação da molécula de DNA. A captura destas enzimas ocorre quando o complexo enzima-DNA já está formado, e impede a reparação da cadeia de DNA, desencadeando a morte celular (DRLICA et al., 2008; KOHANSKI et al., 2010).

As fluoroquinolonas, entre elas ciprofloxacina e norfloxacin são opções de relevância no tratamento de infecções nosocomiais. (PFEIFER et al, 2010). No entanto, a taxa de resistência as fluoroquinolonas tem crescido durante as últimas duas décadas em praticamente todo o mundo (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; CALVO, 2010).

2.3.3 Aminoglicosídeos, Polimixinas e Tigeciclina

Os aminoglicosídeos são compostos policatiônicos, formados por um derivado de inositol ligado a um aminoaçúcar, contendo grupos hidroxila livres e pelo menos dois grupos

amino. Inicialmente se ligam aos resíduos de carga negativa presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas e nos ácidos teicóicos de Gram-positivas, e posteriormente os grupos hidroxila e amino são os elementos chaves na interação com o RNA da subunidade 30S do ribossomo (BECKER; COOPER, 2013).

O mecanismo de ação dos aminoglicosídeos consiste na interação com a subunidade 30S do ribossomo procariótico. O antimicrobiano se liga ao sítio A do RNA ribossômico 16S induzindo uma mudança na conformação que causa uma leitura errônea do RNA mensageiro, resultando em proteínas sem função (AZUCENA; MOBASHERY, 2001).

Essa classe de antimicrobianos consiste de vários agentes como a gentamicina, ampicacina, tobramicina, estreptomicina, neomicina, kanamicina, entre outros. Entre estes, ampicacina, gentamicina e tobramicina são os mais prescritos, e a indicação clínica mais comum é no tratamento de infecções graves causadas por bacilos Gram-negativos, tais como o *Enterobacter* spp (BASSETTI et. al., 2013).

As polimixinas são antimicrobianos polipeptídicos cíclicos fortemente catiônicos, devido à presença de cinco grupos amino livres (BERGEN et. al., 2011; YAHAV et. al., 2011). O mecanismo de ação das polimixinas B e E (colistina) é idêntico. Elas interagem com as moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa das bactérias Gram-negativas, levando ao aumento da permeabilidade da membrana que resulta no extravasamento do conteúdo celular (VAARA, 2013).

A tigeciclina é o primeiro membro da classe das glicilciclinas, grupo derivado das tetraciclinas com modificações estruturais que aumentam o espectro de ação para Gram-positivos, Gram-negativos e anaeróbicos. Atua sobre a síntese de proteínas bacterianas, ao bloquear a entrada de moléculas de amino-acil do RNA transportador no sítio A do ribossomo, após se ligar à subunidade 30S (STEIN, 2013) e foi desenvolvida para restaurar o espectro de atividade e a utilidade clínica das tetraciclinas (DOAN et. al., 2006). É prescrita, principalmente, no tratamento de infecções de pele e tecidos moles (VAN DUIN et. al., 2013).

2.4 Resistência a antimicrobianos em *Enterobacter* spp.

As bactérias podem ser intrinsicamente resistentes a certos antimicrobianos, mas também podem adquirir resistência por mutações no gene cromossomal e/ou transferência horizontal de genes. A resistência intrínseca se deve a capacidade de uma espécie bacteriana em resistir à ação do antimicrobiano, como um resultado de características estruturais ou

funcionais inerentes. Além da resistência intrínseca, as bactérias podem adquirir ou desenvolver resistência por vários mecanismos, incluídos em três principais grupos: i) os que previnem o acesso ao alvo por redução da permeabilidade através da alteração das proteínas de membrana externa e aumento da atividade de bombas de efluxo bacterianas); ii) os que modificam o alvo, por mutação genética e proteção alostérica; iii) modificação direta dos antimicrobianos (inativação do antimicrobiano por hidrólise enzimática) (BLAIR et al., 2014).

As espécies de *Enterobacter* spp são intrinsicamente resistentes a ampicilina, amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, cefalosporinas de primeira e segunda geração (cefalotina e cefuroxima) e cefamicina (cefoxitina) devido à produção constitutiva de enzimas cromossomais (ROSSI; ANDREAZZI, 2005; MEZZATESTA et al., 2012).

Nos últimos anos, notou-se um aumento na resistência às cefalosporinas de terceira e quarta geração, carbapenêmicos e quinolonas em *Enterobacter* spp; como resultado da aquisição de genes que codificam diferentes mecanismos (PFEIFER et al, 2010; HARRIS; FERGUSON, 2012; KHAJURIA et al., 2014; CURCIO 2014; SÚAREZ;) descritos a seguir.

2.4.1 Resistência aos beta-lactâmicos

Entre os bacilos Gram negativos, a disseminação de diferentes espécies resistentes aos beta-lactâmicos tornou-se um sério problema mundial. Ao longo dos anos, estes microrganismos adquiriram estratégias para desenvolvimento de resistência, tais como: a) produção de ESBL (*Extended-spectrum β -lactamases*), b) hiperexpressão de genes beta-lactamases (*bla*) cromossomais devido a modificações em genes regulatórios, bem como mutação e/ou integração de sequências de inserção nos genes promotores; c) mobilização de genes *bla* por incorporação de integrons em plasmídeos e/ou transferência horizontal entre diferentes espécies bacterianas, d) disseminação de serino e metalo-beta-lactamases (PFEIFER et al., 2010).

O mecanismo com maior impacto na epidemiologia da resistência bacteriana e que apresenta a maior eficiência contra os beta-lactâmicos é a produção de beta-lactamases. Essas enzimas se associam de forma não covalente ao anel beta-lactâmico, que é atacado pelo radical hidroxila livre presente no resíduo serina do sítio ativo da beta-lactamase, formando uma ligação covalente acil-éster. A inativação do antimicrobiano ocorre no momento da hidrólise deste éster, entretanto sem a perda da atividade hidrolítica pela enzima (LIVERMORE, 1995; BUSH, 2010).

Diferentes tipos de beta-lactamases já foram descritas e inúmeras tentativas de estabelecer um sistema de classificação para estas enzimas foram propostas ao longo dos anos. Duas classificações têm sido consideradas como de maior importância: as classificações de Ambler e a de Bush, Jacoby e Medeiros (AMBLER, 1980; BUSH et al., 1995). A classificação de Ambler foi proposta com base na estrutura molecular das beta-lactamases, de acordo com a sequência de aminoácidos que as codifica, e reconhece quatro classes: Classe A (Penicilinasas e ESBL); Classe B (Metallo- β -lactamases); Classe C (Cefalosporinas cromossomais) e Classe D (Oxacilinasas). A classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros baseia-se na similaridade entre os perfis de substratos e inibidores das beta-lactamases, e é dividida em diferentes subgrupos representados por números cardinais e vogais (BUSH et al., 1995; BUSH; JACOBY, 2010; BUSH; FISHER, 2011).

2.4.1.1 Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL)

Entre as beta-lactamases, um dos grupos mais importantes é o grupo das beta-lactamases de espectro estendido (ESBL - *Extended-spectrum beta-lactamase*). Estas enzimas apresentam a capacidade de hidrolisar a maioria dos β -lactâmicos, incluindo-se as cefalosporinas de terceira e quarta gerações e monobactâmicos, com exceção das cefamicinas, carbapenêmicos e inibidores das β -lactamases (BUSH, 2010). As ESBLs pertencem à classe A de Ambler e estão distribuídas no grupo 2 de Bush (AMBLER, et al., 1991; BUSH et al., 1995; BUSH, 2001). São enzimas muito heterogêneas, com similaridade variando de 20% a 90% entre suas sequências de aminoácidos (BONNET, 2004). O surgimento destas enzimas veio em resposta à introdução das cefalosporinas de terceira geração no início dos anos 80 (KNOTHE et al., 1983), exemplificando a capacidade de adaptação apresentada por patógenos causadores de infecções hospitalares (PATERSON; BONOMO, 2005).

Em bactérias do gênero *Enterobacter* spp, e principalmente em *Enterobacter cloacae* e *E. aerogenes*, a maioria das ESBL identificadas são do tipo TEM, SHV e CTX-M (MACHADO et al., 2007; BIENDO, et al., 2008). As variantes das ESBL do tipo TEM e SHV são derivadas das enzimas de espectro restrito TEM-1 e TEM-2 (PATERSON; BONOMO 2005) e SHV-1, codificadas por genes *bla_{SHV-1}* e *bla_{TEM-1}*, geralmente localizados no cromossomo bacteriano (LIVERMORE 1995; GUPTA et al., 2007). Surgiram após mutações pontuais em *bla_{SHV-1}* e *bla_{TEM-1}*, que resultam na modificação de seu sítio ativo e expansão de sua atividade hidrolítica (JACOBY; BUSH, 2005). De forma geral, as cepas

produtoras de ESBL tipo SHV e TEM apresentam maior nível de resistência a ceftazidima do que à cefotaxima (BONNET, 2004). Atualmente, existem descritas 223 variantes de TEM-1 ou TEM-2, 191 variantes de SHV-1 e 170 variantes de CTX-M (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1> - Pesquisado em 21/06/15).

As ESBLs do tipo CTX-M não apresentam relação próxima com TEM e SHV, e sabe-se que se originaram da aquisição de um plasmídeo com um gene cromossomal pré-existente em *Kluyvera* spp. O potencial de hidrólise sobre as cefalosporinas de amplo espectro, principalmente cefotaxima, constitui uma característica intrínseca destas enzimas, não sendo resultantes de mutações em enzimas precursoras (BONNET, 2004; BABIC et al., 2006).

As enzimas CTX-M são agrupadas de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos em cinco grupos distintos, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25. O grupo CTX-M-1, inclui as enzimas CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15 (UOE-1), -22, -23, -28, -29, -30, -32, -33, -34, -36, -37, -42, -52, -53, -54, -55, -57 e FEC-1. O grupo CTX-M-2 inclui as enzimas CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, -31, -35, -43, -44 (Toho-1). No grupo CTX-M-8 encontra-se as enzimas CTX-M-8, CTX-M-40 e CTX-M-63. O grupo CTX-M-9 compreende as enzimas CTX-M-9, -13, -14, 16, -17, -19, -21, -24, -27, -38, -45 (Toho-2), -46, -47, -48, -49, -50 e -51. Do grupo CTX-M-25 fazem parte CTX-M-25, -26, -39 e -41 (CATON; COQUE, 2006; GARCIA et al., 2008; HOPKINS et al., 2008; DOUBLET et al., 2009; ZHAO; HU, 2013). No Brasil os grupos CTX-M-1 e suas variantes CTX-M-14 e -15 e CTX-M-2 são as mais relatadas (CERGOLE-NOVELLA et al., 2010; TOLLENTINO et al., 2011, SEKI et al., 2013).

Outros grupos de ESBLs como PER, VEB, BES, BEL, TLA, GES e SFO são detectadas em menor frequência daquela observada para derivadas de TEM, SHV e CTX-M (POIREL et al., 1999; BONNET et al., 2000; BAHAR et al., 2004; POIREL et al., 2008). Uma das suposições para a menor frequência é a localização em plasmídeos não conjugativos (NAAS et al., 2008b).

Entretanto, VEB-3 foi detectada em *Enterobacter cloacae* (JIANG et al., 2005) e PER-2 em *Enterobacter cloacae* em dois hospitais de Curitiba-PR (FEHLBERG et al., 2014). Com relação às enzimas GES, estas destacam-se por apresentarem uma plasticidade fenotípica incomum, pois além de apresentarem características de ESBLs, algumas variantes hidrolisam as cefamicina e os carbapenêmicos (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2007).

2.4.1.2 Carbapenemases

As carbapenemases estão inseridas nas classes moleculares A, B e D de Ambler e nos grupos funcionais 2f e 3 de Bush, Jacoby e Medeiros. São consideradas as β -lactamases mais versáteis, por apresentarem um amplo espectro de atividade hidrolítica, conferindo resistência a quase todos antimicrobianos beta-lactâmicos e aos inibidores de beta-lactamases (QUEENAM; BUSH, 2007).

Carbapenemases da classe A

As carbapenemases da classe A também denominadas serino- carbapenemases possuem a habilidade de hidrolisar uma ampla variedade de beta-lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, aztreonam e carbapenêmicos e todas são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam (QUEENAM; BUSH, 2007). Neste grupo se incluem as enzimas NMC-A (*not metalloenzyme carbapenemase*), IMI (*imipenemase*), SME (*Serratia marcescens enzyme*), GES (*Guiana extended-spectrum*) e KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*). As três primeiras são enzimas codificadas por genes cromossomais. Diferem dos outros grupos de carbapenemases pelo seu perfil hidrolítico e por serem induzíveis, gerando redução da sensibilidade ou resistência aos carbapenêmicos e sensibilidade as cefalosporinas de espectro estendido (NORDMANN; POIREL, 2002; POIREL, et al., 2007; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2007).

A ocorrência das três primeiras em *Enterobacteriaceae* é pouco relatada, porém, entre elas, as enzimas GES são as mais importantes, sendo que apenas seis variantes possuem atividade carbapenemase (*bla*_{GES-2}, *bla*_{GES-4}, *bla*_{GES-5}, *bla*_{GES-6}, *bla*_{GES-11} e *bla*_{GES-18}) (QUEENAM; BUSH, 2007; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2007; BEBRONE et al., 2013). Estas enzimas ocorrem principalmente em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (PICÃO et al., 2009; BONNIN et al., 2011; POLLOTTO et al., 2012; BEBRONE et al., 2013), mas já foram detectadas em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (VOURLI et al., 2004). No Brasil, o gene *bla*_{GES-5} foi detectado *Klebsiella pneumoniae* subespécie *ozaenae* isolada em um hospital em São Paulo (PICÃO et al., 2010). Até o momento, carbapenemases do tipo GES não foram descritas em espécies do gênero *Enterobacter* spp.

Já as carbapenemases do tipo KPC encontram-se globalmente disseminadas, (NORDMANN, 2014), e são consideradas um importante desafio por estarem associadas a altas taxas de mortalidade e a um elevado número de surtos de infecção em hospitais de todo o mundo (MUNOZ-PRICE et al., 2013). Estas enzimas são capazes de hidrolizar os

carbapenêmicos, oximino-cefalosporinas, cefamicinas e não são inibidas por inibidores das β -lactamases tais como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (QUEENAN, BUSH, 2007; PAPP-WALLACE et al., 2010). Atualmente existem vinte e três variantes descritas (KPC-2 a KPC-23), sendo KPC-2 e KPC-3 as mais prevalentes (NORDMANN et al., 2009; CHEN et al., 2012; <http://www.lahey.org/studies/> acesso em 16/05/2015).

Os genes *bla*_{KPC}, apresentam grande mobilidade, devido a sua localização em plasmídeos. Esta característica explica sua disseminação global (GIAKOUPI et al., 2009; LAMOUREAUX et al., 2012; DIAHMI et al., 2014; KUAI et al., 2014; QIN et al., 2014). No Brasil, bactérias produtoras de KPC encontram-se amplamente disseminadas, principalmente *Klebsiella pneumoniae* (ALMEIDA et al., 2012; FEHLBERT et al., 2012; CHANG et al., 2013). Entretanto, o gene já foi detectado em *E. cloacae* (ZAVASCKI et al., 2009) e *Enterobacter aerogenes* (TUON et al., 2015).

Carbapenemases da classe B

As metalo- β -lactamases (MBLs) são carbapenemases que requerem íons Zn^{2+} ou outros cátions divalentes como cofatores para clivagem do anel β -lactâmico e consequentemente inativação dos antimicrobianos carbapenêmicos, todos os beta-lactâmicos com exceção do monobactâmico (aztreonam). Os genes que codificam MBLs estão inseridos em estruturas genéticas móveis, e têm sido descritos em patógenos clinicamente importantes, tais como *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp e membros da família *Enterobacteriaceae* (POIREL et al., 2007; EL-AGGERY; AL-HAZMI, 2014).

Atualmente são conhecidas as seguintes subclasses de MBLs: IMP (*imipenemase*), VIM (*Verona imipenemase*), SPM (*São Paulo metallo- β -lactamase*), GIM (*German imipenemase*), SIM (*Seul imipenemase*), AIM (*Australian imipenemase*), KHM (*Kyorin Health Science*), NDM (*New Delhi metallo- β -lactamase*), DIM (*Dutch Imipenemase*) e TMB (*Tripoli metallo- β -lactamase*) (OSANO et al., 1994; LAURETTI et al., 1999; TOLEMAN et al., 2002; CASTANHEIRA et al., 2004; LEE et al., 2005; SEKIGUCHI et al., 2008; SALABI et al., 2010; POIREL et al., 2009; YONG et al., 2009).

Em *Enterobacteriaceae*, as principais subclasses de MBLs são IMP, VIM, GIM e NDM. Com relação à produção de MBLs por *Enterobacter* spp., as enzimas IMP-1, VIM-1, VIM-3, GIM-1 já foram descritas em *Enterobacter cloacae* (CASTANHEIRA et al., 2007; CHEN et al., 2009; BOGAERTS et al., 2012; HAMPRECHT et al., 2013; WANG et al., 2014). No Brasil, NDM-1 foi descrita em *Enterobacter hormaechei* subsp *oharae* e

Enterobacter cloacae (complexo) (ROZALES et al., 2014; CARVALHO-ASSEF et al., 2014).

Carbapenemases da classe D

Algumas enzimas da classe D de Ambler também são capazes de hidrolizar os carbapenêmicos. As CHDLs (*carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases*), além de hidrolizarem as penicilinas, imipenem e o meropenem, embora fracamente, não hidrolisam significativamente as cefalosporinas de amplo espectro e o aztreonam. Os subgrupos de CHDLs se diferem pela sequência de aminoácidos que os codifica, sendo os mais encontrados mundialmente OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-50, OXA-51, OXA-58, OXA-60 e OXA-62 (POIREL et al., 2010).

As CHDLs são reportadas quase que exclusivamente em isolados de *A. baumannii*, exceto pela enzima OXA-48, que ocorre exclusivamente em *Enterobacteriaceae*. Esta enzima possui maior atividade hidrolítica contra imipenem (CARRÈR, et al., 2010). No Brasil, até o momento, somente uma variante de OXA-48 a OXA-370 foi relatada em *Enterobacter hormaechei* (SAMPAIO et al., 2014).

2.4.2 Resistência às Quinolonas

A resistência às quinolonas é causada por: i) alterações nas enzimas DNA-girase e Topoisomerase IV, devido a mutações em genes localizados em uma região bem definida do cromossomo, chamada região determinante de resistência à quinolonas (QRDR – *Quinolone-resistance determinig region*); sendo este considerado o principal mecanismo (JACOBY 2005; REDGRAVE et al., 2014) e ii) aquisição de genes plasmidiais (BOLON, 2011) que serão discutidas a seguir.

2.4.2.1 Resistência às quinolonas codificada por genes localizados em plasmídeos

São conhecidos até o momento três mecanismos de resistência as quinolonas mediada por plasmídeos: proteção do sítio alvo por enzimas Qnr, alteração do antimicrobiano pela enzima aminoglicosídeo acetiltransferase – cr e sistemas de efluxo (OqxAB e QepA) (RUIZ et al., 2012; POIREL et al., 2012). Os genes que codificam Estes mecanismos, denominados

PMQR (*Plasmid Mediated Quinolone Resistance*), são codificados por genes que apresentam grande capacidade de disseminação por transferência horizontal (STRAHILEVITZ et al., 2009; RUIZ et al., 2012).

2.4.2.1a Enzimas Qnr

As enzimas Qnr (*Quinolone resistance*) são formadas por pentapeptídeos repetidas e codificadas por genes *qnr*, estas agem protegendo a região alvo das quinolonas na DNA-girase, impedindo a ação do antimicrobiano (STRAHILEVITZ et al., 2009).

Estão subdivididas em grupos de acordo com a similaridade dos aminoácidos QnrA (QnrA1 – QnrA7); QnrB (QnrB1 – QnrB80); QnrC; QnrD (QnrD1 – QnrD2) e QnrS (QnrS1 – QnrS9) (WANG et al., 2009b; CAVACO et al., 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; <http://lahey.org/qnrStudies> - pesquisado em 18/04/2015). O gene *qnrA* foi o primeiro relatado em enzimas Qnr, descoberto em 1998 em uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente. Posteriormente este gene foi chamado de *qnrA1* devido às descobertas de novas variantes genéticas (POIREL et al., 2012).

Em 2006, Jacoby e colaboradores descreveram o gene *qnrB1*, em uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* proveniente da Índia. Este gene codifica uma enzima com similaridade em torno de 44% com QnrS (WANG et al., 2009a), e apresenta o maior número de variantes entre as Qnr, totalizando 80 até o momento (<http://www.lahey.org/qnrStudies>- acesso 18/04/2015).

O gene *qnrS* foi descrito pela primeira vez em um plasmídeo de *Shigella flexneri* 2b, e a enzima QnrS apresentou 59% de similaridade com a enzima QnrA1 (HATA et al., 2005).

2.4.2.1b Aminoglicosídeo Acetiltransferase – cr / Aac(6')Ib-cr

A enzima Aac(6')-Ib-cr (aminoglicosídeo acetiltransferase resistente a ciprofloxacina), descoberta em 2006 por Robicsek e colaboradores (ROBICSEK et al., 2006a), é uma variante da aminoglicosídeo acetiltransferase Aac(6')-Ib, que promove resistência aos aminoglicosídeos amicacina, tobramicina e canamicina. Esta variante apresenta duas substituições de aminoácidos nas posições 102 (Triptofano por Arginina) e 179 (Aspartato por Tirosina), e esta alteração amplia seu espectro de ação, tornando-a capaz de promover a acetilação dos sítios ativos da ciprofloxacina e norfloxacina (PARK et al., 2006; RUIZ et al., 2012 ; POIREL et al., 2012).

2.4.2.2c Sistemas de Efluxo

As bactérias são submetidas a diversas substâncias nocivas nos ambientes em que estão expostas. Para sobreviverem desenvolveram um mecanismo baseado na sucção e expulsão destes compostos adversos, chamado sistema de efluxo. Em bactérias Gram negativas, o mecanismo de expulsão é realizado por proteínas localizadas nas membranas interna e externa, e no espaço periplasmático (PAGÉS et al., 2011).

Os genes codificadores de sistemas de efluxo podem ser intrínsecos (cromossômico) ou adquiridos (plasmidial). Existem diversos sistemas de efluxo conhecidos, entre eles duas grandes famílias: *resistance-nodulation-division* (RND) e a *major facilitator superfamily* (MFS), às quais pertencem os dois principais sistemas de efluxo de quinolonas: QepA e OqxAB, respectivamente. São sistemas de efluxo mediados por plasmídeos, responsáveis pela expulsão das quinolonas da célula bacteriana mantendo-as viáveis (KIM et al., 2009; LI; NIKAIDO, 2009).

OqxAB é um sistema de efluxo composto por dois genes *oqxA* e *oqxB*, que fazem parte de um mesmo operon e conferem multirresistência à bactéria, incluindo fluoroquinolonas, ácido nalidíxico e cloranfenicol (KIM et al., 2009).

O sistema de efluxo QepA (*quinolone efflux pump*) foi descrito pela primeira vez em um isolado de *Escherichia coli* no Japão. É caracterizado pela redução da sensibilidade as quinolonas hidrofílicas como ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacin, e baixa afinidade com quinolonas hidrofóbicas (levofloxacina, moxifloxacina e ácido nalidíxico) (PÉRICHON et al., 2007; YAMANE et al., 2007; POIREL et al., 2012). Os plasmídeos mediadores de resistência a quinolonas (PMQR) têm sido observados com maior prevalência entre espécies da família Enterobacteriaceae, principalmente nas espécies de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp. (SCHUTSZ; GEERLINGS, 2012; BRIALES et al., 2012).

Nos últimos anos os genes plasmidiais de resistência as quinolonas tem sido associados às cepas produtoras de ESBL e carbapenemases. As beta-lactamases CTX-M são o principal grupo de enzimas relacionadas aos PMQRs, em especial a CTX-M-15, disseminada mundialmente (CATTOIR et al., 2008; BRIALES et al., 2012; LONGHI et al., 2012; ZHANG et al., 2013).

2.5 Tipagem Molecular

A tipagem molecular tem como função determinar a similaridade genética entre microrganismos patogênicos, e permite o entendimento da relação clonal entre cepas associadas a infecções. Esta abordagem permite identificar surtos e avaliar as possíveis fontes e formas de transmissão (OLIVE, BEAN, 1999). Diversos métodos para tipagem molecular de patógenos bacterianos têm sido utilizados. Entre eles, as técnicas de PFGE, RAPD, ERIC-PCR, REP-PCR e MLST têm sido descritas como eficientes para a tipagem molecular de Enterobacteriaceae e outros (SINGH et al., 2006; TOLLENTINO et al., 2011; POLOTTO et al., 2012, PÉREZ-LOSADA et al., 2013).

A técnica de PFGE (“*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*”), baseada na análise do perfil de restrição do DNA cromossômico através de eletroforese em gel (TENOVER et al., 1995), é considerada como padrão ouro para a tipagem (PFALLER et al., 2001). Porém, alguns isolados bacterianos não podem ser tipados pelo PFGE devido à degradação do DNA (SILBERT et al., 2003).

Como alternativa, os métodos baseados em PCR (“*Polymerase Chain Reaction*”) são utilizados (SINGH et al., 2006; TOLLENTINO et al., 2011). Entre eles, destaca-se a técnica denominada ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), que foi escolhida para utilização no presente estudo.

A técnica de ERIC-PCR consiste na análise do padrão de amplificação por PCR de elementos repetidos encontrados no genoma bacteriano. Estes elementos, presentes em uma grande diversidade de genomas bacterianos, estão localizados em regiões extragênicas e contém repetições invertidas altamente conservadas, que podem ser utilizados como pontos de ligação para *primers* em reações de PCR, gerando padrões específicos para diferentes isolados (VERSALOVIC et al., 1991). Esta metodologia apresenta boa capacidade discriminatória, reprodutibilidade, fácil interpretação, rapidez, baixo custo e não enfrenta problemas com a degradação do DNA (SILBERT et al., 2004).

Nos últimos anos diversos estudos envolvendo *Enterobacter* spp resistentes a antimicrobianos usaram com sucesso a técnica de ERIC-PCR para a tipagem molecular (STUMP et al., 2005; GLATZ et al., 2011).

Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, detectar genes de resistência aos beta-lactâmicos e quinolonas. Determinar a similaridade genética entre os isolados de *Enterobacter* spp do Hospital de Base da Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de suscetibilidade aos carbapenêmicos, cefalosporinas de terceira e quarta geração e quinolonas no isolados de *Enterobacter* spp;
- Investigar a presença dos genes *bla*_{TEM-like}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{VEB-like}, *bla*_{PER-like}, *bla*_{GES-like} e *bla*_{CTX-M-like} que codificam ESBL;
- Diferenciar os grupos 1, 2, 8, 9, e 25 de CTX-M nos isolados de *Enterobacter* spp;
- Investigar a presença dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{GES} e *bla*_{OXA-48} que codificam carbapenemases;
- Investigar a presença dos genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA* que conferem resistência as quinolonas;
- Avaliar a similaridade genética dos *Enterobacter* spp por ERIC-PCR.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de *Enterobacter* spp

Neste estudo, foram incluídas 60 *Enterobacter* spp isoladas de amostras biológicas não duplicadas entre janeiro de 2013 a maio de 2014, provenientes do setor de microbiologia do LC-HB de São José do Rio Preto. Os isolados foram selecionados por apresentarem resistência a cefalosporinas, carbapênemicos e quinolonas.

Os isolados foram obtidos de pacientes internados em diferentes unidades de internação como Unidades de terapia intensiva (UTI Geral SUS e Convênio, UTI Emergência, UTI Cardiológica Adulto, UTI Pós Operatória e Unidade Semi-Intensiva), Alas de Cuidados paliativos, Transplante, Clínicas e Enfermarias. As amostras biológicas foram oriundas de diversos locais incluindo urina, aspirado traqueal, cateteres, fragmentos de tecidos para biópsia, secreções de abscessos pós-cirúrgicos, sangue, líquido pleural e sinovial.

4.2 Identificação e determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

A identificação e o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) dos isolados foram realizados no equipamento Vitek®2 Compact System (Biomérieux, France) utilizando a técnica de microdiluição em caldo automatizada durante a rotina do setor de microbiologia do LC-HB. O inóculo dos isolados foi preparado pelo método de suspensão direta de colônias, e, para isso, 3 mL de solução salina a 0,85% foi distribuído em dois tubos de ensaio, (um tubo utilizado para o teste de identificação e o outro para o TSA). No tubo utilizado para a identificação foram inoculadas aproximadamente cinco colônias isoladas de culturas puras crescidas em ágar MacConkey (Biomérieux®, França), e após isso, a turbidez ideal (0,5 na escala de MacFarland - $1,5 \times 10^8$ UFC/ml) foi ajustada com auxílio do densitômetro Densichek™ (Biomérieux®, França). Em seguida, 120 uL dessa suspensão foram adicionados ao tubo utilizado para o TSA. O cartão de identificação de bacilos Gram-negativos (Biomérieux®, França) foi adicionado ao primeiro tubo e o cartão de antibiograma (AST-N238 e/ou AST-N239) ao segundo tubo. Em seguida, os tubos foram inseridos no equipamento, e, após aproximadamente 7 horas de incubação, o resultado da identificação e do antibiograma foram liberados. Os antimicrobianos testados e selecionados para o complexo *Enterobacter cloacae* e *E. aerogenes* foram: piperacilina/tazobactam, colistina,

ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, ertapenem, imipenem, meropenem, amicacina, gentamicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina e norfloxacina.

A interpretação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi conduzida de acordo com as recomendações estabelecidas no documento M100-S23 (CLSI, 2013) e norma técnica da Anvisa como mostrado no quadro 2. Os testes de identificação e de suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados pela equipe do setor de Microbiologia do LC-HB.

Quadro 2: Padrões de Interpretação de valores de CIM para *Enterobacteriaceae* segundo CLSI, 2013/ Norma técnica nº.01/2013 Anvisa*.

Agente Antimicrobiano	Critério Interpretativo CIM (µg/mL)		
	S	I	R
β-lactâmicos/Inibidores de β-Lactamases			
Piperacilina/Tazobactam (TZP)	≤ 16/4	32/4-64/4	≥ 128/4
Polimixina			
Colistina (COL)*	≤ 2	-	≥ 4
Cefalosporinas			
Ceftazidima (CAZ)*	≤ 1	2-4	≥ 8
Ceftriaxona (CRO)	≤ 1	2	≥ 4
Cefepima (FEP)*	≤ 1	2-4	≥ 8
Carbapenêmicos			
Ertapenem (ERT)	≤ 0.5	1	≥ 2
Imipenem (IMP)	≤ 1	2	≥ 4
Meropenem (MER)	≤ 1	2	≥ 4
Aminoglicosídeos			
Amicacina (AK)	≤ 16	32	≥ 64
Gentamicina (CN)	≤ 4	8	≥ 16
Quinolona e Fluoroquinolonas			
Ácido Nalidíxico (NAL)	≤ 16	-	≥ 32
Ciprofloxacina (CIP)	≤ 1	2	≥ 4
Norfloxacina (NOR)	≤ 4	8	≥ 16

Legenda: CIM= Concentração Inibitória Mínima; S= Sensível; I= Intermediário; R= Resistente.

4.3 Armazenamento e manutenção dos isolados

Após a realização da identificação e dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, os isolados clínicos resistentes aos carbapenêmicos, cefalosporinas e quinolonas foram encaminhados ao Laboratório CIM (Centro de Investigação de Microrganismos) da Faculdade

de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), onde foram repicados em ágar MacConkey (Oxoid®) e mantidos em coleção de cultura em freezer a -80° C. Para isso, uma colônia isolada obtida da placa foi inoculada em caldo TSB (“Tryptic Soy Broth”, BACTO™, França) a 37 °C por 16 a 18 horas. Após este tempo, 0,7 mL de cada cultura foi transferido para criotubos estéreis previamente rotulados, onde foram adicionados 0,3 mL de glicerol 50% estéril. Para cada isolado, o armazenamento foi realizado em triplicata e cada criotubo identificado com um número da coleção de cultura e data de armazenamento. Paralelamente, os dados relativos a cada isolado clínico foram armazenados em uma planilha, contendo informações como número de identificação na coleção de cultura, sempre precedido pelo número do prontuário do paciente, data, espécime de isolamento, unidade de internação e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

4.4 Extração de DNA genômico bacteriano

As cepas armazenadas a -80 °C foram reativadas através de cultivo em caldo TSB por 16 a 24 horas a 37 °C em agitação. Em seguida, uma alíquota de 1,5 mL da suspensão bacteriana foi transferida para um tubo de tampa suspensa de polipropileno, identificada e centrifugada a 7500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. A massa celular obtida (pellet) foi utilizada para a extração do DNA genômico bacteriano através do kit comercial QIAamp DNA (Qiagen®) de acordo com as recomendações do fabricante.

O DNA extraído foi quantificado em ng/μL por espectrofotometria (Nanodrop® Spectrophotometer ND 1000/Thermo Scientific) e armazenado em freezer -20 °C para posterior utilização.

4.5 Investigação de genes resistência por Reação em Cadeia da Polimerase

4.5.1 Genes de carbapenemases das classes A, B e D (Multiplex-PCR).

Para a investigação de carbapenemases do tipo KPC, IMP, VIM, GES, NDM e OXA-48-like foram utilizadas uma Duplex e uma Triplex-PCR como protocolo adaptado de uma Multiplex-PCR de Doyle e colaboradores (2012) (quadros 4 e 5) e *primers* descritos no quadro 3. Foi utilizada a mesma ciclagem para as diferentes PCRs, o DNA foi desnaturado inicialmente a 95 °C por 5 minutos, e em seguida, o material foi submetido a 35 ciclos de

de desnaturação por 45 segundos a 95 °C, anelamento por 45 segundos a 60 °C, e extensão por 1 minuto a 72 °C. Em seguida, submetido a uma extensão final por 8 minutos a 72 °C.

Quadro 3: *Primers* utilizados para investigação de genes carbapenemases das classes A, B e D.

Alvo de Amplificação	Primers	Sequências 5´ a 3´	Tamanho Amplicon (pb)	Referência
Carbapenemases das classes A, B e D				
gene <i>bla</i> _{KPC}	KPC-F	TGTCACTGTATCGCCGTC	900	Doyle et al., 2012
	KPC-R	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC		
gene <i>bla</i> _{IMP}	IMP-F	GAAGGCGTTTATGTTTCATAC	587	
	IMP-R	GTACGTTTCAAGAGTGATGC		
gene <i>bla</i> _{VIM}	VIM-F	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	389	
	VIM-R	AATGCGCAGCACCAGGATAG		
gene <i>bla</i> _{NDM}	NDM-F	GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC	782	
	NDM-R	GGTCGCGAAGCTGAGCACCGCAT		
gene <i>bla</i> _{OXA-48like}	OXA-48-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438	
	OXA-48-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG		
gene <i>bla</i> _{GES} (GES-1 a 9 e GES-11)	GES-F	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	399	
	GES-R	TTTGTCCGTGCTCAGGAT		

Foi utilizada uma reação isenta de DNA como controle negativo e como controles positivos cepas carreadoras dos genes pesquisados gentilmente cedidas pela professora Dra. Ana Cristina Gales (Laboratório ALERTA-UNIFESP). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose (Life Technologies) 1,5%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL-100 mL). A eletroforese foi realizada a 100 volts, por 120 minutos. O marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA) foi aplicado no gel para auxiliar na determinação do tamanho dos fragmentos obtidos. O resultado foi visualizado e fotografado pelo fotodocumentador LPix Ex (Loccus Biothechnology).

Quadro 4: Protocolo Duplex para detecção das carbapenemases do tipo KPC e NDM.

Componentes	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µL
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	1,5 µL
<i>Primer</i> KPC-F (10 µM)	1,0 µL
<i>Primer</i> KPC-R (10 µM)	1,0 µL
<i>Primer</i> NDM-F (10 µM)	1,0 µL
<i>Primer</i> NDM-R (10 µM)	1,0 µL
Taq-DNA polimerase (5 U/µl)	0,2 µL
Água Ultrapura	q.s.p 25 µL
DNA (100 ng/µL)	2,0 µL

Quadro 5: Protocolo Triplex PCR para detecção carbapenemases do tipo IMP, VIM e OXA-48.

Componentes	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µL
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	1,5 µL
<i>Primer</i> IMP-F (10 µM)	1,0 µL
<i>Primer</i> IMP-R (10 µM)	1,0 µL
<i>Primer</i> VIM-F (10 µM)	0,75 µL
<i>Primer</i> VIM-R (10 µM)	0,75 µL
<i>Primer</i> OXA-48-F (10 µM)	1,0 µL
<i>Primer</i> OXA-48-R (10 µM)	1,0 µL
Taq-DNA polimerase (5U/µL)	0,2 µL
Água Ultrapura	q.s.p 25 µL
DNA (100 ng/µL)	2,0 µL

4.5.2 Genes de beta-lactamases do tipo ESBL

Para a investigação dos genes *bla*_{TEM-like} e *bla*_{SHV-like} foi utilizada uma multiplex PCR como protocolo adaptado de Dallenne e colaboradores (2010) (quadro 7) e *primers* descritos no quadro 6. Foi utilizada a mesma ciclagem para os diferentes genes, o DNA foi desnaturado inicialmente a 94 °C por 10 minutos, e em seguida, o material foi submetido a 30 ciclos de desnaturação por 40 segundos a 94 °C, anelamento por 40 segundos a 60 °C, extensão por 1 minuto a 72 °C, e extensão final 7 minutos a 72 °C.

Quadro 6: *Primers* utilizados nas reações de PCR para investigação de genes de resistência às cefalosporinas de 3^a e 4^a geração.

Alvo de Amplificação	Primers	Sequências 5' a 3'	Tamanho Amplicon (pb)	Referência
βeta-Lactamases				
gene <i>bla</i> CTX-M	CTX-M-F	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	544	Edelstein et al., 2003
	CTX-M-R	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA		
TEM-1e2 variantes	TSO-T-F	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	800	
	TSO-T-R	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
SHV-1 e variantes	TSO-S-F	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	731	
	TSO-S-R	ATCCCGCAGATAAATCACAC		
Grupo 1 (CTX-M-1, 3, 15 e variantes)	CTXMG1-F	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	688	
	CTXMG1-2-R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
Grupo 2 (CTX-M-2 e variantes)	CTXMG2-F	CGTTAACGGCACGATGAC	404	
	CTXMG1-2-R	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
Grupo 9 (CTX-M-9, 14 e variantes)	CTXMG9-F	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561	Dallenne et al, 2010
	CTXMG9-R	TGATTCTCGCCGCTGAAG		
Grupo 8/25 (CTX-M-8,25,26,39 e 41)	CTX-MG8/25-F	AACRCRCAGACGCTCTAC	326	
	CTX-MG8/25-R	TCGAGCCGGAASGTGTAT		
gene <i>bla</i> GES (GES-1 a 9 e GES-11)	GES-F	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	399	
	GES-R	TTTGTCCGTGCTCAGGAT		
gene <i>bla</i> PER (PER-1 a 3)	PER-F	GCTCCGATAATGAAAGCGT	520	
	PER-R	TTCGGCTTGACTCGGCTGA		
gene <i>bla</i> VEB (VEB-1 a 6)	VEB-F	CATTTCCCGATGCAAAGCGT	648	
	VEB-R	CGAAGTTTCTTTGGACTCTG		

Quadro 7: Protocolo Multiplex-PCR detecção dos genes *bla*_{TEM-like} e *bla*_{SHV-like}.

Componentes	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µL
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	1,5 µL
<i>Primer</i> TSO-TF (10 µM)	0,4 µL
<i>Primer</i> TSO-TR (10 µM)	0,4 µL
<i>Primer</i> TSO-SF (10 µM)	0,4 µL
<i>Primer</i> TSO-SR (10 µM)	0,4 µL
Taq-DNA polimerase (5U/µL)	0,2 µL
Água Ultrapura	q.s.p 25 µL
DNA (100 ng/µL)	2,0 µL

Foi utilizada uma reação isenta de DNA como controle negativo e como controles positivos cepas carreadoras dos genes pesquisados e sequenciados (acesso *gen Bank*: GQ380692, GU064386), gentilmente cedidas pela Dra. Fernanda M. Tolentino. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL-100 mL). A eletroforese foi realizada a 100 volts, por 60 minutos. O marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. O resultado foi visualizado e fotografado pelo fotodocumentador LPix Ex (*Loccus Biothechnology*).

Para a investigação dos genes *bla*_{GES}, *bla*_{PER} e *bla*_{VEB} foi utilizada uma multiplex-PCR como protocolo adaptado de Dallenne e colaboradores (2010) (quadro 8) e *primers* descritos no quadro 6. Foi utilizada a mesma ciclagem para os diferentes genes, o DNA foi desnaturado inicialmente a 94 °C por 10 minutos, e em seguida, o material foi submetido a 30 ciclos de desnaturação por 40 segundos a 94 °C, anelamento por 40 segundos a 60 °C, extensão por 1 minuto a 72 °C, e extensão final por 7 minutos a 72 °C.

Foi utilizada uma reação isenta de DNA como controle negativo e como controles positivos cepas carreadoras dos genes pesquisados gentilmente cedidas pela professora Dra. Ana Cristina Gales (Laboratório ALERTA-UNIFESP). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose (Life Techonogies) 1,5%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL-100 mL). A eletroforese foi realizada a 100 volts, por 120 minutos. Para

visualização dos amplicons pesquisados foram utilizados os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

Quadro 8: Protocolo Multiplex-PCR detecção dos genes *bla_{GES}*, *bla_{PER}* e *bla_{VEB-like}*.

Componentes	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 µL
MgCl ₂ (25mM)	1,5 µL
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5mM)	1,5 µL
Primer GES-F (10µM)	0,3 µL
Primer GES-R (10µM)	0,3 µL
Primer PER-F (10µM)	0,3 µL
Primer PER-R (10µM)	0,3 µL
Primer VEB-F (10µM)	0,3 µL
Primer VEB-R (10µM)	0,3 µL
Taq-DNA polimerase (5U/µl)	0,2 µL
Água Ultrapura	q.s.p 25µL
DNA (100ng/µL)	2,0 µL

Para a investigação do gene *bla_{CTX-M}* foi realizada PCR Single utilizando protocolo e *primers* descrito por Edelstein e colaboradores (2003) conforme descrito nos quadros 6 e 9. A ciclagem utilizada foi de desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 51 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 3 minutos. Foi utilizada uma reação isenta de DNA como controle negativo e como controles positivos cepas carreadoras dos genes pesquisados. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL-100 mL). A eletroforese foi realizada a 100 volts, por 60 minutos.

A investigação dos grupos 1, 2 e 9 de CTX-M foi realizada por multiplex-PCR como protocolo adaptado de Dallenne e colaboradores (2010) (quadro10) e *primers* descritos no quadro 6. As amostras foram inseridas no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) com a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos, seguida por 30 ciclos com etapas de desnaturação a 94 °C por 40 segundos, anelamento a 60 °C por 40 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Foi utilizada uma reação isenta de DNA como controle negativo e como controles positivos cepas

carreadoras dos genes pesquisados e sequenciados (acesso *gen Bank*: FJ815281; FJ815285). O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% acrescida de 0,8 µL de brometo de etídio (10 mg/mL) em 100mL de agarose. A eletroforese foi programada por 55 minutos a 100 Volts, o marcador de peso molecular utilizado foi de 100 pb (*Thermo Scientific*). O resultado foi visualizado e fotografado pelo fotodocumentador LPix Ex (*Loccus Biothechnology*).

Quadro 9: Protocolo Single PCR para detecção do gene *bla*_{CTX-M-like}.

Componentes	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,0 µL
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5mM)	1,0 µL
<i>Primer</i> CTX-M-F (10 mM)	1,0 µL
<i>Primer</i> CTX-M-R (10 mM)	1,0 µL
Taq-DNA polimerase (5U/µL)	0,2 µL
Água Ultrapura	q.s.p 25 µL
DNA (100 ng/µL)	2,0 µL

Quadro 10: Protocolo Multiplex-PCR para investigação dos Grupos 1, 2 e 9 de CTX-M.

Componentes	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µL
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5mM)	1,5 µL
<i>Primer</i> CTX-MG1-F (10 µM)	1,0 µL
<i>Primer</i> CTX-MG1-2-R (10 µM)	0,5 µL
<i>Primer</i> CTX-MG2-F (10 µM)	0,5 µL
<i>Primer</i> CTX-MG1-2-R (10 µM)	0,5 µL
<i>Primer</i> CTX-MG9-F (10 µM)	1,0 µL
<i>Primer</i> CTX-MG9-R (10 µM)	1,0 µL
Taq-DNA polimerase (5U/µl)	0,2 µL
Água Ultrapura	q.s.p 25 µL
DNA (100 ng/µL)	2,0 µL

A pesquisa de genes de β -lactamase do tipo CTX-M-8/25 foi realizada por PCR Single segundo *primers* e protocolo de Dallenne e colaboradores (2010) (quadros 6 e 11, respectivamente). A ciclagem utilizada foi de desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de trinta ciclos de 94 °C por 40 segundos, 60 °C por 40 segundos, 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos. Foi utilizada uma reação isenta de DNA como controle negativo e como controles positivos cepa carreadora do gen pesquisado. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 μ L-100 mL). A eletroforese foi realizada a 100 volts, por 90 minutos.

Quadro 11: Protocolo Single PCR para investigação dos Grupos 8 e 25 de CTX-M.

Componentes	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 μ L
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	1,5 μ L
<i>Primer</i> CTX-MG8/25-F (10 mM)	1,0 μ L
<i>Primer</i> CTX-MG8/25-R (10 mM)	1,0 μ L
Taq-DNA polimerase (5U/ μ L)	0,2 μ L
Água Ultrapura	q.s.p 25 μ L
DNA (100 ng/ μ L)	2,0 μ L

4.5.3 Genes resistência a quinolonas

Para a investigação de genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* foi realizada Multiplex-PCR utilizando *primers* e protocolo descritos por Cattoir e colaboradores (2007) (quadros 12 e 13). A ciclagem utilizada foi de desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguida de trinta ciclos de 95 °C por 1 minuto, 54 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Foi utilizada uma reação isenta de DNA como controle negativo e como controles positivos cepas carreadoras dos genes pesquisados. As reações foram colocadas no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 μ L-100 mL). A eletroforese foi realizada a 100 volts, por 60 minutos.

Quadro 12: Primers utilizados nas reações PCR para investigação genes de resistência PMQR.

Alvo de Amplificação	Primers	Sequências 5' a 3'	Tamanho Amplicon (pb)	Referência
PMQR				
gene <i>qnrA</i>	QnrA-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580	Cattoir <i>et al</i> , 2007.
	QnrA-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
gene <i>qnrB</i>	QnrB-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	264	
	QnrB-R	TTTGCYGY YCGCCAGTCGAA		
gene <i>qnrS</i>	QnrS-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428	
	QnrS-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
Bomba efluxo				
gene <i>qepA</i>	QepA-F	CGGCGGCGTGTGCTGGAGTTCTT	552	Ma J <i>et al</i> , 2008.
	QepA-R	CCGACAGGCCACGACGAGGATGC		
Aminoglicosídeo acetiltransferase				
gene <i>aac (6')Ib</i>	aac(6')Ib-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	Park, C H <i>et al</i> , 2006
	aac(6')Ib-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		

Quadro 13: Protocolo Multiplex-PCR para detecção de *qnrA*, *qnrS* e *qnrB*.

Componentes	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,0 µL
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	2,0 µL
Primer QnrA-F (10 µM)	1,0 µL
Primer QnrA-R (10 µM)	1,0 µL
Primer QnrB-F (10 µM)	1,0 µL
Primer QnrB-R (10 µM)	1,0 µL
Primer QnrS-F (10 µM)	1,0 µL
Primer QnrS-R (10 µM)	1,0 µL
Taq-DNA polimerase (5U/µl)	0,2 µL
Água Ultrapura	q.s.p 25 µL
DNA (100 ng/µL)	2,0 µL

A investigação da presença do gene da bomba de efluxo do tipo QepA foi realizada por PCR Single segundo *primers* e protocolo adaptado de Ma J e colaboradores (2008) (quadros 12 e 14, respectivamente). O DNA foi desnaturado, inicialmente a 95°C por 5 minutos, em seguida, trinta e cinco ciclos de desnaturação por 45 segundos a 95°C, anelamento por 45 segundos a 68°C, extensão por 45s a 72°C e extensão final por 7 minutos a 72°C. Foi utilizada uma reação isenta de DNA como controle negativo e como controles positivos cepas carreadoras dos genes pesquisados. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL-100 mL). A eletroforese foi realizada a 100 volts, por 50 minutos.

Quadro 14: Protocolo Single PCR para detecção da bomba efluxo *qepA*.

Componentes	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 µL
MgCl ₂ (25mM)	0,5 µL
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5mM)	1,0 µL
<i>Primer</i> QepA-F (10 µM)	1,0 µL
<i>Primer</i> QepA-R (10 µM)	1,0 µL
Taq-DNA polimerase (5U/µL)	0,2 µL
Água Ultrapura	q.s.p 25 µL
DNA (100 ng/µL)	2,0 µL

Para investigação e detecção da sequência nucleotídica específica da enzima modificadora de aminoglicosídeo *aac(6')-Ib*, foi realizada PCR Single, utilizando *primers* e protocolo descrito por Park e colaboradores (2006) (quadros 12 e 15, respectivamente).

A ciclagem utilizada foi de desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Foi utilizada uma reação isenta de DNA como controle negativo e como controle positivo cepa carreadora do gene pesquisado e sequenciado (*Enterobacter cloacae* 41AC1) gentilmente cedida pelo professor Dr. Nilton Lincopan (Laboratório Resistência Bacteriana & Alternativas Terapêuticas-USP).

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8µL – 100mL). A eletroforese foi realizada a 100 volts,

por 55 minutos. O resultado foi visualizado e fotografado pelo fotodocumentador LPix Ex (Loccus Biothechnology).

Quadro 15: Protocolo Single PCR para detecção do gene da N-acetiltransferase aac.

Componentes	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µL
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	1,5 µL
<i>Primer aac(6')Ib-F</i> (10 µM)	1,0 µL
<i>Primer aac(6')Ib-R</i> (10 µM)	1,0 µL
Taq-DNA polimerase (5U/µL)	0,2 µL
Água Ultrapura	q.s.p 25 µL
DNA (100 ng/µL)	2,0 µL

A sequência do gene *aac(6')-Ib* foi determinada utilizando o *Big Dye Terminator Kit v3.1* (Applied Biosystems, USA), segundo recomendações do fabricante. O sequenciamento teve como finalidade identificar a variante genética *aac(6')-Ib-cr* produzida pelos isolados clínicos estudados, as possíveis mutações e sua associação com o fenótipo de resistência apresentado pelas fluoroquinolonas.

A PCR para sequenciamento foi realizada em placa de 96 poços, onde foram utilizados 2,0 µl de “*Big Dye[®] Terminator v3. 1 Cycle Sequencing*” (Applied Biosystems[®]), 2,0 µL Tampão (5X), 0,8µl *primer* específico (5,0 mM), 3,0 µl de DNA e 2,2 µl água ultrapura (Invitrogen), suficiente para completar 10 µl de reação. A amplificação foi realizada com desnaturação inicial 96 °C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos, 60 °C por 4 minutos e extensão final a 4 °C. O primer utilizado no sequenciamento do gene *aac(6')-Ib-cr* (CGTCACTCCATACATTGCAA) foi descrito por Park e colaboradores (2006). Os produtos amplificados foram submetidos à precipitação. Em cada poço da placa foi adicionado 2 µl de EDTA 125mM, em seguida 2µl de acetado de sódio 3M e 50µl de etanol 100%. Após incubação por 15 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos, a 2000 x giros em centrífuga (Eppendorf[®] 5810R) refrigerada a 4 °C. Após, o sobrenadante foi descartado e as amostras lavadas com 70 µl de etanol 70%, centrifugado por 15 minutos a 2000 x giros em centrífuga (Eppendorf[®] 5810R) refrigerada a 4 °C. O sobrenadante foi totalmente descartado e após secagem

completa dos poços através de um tempo de giro de 185 x g por 1 minuto, as amostras foram homogeneizadas com 10 µl de formamida. Em seguida as amostras foram inseridas no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems®) com a seguinte programação: desnaturação a 95 °C por 5 minutos e colocado em gelo por 2 minutos.

O material foi analisado no equipamento de sequenciamento automático modelo ABI 3130xl (Applied Biosystems®). A análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos obtidos foram alinhadas manualmente e comparadas com sequências existentes no banco de dados (*GenBank* – <http://www.ncbi.nlm.gov/genbank>), utilizando os programas Accelrys Gene. e BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

4.6 Tipagem molecular de *Enterobacter* spp pelo método de ERIC-PCR

A ERIC-PCR foi o método escolhido para avaliar a similaridade genética entre as cepas. Esse método é baseado na amplificação de sequências cromossômicas repetidas do DNA. O *primer* ERIC-2 (STUMPF et al., 2005) e protocolo de Cartelle e colaboradores (2004) estão descritos no quadro 16. A ciclagem foi iniciada com desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minutos, anelamento a 52 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 8 minutos, e uma extensão final a 72 °C por 16 minutos.

Os produtos desta reação foram analisados em gel de agarose 1,5%, previamente adicionados de brometo de etídio (0,8 µL-100 mL). A eletroforese foi realizada a 100 volts, por 120 minutos. O marcador de 1Kb (Thermo Scientific) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos.

Os perfis eletroforéticos foram analisados utilizando o programa BioNumerics (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Bélgica). A similaridade genética entre os isolados foi determinada pelo índice de similaridade de Dice, e o dendrograma, construído segundo o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), utilizando tolerância de posição de bandas de 1,0 % e otimização de 0,5 %. Os isolados que apresentaram coeficiente de similaridade genética superior a 90% foram considerados ao mesmo grupo genético.

Quadro 16: *Primer e Protocolo para ERIC-PCR utilizado no estudo.*

Alvo de Amplificação	Primer	Sequências 5' a 3'	Referência
Sequências intragênicas repetitivas	ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	Stump et al., 2005
Componentes		Volume	
Tampão para PCR (10X)		2,5µL	
MgCl ₂ (25 mM)		3,0µL	
Mistura de dNTP (10 mM)		1,5µL	
Primer ERIC-2 (10 µM)		1,0µL	
Taq-DNA polimerase (5U/µL)		0,2µL	
Água Ultrapura		q.s.p 25µL	
DNA 500 ng/µL		2,0µL	

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil clínico-epidemiológico

Os 60 isolados de *Enterobacter* spp deste estudo, sendo 54 do complexo *E. cloacae* (90%) e 06 *E. aerogenes* (10%) foram recuperados de distintos materiais biológicos: urina (59%), aspirado traqueal (18%), biópsia (10%), sangue (7%), ponta cateter (3%) e líquidos pleural/sinovial (3%), como ilustrado na figura 2. Os *E. cloacae* foram isolados a partir de um maior número de amostras clínicas: urina (34), aspirado traqueal (10), biópsias (06), sangue (02), ponta de cateter (1) e de líquido sinovial (1). *E. aerogenes* presente apenas de uma amostra de urina, aspirado traqueal, ponta de cateter e líquido pleural e em duas amostras de sangue (figura 3).

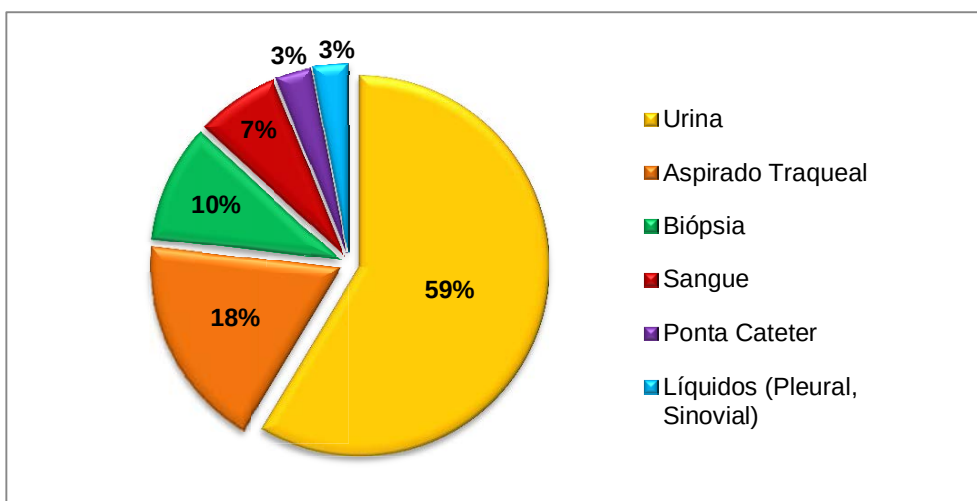


Figura 2: Distribuição de sessenta isolados de *Enterobacter* spp em diferentes amostras biológicas.

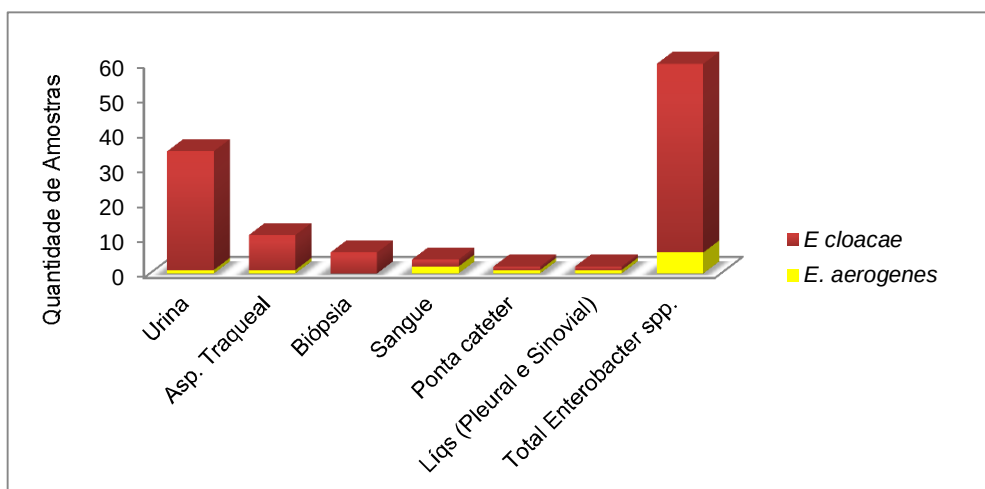


Figura 3: Distribuição das sessenta amostras biológicas por espécies de *Enterobacter* spp

O isolamento de *E. cloacae* de diversas amostras clínicas era esperado, pois esta bactéria é reconhecida por causar infecções oportunistas em pacientes hospitalizados, tais como, infecções do trato respiratório inferior, trato urinário e meningite (LIU et al., 2013). A maior percentagem de *E. cloacae* também era esperada. De acordo com estudo realizado por Al-Hasan e colaboradores (2012), para a avaliação da prevalência de *Enterobacter* spp como agente de infecção de corrente sanguínea, *E. cloacae* foi o microrganismo com maior frequência se comparado com *E. aerogenes*. Em estudo realizado em onze hospitais da região sul do Brasil entre o período de 2009 à 2011 *E. cloacae* foi o mais prevalente (75%) se comparado outras espécies de enterobactérias (*Klebsiella* spp 27,2%, *E. coli* 5,2%) isoladas de diferentes amostras clínicas (RIBEIRO et al, 2013).

Neste estudo, o trato urinário dos pacientes admitidos em diferentes unidades de internação do Hospital de Base foi o sítio de onde *Enterobacter* spp foi isolado com maior frequência (59%). Conforme relatado em estudos no Oriente médio e África (RAMAZANZADEH et al., 2009; IRENGE et al., 2014), as infecções do trato urinário (ITU) por *Enterobacter* spp em pacientes hospitalizados pode alcançar índices variados de prevalência quando comparado a outros patógenos da família *Enterobacteriaceae*, tais como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

O segundo sítio mais frequente de isolamento de *Enterobacter* spp foi o aspirado traqueal (18%). Todos os isolados de aspirado traqueal foram provenientes de pacientes internados nas unidades de terapia intensiva (UTI) do HB. Em UTIs, a pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) é muito prevalente, e de acordo com programa de vigilância ENVIN da Espanha (*Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial*) 40% das PAV foi causada por bactérias do grupo ESKAPE (*E. facium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp) (SANDIUMENGE; RELLO, 2012). Segundo estudo realizado em um hospital universitário da Alemanha (HENNIGS et al., 2011), as PAV por *Enterobacter cloacae* estiveram associadas a uma taxa de mortalidade de 24% entre pacientes de UTI.

Biópsias foi o terceiro sítio mais frequente neste estudo (10%), onde *Enterobacter cloacae* foi a única espécie detectada nestas amostras biológicas. Poucos são os relatos deste gênero detectados em biópsias. Lange e colaboradores (2009) descreveu uma urosepsis em paciente após 48 horas do procedimento de biópsia de próstata em hospital de Vancouver no Canadá. No entanto, infecções de corrente sanguínea por *Enterobacter* spp são mais relatadas mundialmente (QURESHI et al., 2011, CHEN; HUANG, 2013; NOGUEIRA et al., 2014),

porém neste estudo foi o sítio com menor frequência de detecção, seguidos por ponta de cateter e líquidos pleural e sinovial.

As amostras clínicas foram obtidas de pacientes em diferentes unidades de internação do HB. A maior frequência de isolamento de *Enterobacter* spp foi de pacientes de UTIs, de onde foi obtido um total de 37 isolados. Entre elas estão Unidades de Terapia Intensiva (37 isolados de 60), tais como: UTI Geral (SUS e Convênio) (21de 60) UTI da Emergência (7de 60), UTI Cardiológica Adulto (4de 60), Unidade Semi-Intensiva (4 de 60) e UTI Pós Operatória (1de 60). Outros 23 isolados são provenientes de pacientes admitidos na Enfermaria (10 isolados de 60), Emergência Quartos (7de 60), e nas alas de Clínicas, Unidade de Cuidados Paliativos e ala de Transplante (6 de 60), conforme ilustrado na figura 4. Entre pacientes admitidos em UTIs, aquisição de infecções por *Enterobacter* spp é comum, principalmente albergando diversos genes de resistência de diferentes classes de antimicrobianos (MARTIN; YOST, 2011; NOVAK et al., 2014).

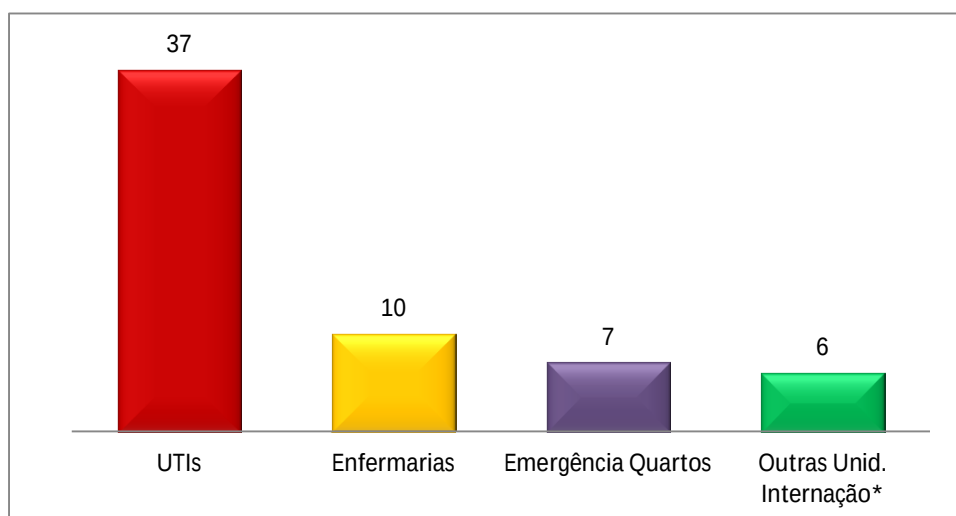


Figura 4. Distribuição dos sessenta pacientes presentes nas diferentes Unidades de Internação do HB.

* Alas de Clínicas, Unidade de Cuidados Paliativos e Transplante.

5.2 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentado pelos isolados de *Enterobacter* spp.

Os antimicrobianos aos quais os *Enterobacter* spp apresentaram as maiores taxas de sensibilidade foram amicacina (60 isolados -75%) e colistina (60 isolados - 92%) como

demonstrado na figura 05. Resultados semelhantes com relação ao perfil de susceptibilidade à amicacina (17 isolados – 82%) também foram encontrados em estudo realizado em um hospital terciário na Espanha com isolados de *Enterobacter* spp (PENA et al., 2014). Entretanto, neste mesmo estudo foi observado um perfil divergente em relação à resistência à colistina (17 isolados - 47%) se comparado ao atual estudo (60 isolados – 3%), onde dois *E. aerogenes* apresentaram MIC ≥ 16 μ g/mL para colistina.

Com relação aos carbapenêmicos, 100% dos isolados apresentaram resistência ao ertapenem, e 27% dos isolados apresentaram resistência ao imipenem e meropenem (Fig. 5). A resistência ao ertapenem foi usada como fator determinante para a seleção dos isolados a serem incluídos neste estudo, pois este carbapenêmico é considerado um bom indicador de especificidade para detecção de isolados produtores de beta-lactamases do tipo carbapenemases (McGETTINGAN et al., 2009). No entanto, o ertapenem pode ser muito pouco sensível quando bactérias apresentam outros mecanismos de resistência associados (p. ex. ESBL associada a mutações nas porinas) principalmente quando analisados por disco difusão ou métodos automatizados como Vitek-2[®] (CARVALHAES et al., 2010; LEE; CHUNG, 2015).

Foi observado que 100% dos isolados apresentaram resistência a ceftriaxona, 93% de resistência a ceftazidima e 78% a cefepima (Fig. 5). A resistência de cefotaxima, ceftazidima e cefepima em *Enterobacter* spp estão relacionadas a produção de enzimas que degradam cefalosporinas de terceira e quarta gerações, que não são as cefalosporinases cromossomais presentes de forma constitutiva neste gênero bacteriano (SU et al., 2010). No estudo realizado por Silva-Sanchez e colaboradores (2011) em oito hospitais no México os isolados de *Enterobacter cloacae* também apresentaram um perfil de resistência a ceftazidima (90%) muito semelhante ao estudo em questão.

As quinolonas de primeira e segunda geração avaliadas neste estudo apresentaram baixa efetividade em um elevado percentual dos isolados (Fig.5). Entre os isolados resistentes pode-se observar que o ácido nalidíxico, representante da primeira geração, foi a quinolona menos ativa (97% de isolados resistentes), seguido da norfloxacin e ciprofloxacina representantes da segunda geração, que apresentaram resistência em 82% e 73% dos isolados respectivamente.

Estudos revelam um alerta aos perfis de resistência as quinolonas em cepas de origem clínica, visto que este antimicrobiano é empregado em diferentes tratamentos de infecções causadas tanto por bactérias Gram positivas quanto Gram negativas, e também nas mais

diversas formas de infecções, em especial nas infecções associadas assistência saúde (IRAS) e adquiridas na comunidade (DALHOFF, 2012).

Foi observado que a grande maioria dos isolados incluídos no atual estudo pode ser considerada como MDR (*multi-drug resistant*), como demonstrado na figura 2. Esse termo significa a não susceptibilidade a pelo menos um agente de três ou mais classes de antimicrobianos, sendo definido em uma convenção entre os órgãos CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) e ECDC (*European Centers for Disease Prevention and Control*). Nessa mesma convenção foram definidas dezessete categorias de antimicrobianos para o tratamento de infecções por *Enterobacteriaceae*. Neste estudo foram testadas apenas sete dessas categorias: aminoglicosídeos, carbapenêmicos, cefalosporinas de terceira e quarta gerações, polimixinas, quinolona e fluoroquinolonas, aos quais *Enterobacter* spp não apresenta resistência natural (intrínseca) (MAGIORAKOS et.al., 2012).

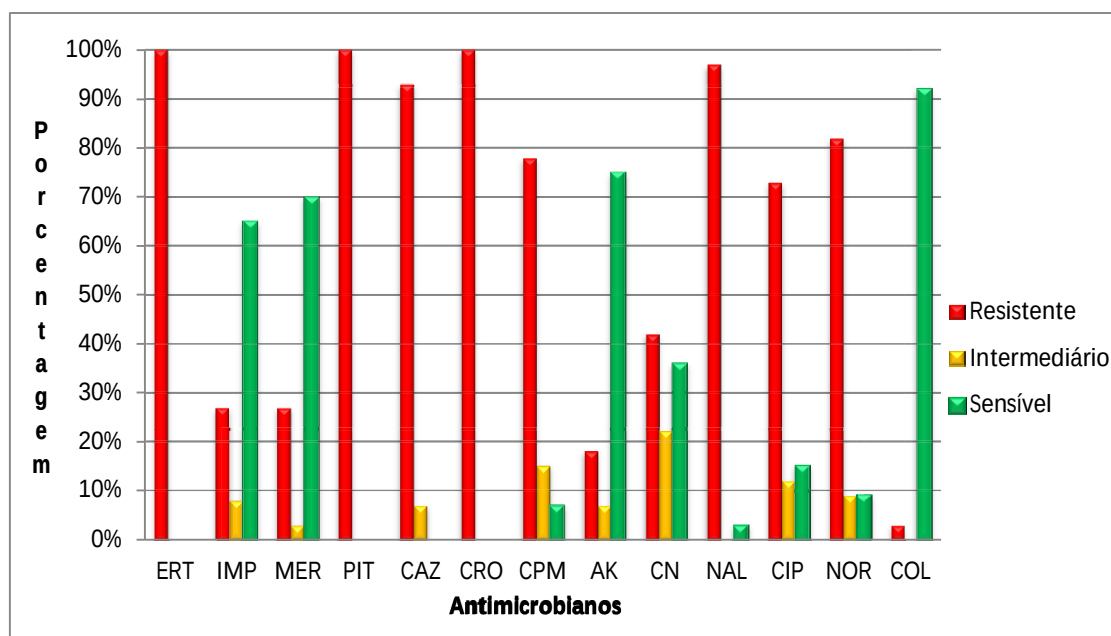


Figura 5: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em cepas de *Enterobacter* spp. Antimicrobianos: ERT: Ertapenem; IMP: Imipenem; MER: Meropenem; PIT: Piperacilina+tazobactam; CAZ: Ceftazidima; CRO: Ceftriaxona; CPM: Cefepime; AK: Amicacina; CN: Gentamicina; NAL: Ácido nalidíxico; NOR: Norfloxacina; COL: Colistina.

5.3 Investigação de genes carbapenemases

Dos sessenta *Enterobacter* spp estudados, treze (22%) apresentaram um fragmento de 900pb, correspondente à região codificadora do gene *bla*_{KPC}, conforme mostrado na tabela 1 e figura 6, como uma baixa sensibilidade a um ou mais carbapênemicos.

Nos demais 47(78%) isolados não foram detectados genes carbapenemases *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{GES} e *bla*_{OXA-48}, testados. É interessante observar que em quatro destes isolados onde o gene *bla*_{KPC} não foi detectado (EC18, EA40, EC61, EC66), apresentaram resistência aos três ou em dois carbapênemicos testados (Tabela 16 em anexo). Nestes isolados, outro mecanismo de resistência aos carbapenêmicos pode estar presente com p. ex., alterações ou perda da permeabilidade da membrana bacteriana devido às porinas associadas expressão de beta-lactamases de espectro estendido (SZABÓ et al., 2006; DOUMITH et al., 2009; JASKULSKI et al., 2013; LAVIGNE et al., 2013).

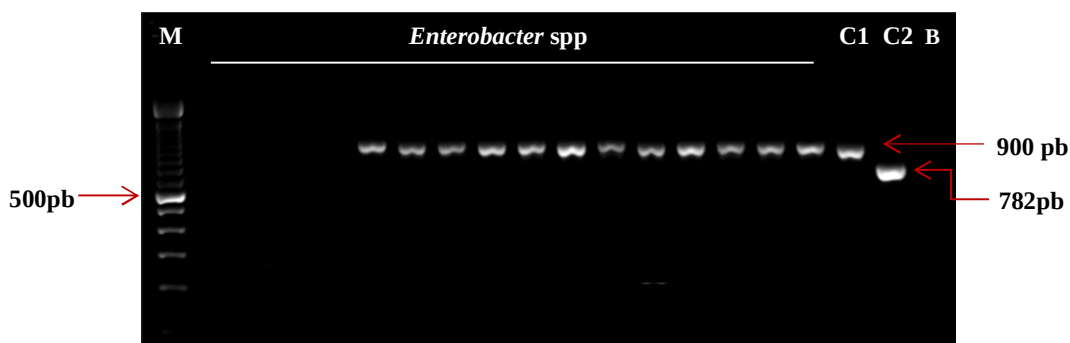


Figura 6: Eletroforese em gel agarose contendo fragmento do gene *bla*_{KPC}. M: Marcador peso molecular 100pb; Amostras de *Enterobacter* spp; C1: Controle Positivo KPC (900pb); C2: Controle Positivo NDM (782pb); B: Controle negativo.

Entre os 13 *Enterobacter* spp em que o gene *bla*_{KPC} foi identificado, 08 (61,5%) foram *E. cloacae* e 05 (38,5%) *E. aerogenes*. Este resultado é semelhante aos descritos em outro estudo realizado com *Enterobacteriaceae*, onde 06 (42,9%) *E. cloacae* apresentaram carbapenemase do tipo KPC (RIBEIRO et al., 2013).

O gene *bla*_{KPC} foi o único gene de carbapenemase detectado, portanto, considerado o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos neste estudo. Resultado discordante foi relatado por Dai e colaboradores (2013), em que a maioria de *E. cloacae* isolados de um hospital universitário na China apresentou carbapenemase do tipo IMP (variantes IMP-8 e IMP-26).

5.4 Investigação de genes Beta Lactamases de Espectro Estendido (ESBL)

5.4.1 Investigação de *bla*_{TEM-like} e *bla*_{SHV-like}

Neste estudo, entre os 60 isolados de *Enterobacter* spp submetida à análise por PCR para identificação de *bla*_{TEM}, em 49 (82%) foi amplificado um fragmento de 800pb correspondente à região codificadora do gene. A tabela 1 e figura 7 mostra a amplificação por PCR de *bla*_{TEM} em algumas *Enterobacter* spp estudadas. O gene *bla*_{SHV} foi identificado somente em duas *E. cloacae* (EC61 e EC64).

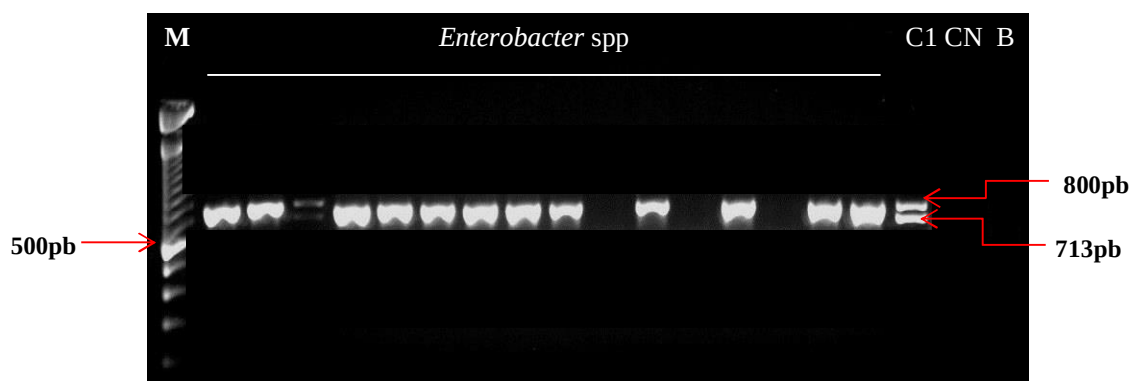


Figura7: Eletroforese gel agarose contendo fragmento do gene *bla*_{TEM-like} e *bla*_{SHV-like}. M: Marcador peso molecular 100pb; Amostras *Enterobacter* spp.; C1+: Controle Positivo TEM (800pb) e SHV (713pb); CN: (*Enterobacter aerogenes* CDC1680); B: Branco.

Um fato interessante, é que os isolados EC39, EC55 e EC63, que carregam apenas o gene *bla*_{TEM-like} e EC61 com apenas *bla*_{SHV-like}, apresentaram fenótipo de resistência às cefalosporinas de terceira geração testadas, sugerindo que os mesmos podem ser variantes ESBL destes genes. O sequenciamento destes genes poderá elucidar esta questão.

5.4.2 Investigação de *bla*_{CTX-M}

Em 49 (82%) dos 60 isolados de *E. cloacae* e *E. aerogenes* submetidas à análise por PCR para a identificação de *bla*_{CTX-M} foi amplificado um fragmento de 544pb (Figura 8), comum a todos *bla*_{CTX-M}. Nas últimas décadas, as enzimas tipo CTX-M têm sido descritas mundialmente como as ESBL mais frequentemente encontradas em *Enterobacteriaceae*

(LYTSY, et al., 2008; DIAZ, et al., 2010; SONG, et al., 2011; BARL, et al., 2012), bem como em isolados clínicos de *Enterobacter* spp. (CHOI, et al., 2007).

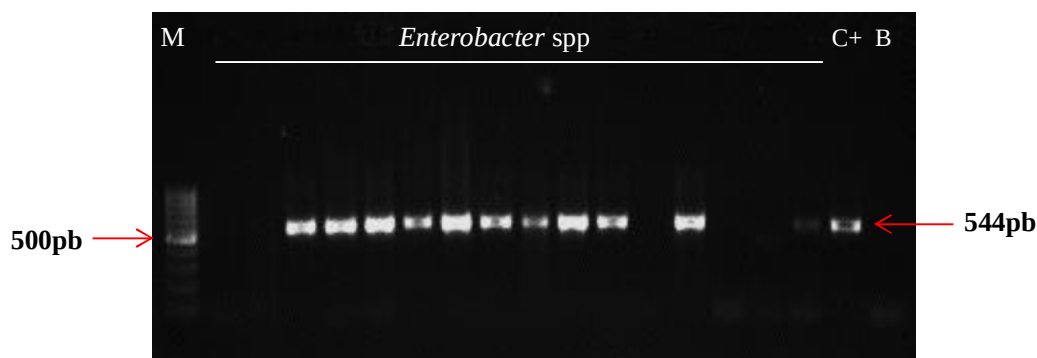


Figura 8: Eletroforese em gel agarose contendo fragmento do gene *bla*_{CTX-M}. M: Marcador peso molecular 100pb; Amostras de *Enterobacter* spp; C+: Controle Positivo CTX-M; B: Controle negativo.

Entre os isolados de *Enterobacter* spp que foram identificados o gene *bla*_{CTX-M}, foram investigados *bla*_{CTX-M} pertencentes a quatro grupos, com base na detecção de um fragmento do gene de 688pb que corresponde às variantes de CTX-M do grupo 1 (CTX-M-1, CTX-M-3 e CTX-M-15), 404pb para CTX-M grupo 2, 561pb para CTX-M grupo 9 (CTX-M-9 e CTX-M-14) e 326pb para CTX-M grupo 8/25 (CTX-M-8, CTX-M-25, CTX-M-26, CTX-M-39, e CTX-M-41) (DALLENE et al., 2010).

Vinte e oito isolados (47%) foram identificados como carreadores de genes que codificam CTX-M do grupo 1, vinte (33%) CTX-M do grupo 2 (Tabela 1 e Fig.9 Gel-1) e apenas um isolado (2,0%) CTX-M do grupo 8/25. Em estudo realizado em dois hospitais universitários do Irã, a enzima CTX-M do grupo 1, também foi a mais detectada em isolados de *Enterobacter cloacae* (60,4%) principalmente a variante CTX-M-15 (PEYMANI et al., 2014).

No Brasil um estudo realizado por Nogueira e colaboradores (2014) em hospital universitário de Curitiba-PR com espécies de *Enterobacter* spp ocasionando infecções de corrente sanguínea o gene *bla*_{CTX-M} e as variantes CTX-M-2, -59 e -15 foram as mais detectadas em relação a outras ESBLs.

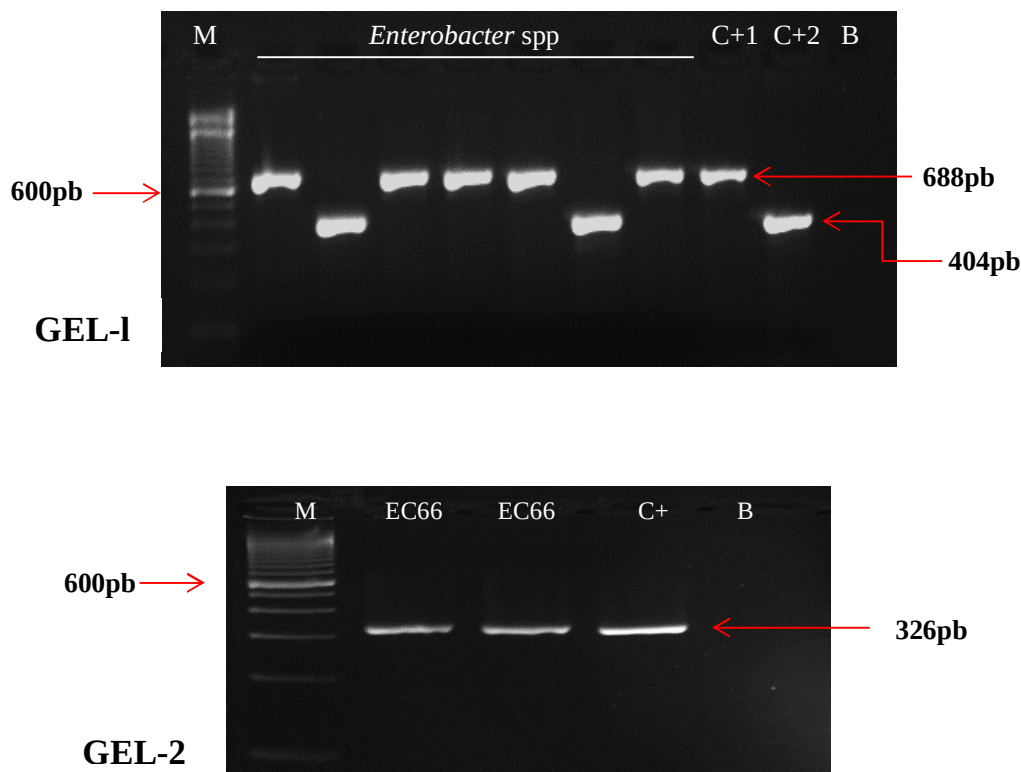


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação dos grupos de *bla*_{CTX-M}. **Gel1:** Reação Multiplex mostrando amostras carreadoras de *bla*_{CTX-M} grupos 1 (688pb) e *bla*_{CTX-M-2} (404pb); C+1: Controle positivo 1 (KpHB96); C+2: Controle positivo 2 (KpHB90). **Gel 2:** Reação Single mostrando EC66 em duplicata contendo *bla*_{CTX-M8/25} (326pb). M: marcador de peso molecular 100pb; C+: Controle Positivo; B: Controle Negativo.

Na *Enterobacter cloacae* (EC66) foi detectado um gene que codifica CTX-M do grupo 8/25 (**Fig.9 Gel-2**). Este isolado apresentou CIM ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ para ceftazidima, ceftriaxona e cefepime. No Brasil poucos são os relatos do grupo CTX-M-8/25, entretanto Bonnet e colaboradores (2000) relataram CTX-M-8 em *E. cloacae* e *E. aerogenes* isolados em hospitais do Rio de Janeiro entre 1996 e 1997. Os genes *bla*_{GES}, *bla*_{VEB} e *bla*_{PER} não foram detectados nos 60 isolados investigados neste estudo.

5.5 Investigação de genes de resistência a quinolonas localizados em plasmídeos (PMQR)

Foram detectados genes *qnrB* em 40%, *qnrA* em 22% e *qnrS* em 2% dos isolados de *Enterobacter* spp. Em dois isolados foram detectadas os genes *qnrA* e *qnrB* simultaneamente. A presença dos genes *qnr* em *Enterobacter* spp tem sido descrito em vários estudos: 41,6% em cepas isoladas da China (ZHAO et al., 2010), 66% de resistência a ciprofloxacina com

predominância de *qnrB* em cepas isoladas dos Estados Unidos (ROBICSEK et al., 2006b) e a prevalência de *qnrA* em estudo entre 1990 a 2005 de uma coleção de cepas de Israel (STRAHILEVITZ, et al 2007).

O gene *qepA* não foi detectado nos 60 isolados investigados neste estudo.

Em 83% dos isolados de *Enterobacter cloacae* foi detectada a presença do gene *aac(6')-Ib*, que confere resistência aos aminoglicosídeos, conforme ilustrado na tabela 1 e figura 10. No entanto, substituições nos aminoácidos 102 e 179 na enzima codificada por este gene produz uma variante capaz de promover acetilação dos sítios de ação fluoroquinolonas. Sendo assim, onze *E. cloacae* (EC01, EC02, EC04, EC05, EC06, EC7A, EC09, ECIX, ECXIII, EC13 e EC18) foram sequenciadas, e os resultados demonstraram a ocorrência da variante *aac(6')-Ib-cr* nestes isolados.

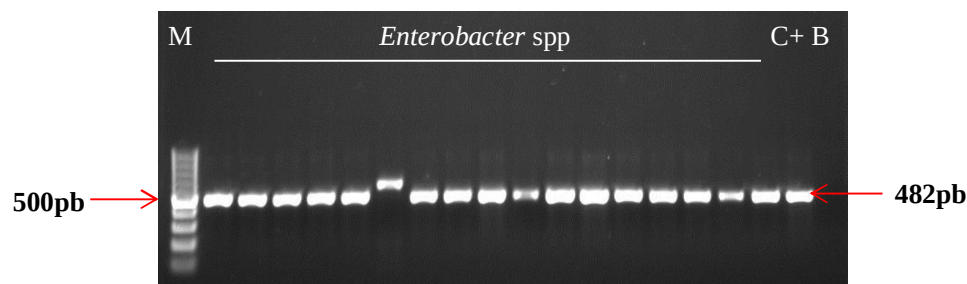


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene *aac(6')-Ib*; M: marcador de peso molecular 100pb; C+: Controle Positivo (cepa 41EC1 contendo gene *aac(6')-Ib-cr*); B: Controle Negativo.

Assim como seu precursor *aac(6')-Ib*, os genes *aac(6')-Ib-cr* são geralmente associados a elementos genéticos, entre estes elementos se destacam transposons (principalmente Tn1331), integron de classe 1, e entre as sequências de inserção, a IS 26, podem estar inseridos em plasmídeos ou no cromossomo (RAMIREZ et al., 2013).

O gene *aac(6')-Ib-cr* já foi relatado em diversos países nos continentes Europeu, Asiático, Africano, Americano e na Oceania. Na América do Sul já foi observado em alguns países como Uruguai, Argentina e Brasil (RODRIGUÉZ-MARTÍNEZ et al., 2011). No Brasil, o primeiro relato ocorreu em 2011, por Peirano e colaboradores, em cepas de *Escherichia coli* de origem clínica. Relatos posteriores, também foram a partir de cepas de *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter cloacae* e *E. coli*) provenientes de amostras clínicas (PAIVA, et al 2012; VIANA, et al., 2013). Este estudo, semelhante aos anteriores realizados no país, apresentou a variante *-cr* nas *Enterobacter spp* selecionadas de diferentes amostras biológicas.

Tabela.01 Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentado por 60 *Enterobacter* spp e seus respectivos genótipos de resistência.

Teste de Sensibilidade por Microdiluição (µg/mL)														Genótipos encontrados	
Isolados	ERT	IMP	MER	CAZ*	CRO	CPM*	AK	CN	NA	CIP	NOR	PIT	COL*	Genes <i>bla</i>	Genes PMQR
	S≤0,5	S≤1	S≤1	S≤1	S≤1	S≤1	S≤16	S≤4	S≤16	S≤1	S≤4	S≤16/4	S≤2		
	I=1	I=2	I=2	I=2-4	I=2	I=2-4	I=32	I=8	R≥32	I=2	I=8	R≥128/4	R≥4		
	R≥2	R≥4	R≥4	R≥8	R≥4	R≥8	R≥64	R≥16		R≥4	R≥8				
ECIV	(≥8)	(≥16)	(≥16)	(≥64)	(≥64)	(8)	(≤2)	(≤2)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{KPC}	<i>aac(6')Ib</i>
EAV	(≥8)	(≥16)	(≥16)	(4)	(8)	(1)	(≤2)	(≤1)	NT	(≤0,25)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{KPC}	-
EAVI	(≥8)	(≥16)	(≥16)	(4)	(≥64)	(1)	(≤2)	(≤1)	NT	(≤0,25)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{KPC}	-
EAVII	(4)	(≥16)	(≥16)	(4)	(8)	(1)	(≤2)	(≤1)	NT	(≤0,25)	NT	(≥128)	(≥16)	<i>bla</i> _{KPC}	-
ECVIII	(4)	(≥16)	(≥16)	(4)	(8)	(1)	(≤2)	(≤1)	(≤2)	(≤0,25)	(4)	(≥128)	(≥16)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	-
EC7A	(≥8)	(≥16)	(≥16)	(≥16)	(32)	(4)	(≤2)	(4)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>aac(6')Ib-cr</i>
ECIX	(≥8)	(≥16)	(≥16)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(≤1)	NT	(≥4)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>aac(6')Ib-cr</i>
ECX	(4)	(≥16)	(≥16)	(8)	(≥16)	(2)	(≤2)	(≤1)	NT	(≤0,25)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{KPC}	-
EAXI	(≥8)	(≥8)	(≥16)	(≥64)	(≥64)	(4)	(4)	(≥16)	NT	(≤0,25)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM-like}	-
EAXII	(≥8)	(≥16)	(≥16)	(≥64)	(≥64)	(8)	(≤2)	(8)	NT	(1)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM-like}	-
ECXIII	(≥8)	(≥16)	(≥16)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(≥16)	NT	(2)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>aac(6')Ib-cr</i>
ECXIV	(≥8)	(≥16)	(≥16)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(16)	(≥16)	(≥32)	(2)	(8)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>aac(6')Ib</i>
ECXV	(≥8)	(≥16)	(≥16)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(≥16)	(≥32)	(2)	(2)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>aac(6')Ib</i>
EC01	(≥8)	(1)	(0,5)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(4)	(≥16)	NT	(≥4)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>aac(6')Ib-cr</i>
EC02	(≥8)	(1)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≥16)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i>
EC04	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(4)	(≥16)	NT	(≥4)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>aac(6')Ib-cr</i>
EC05	(≥8)	(4)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(8)	(8)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i>
EC06	(≥8)	(1)	(1)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(≥16)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i>
EC08	(≥8)	(1)	(0,5)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(≥16)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC09	(≥8)	(1)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(8)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>aac(6')Ib-cr</i>
EC13	(4)	(1)	(1)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(8)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>aac(6')Ib-cr</i>
EC18	(≥8)	(2)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(8)	(8)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>aac(6')Ib-cr</i>
EC19	(≥8)	(1)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(≥16)	NT	(≥4)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>aac(6')Ib</i>
EC21	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(4)	(8)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	NT	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>qnrA</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC24	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(4)	(≥16)	(≥32)	(≥4)	(8)	(≥128)	NT	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC25	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(8)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>qnrA</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC26	(≥8)	(0,5)	S (1)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(8)	(≥16)	NT	(≥4)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC27	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≥16)	NT	(≥4)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC30	(4)	(0,5)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤1)	NT	(≥4)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC31	(4)	(0,5)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(32)	(≥16)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	NT	<i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>

Tabela.01 Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentado por 60 *Enterobacter* spp e seus respectivos genótipos de resistência.

Teste de Sensibilidade por Microdiluição (µg/mL)														Genótipos encontrados	
Isolados	ERT S≤0,5 I=1 R≥2	IMP S≤1 I=2 R≥4	MER S≤1 I=2-4 R≥8	CAZ* S≤1 I=2-4 R≥8	CRO S≤1 I=2 R≥4	CPM* S≤1 I=2-4 R≥8	AK S≤16 I=32 R≥64	CN S≤4 I=8 R≥16	NA S≤16 R≥32	CIP S≤1 I=2 R≥4	NOR S≤4 I=8 R≥8	PIT S≤16/4 R≥128/4	COL* S≤2 R≥4	Genes bla	Genes PMQR
EC32	(≥8)	(1)	(2)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(≤1)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>qnrA</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC33	(4)	(1)	(1)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(4)	(≥16)	(≥32)	(2)	(8)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC34	(≥8)	(1)	(0,5)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(≥16)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>aac(6')Ib</i>
EC35	(≥8)	(0,5)	(1)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(≥16)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC37	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(8)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>qnrA</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC39	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(4)	(≤2)	(8)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like}	<i>qnrA</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EA40	(≥8)	(4)	(4)	(≥16)	(≥64)	(≥64)	(4)	(≥16)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>qnrS</i>
EC41	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(16)	(≤1)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC42	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(8)	(≤2)	(8)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC43	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(8)	NT	(≥4)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>aac(6')Ib</i>
EC44	(4)	(≤0,25)	(0,5)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(≤1)	(≥32)	(2)	(2)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC46	(≥8)	(2)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(2)	(≤2)	(≤1)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>aac(6')Ib</i>
EC47	(4)	(≤0,25)	(1)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤1)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC48	(4)	(≤0,25)	(0,5)	(≥64)	(≥64)	(4)	(8)	(≥16)	NT	(≥4)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC50	(4)	(2)	(2)	(≥64)	(≥64)	(16)	(8)	(≥16)	NT	(2)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC51	(≥8)	(1)	(1)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(8)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC53	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(≥16)	NT	(2)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC54	(≥8)	(0,5)	(1)	(≥64)	(≥64)	(4)	(16)	(≤1)	NT	(≥4)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC55	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(4)	(≤2)	(≤1)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like}	<i>aac(6')Ib</i>
EC56	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(32)	(≤1)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrA</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC57	(2)	(0,75)	(1)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(≥16)	NT	(1)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	-
EC58	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤2)	(8)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>aac(6')Ib</i>
EC59	(2)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤1)	NT	(≥4)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrA</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC60	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤1)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(0,38)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC61	(4)	(2)	(≥16)	(≥64)	(≥64)	(16)	(≥64)	(≥16)	NT	(1)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{SHV-like}	-
EC62	(4)	(2)	(0,5)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≤1)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC63	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(4)	(≤2)	(≥16)	(≥32)	(≥4)	(≥16)	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC64	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(8)	NT	(≥4)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{SHV-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G2}	<i>qnrA</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC65	(4)	(≤0,25)	(≤0,25)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(32)	(≤1)	NT	(≥4)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-G1}	<i>qnrA</i> , <i>aac(6')Ib</i>
EC66	(≥8)	(≥16)	(≥16)	(≥64)	(≥64)	(≥64)	(32)	(≥16)	NT	(≥4)	NT	(≥128)	(≤0,5)	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-8/25}	<i>qnrB</i> , <i>aac(6')Ib</i>

Legenda: *Critérios Interpretativos segundo Norma Técnica N°01/2013 da ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Os demais antimicrobianos seguem normas documento M100-S23(CLSI- 2013). Antimicrobianos: ERT: Ertapenem; IMP: Imipenem; MER: Meropenem; CAZ: Ceftazidima; CRO: Ceftriaxona; CPM: Cefepima; AK: Amicacina; CN: Gentamicina; NA: Ácido nalidíxico; CIP: Ciprofloxacina; NOR: Norfloxacina; PIT: Piperacilina/Tazobactam; COL: Colistina. EA: *Enterobacter aerogenes*; EC: *Enterobacter cloacae* (complexo).

5.6 Tipagem molecular das cepas de *Enterobacter cloacae* e *E. aerogenes*

A tipagem molecular dos isolados de *E. cloacae* (EC) e *E. aerogenes* (EA) foi realizada pela técnica de ERIC-PCR. Esta técnica foi escolhida por ser de fácil realização e fornecer resultados em curto período de tempo, além de apresentar uma boa capacidade discriminatória (STUMPF et al., 2004). Os dendrogramas foram gerados pelo software BioNumerics (*Applied Maths Saint-Martens-Latem, Bélgica*), a partir da análise do perfil genotípico gerado por ERIC-PCR.

A figura 11 (anexos) mostra o dendrograma com os 48 *E. cloacae*, e a figura 12 mostra o dendrograma com os 6 *E. aerogenes*. Os isolados EC01, EC02, EC24, EC26, EC34 e EC65 não foram tipáveis. Isolados que apresentaram similaridade $\geq 90\%$ foram colocados no mesmo grupo. Todos os *E. aerogenes* foram inseridos em um único grupo genético. Os isolados *E. cloacae* foram distribuídos em doze grupos genéticos (G1 a G12).

Foi interessante observar que os mesmos isolados inseridos em um mesmo grupo genético apresentaram diferentes combinações de genes de resistência. Entre as quatro *E. cloacae* incluídas em G1, EC13, EC46 e EC50 apresentaram 100% de similaridade, e estas apresentaram 92,4% de similaridade com EC06. No entanto, apesar da identidade genética com EC46 e EC50, EC13 apresentou *bla*_{CTX-M} do Grupo 2, enquanto as duas primeiras apresentaram *bla*_{CTX-M} do Grupo 1. EC06 apresenta uma combinação de genes de resistência mais semelhante à EC46 e EC50 do que EC13.

Apesar de as três cepas agrupadas em G2 terem sido isoladas em um período de tempo muito próximo (2 meses), além de EC47 e EC31 terem sido isoladas na mesma unidade hospitalar, e apresentarem genótipo de resistência muito similares, nenhum dos perfis genéticos foram idênticos.

As cepas EC41 e EC44 agruparam-se em G3 com 94,7% de similaridade, tendo sido isoladas na mesma unidade hospitalar e em período muito próximo. Porém, EC41 difere de EC44 por apresentar os genes *bla*_{CTX-M} do grupo 1 e *qnrB*. Diversos trabalhos mostram o isolamento de *Enterobacteriaceae* carregando genes *bla*_{CTX-M} e *qnr* tanto em humanos quanto em animais (PANIAGUA et al., 2010; SALLEM et al., 2013), revelando o potencial de disseminação desses genes em conjunto.

No grupo G4, constituído por EC05 e EC19, observa-se que ambas diferem entre si quanto ao genótipo de resistência. EC05 carrega *bla*_{CTX-M} do Grupo 2 e os genes, *qnrB* e *aac(6')-Ib-cr*, enquanto EC19 carrega *bla*_{CTX-M} do Grupo 1 e nenhum gene *qnr*.

Já no grupo G5, que compreende EC57, ECXV e EC53 – todas carreadoras de *bla*_{CTX-M} do Grupo 1e *bla*_{TEM}, foi interessante observar que EC57 e ECXV apresentaram 100% de similaridade, mas apenas ECXV apresenta os genes *bla*_{KPC} e *aac*(6')-Ib. Chemelnitsky e colaboradores (2009) encontraram genes *bla*_{KPC} carreados juntamente com *aac*(6')-Ib em um mesmo plasmídeo. Essa pode ser a explicação para EC57 e ECXV apresentarem semelhança no perfil genético, porém diferente combinação de genes de resistência.

No grupo G6, EC42 e EC59 apresentaram *bla*_{TEM} e *aac*(6')-Ib, porém a primeira carrega os genes *bla*_{CTX-M} do Grupo 2 e *qnrB*, enquanto a segunda, *bla*_{CTX-M} do Grupo 1 e *qnrA*.

Em G7 pode-se observar que EC37 e EC39 apresentam diferentes genes de resistência, apesar de terem sido agrupados pelo perfil genético de ERIC-PCR. EC37 carrega apenas *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} do Grupo 2, enquanto EC39 carrega *qnrA* e *aac*(6)-Ib. A presença de genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} em mesmo elementos genéticos é bastante relatada (PEYMANI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014), assim como a mobilização de genes *qnr* e *aac*(6)-Ib por uma mesma cepa bacteriana (AL-MARZOOQ et al., 2014).

A ocorrência de *bla*_{KPC} em apenas uma de duas cepas semelhantes também foi observada em G8. ECIX e EC25, com 100% de similaridade e isoladas no bloco Clínicas SUS e em meses consecutivos (outubro e novembro 2013), apresentaram 2 genes em comum (*bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} do Grupo 2), porém EC25 não apresentou *bla*_{KPC}. Contudo, o gene *aac*(6')-Ib-cr foi detectado em EC25 e EC43, sendo que a primeira também apresentou *qnrA*.

O grupo G9 se destaca por ser o único em que não foi detectado nenhum outro gene *bla* além de *bla*_{KPC} em seus representantes. Ainda, as cepas deste grupo diferem entre si por ECIV apresentar o gene *aac*(6')-Ib. Como observado na tabela 16, ECIV apresenta resistência à ciprofloxacina, provavelmente devido à presença da variante *aac*(6)-Ib-cr, uma vez que ECX é sensível ao mesmo antimicrobiano e não apresentou este gene.

Da mesma forma como em G9, as duas cepas de G10 diferem apenas pela presença de *aac*(6')-Ib-cr, detectado em EC7A, que apresentou resistência à ciprofloxacina e a norfloxacina, diferentemente de ECVIII. Ambas foram isoladas em diferentes UTI, em meses consecutivos, e apresentam o mesmo genótipo de resistência, inclusive com o gene *bla*_{KPC}.

O grupo G11 compreende sete cepas, sendo que quatro (EC48, 51, 55 e 64) apresentam 100% de similaridade. As cepas EC48 e EC51 possuem o mesmo perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e são carreadoras dos mesmos genes de resistência (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} do Grupo 2, *bla*_{OXA-1-like}, *qnrB* e *aac*(6')-Ib). EC48 foi isolada na UTI Geral SUS, enquanto EC51 foi isolada 11 dias após na UTI Geral Convênio, sugerindo a possibilidade de cepa ter sido introduzida nessa UTI através de transmissão horizontal. As cepas EC55 e EC64 diferem

entre si por EC64 apresentar outros genes de resistência (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} do Grupo 2, *bla*_{SHV} e *qnrA*) além de *aac(6')-Ib*, este gene também presente em EC55.

Por fim, em G12 pode-se observar que a única semelhança entre EC32 e ECXIII é a presença de *bla*_{TEM} e *aac(6')-Ib*, uma vez que esta carrega *bla*_{KPC} e *bla*_{CTX-M} do Grupo 1 e aquela apresenta *bla*_{CTX-M-G2} e *qnrA*.

Entre as seis cepas de *E. aerogenes* (fig. 12) um único grupo genético (G1) foi formado, onde EAV, EAVI, EAVII e EAXI apresentaram 100% similaridade. O gene *bla*_{KPC} estavam presentes em todas as cepas de G1, com exceção de EAXI que apresentou *bla*_{TEM} e *bla*_{KPC}.

Somente EA40 não apresentou gene *bla*_{KPC}, porém carregava os genes *qnrS* e *bla*_{CTX-M} do grupo 2. Kanamori e colaboradores (2012) encontraram genes *qnrS* e *bla*_{CTX-M-2} sendo carregados em uma cepa de *Enterobacter aerogenes* proveniente de 10 hospitais de diferentes regiões do Japão.

O grande polimorfismo genético observado entre os isolados do estudo dificultou encontrar uma relação clara na disseminação dos isolados, bem como a presença de clones epidêmicos entre as diferentes unidades de internação. Todos os 12 grupos formados a partir do perfil genético de ERIC-PCR e as demais cepas não agrupadas presentes no atual estudo apresentaram diferentes genótipos de resistência. Portanto, sugere-se que a evolução constante dos elementos genéticos seja a causa da possível transferência horizontal desses genes entre integrons e plasmídeos de resistência (CARATTOLI, et al., 2011; GARCIA, et al., 2007; LIEBANA, et al., 2006).

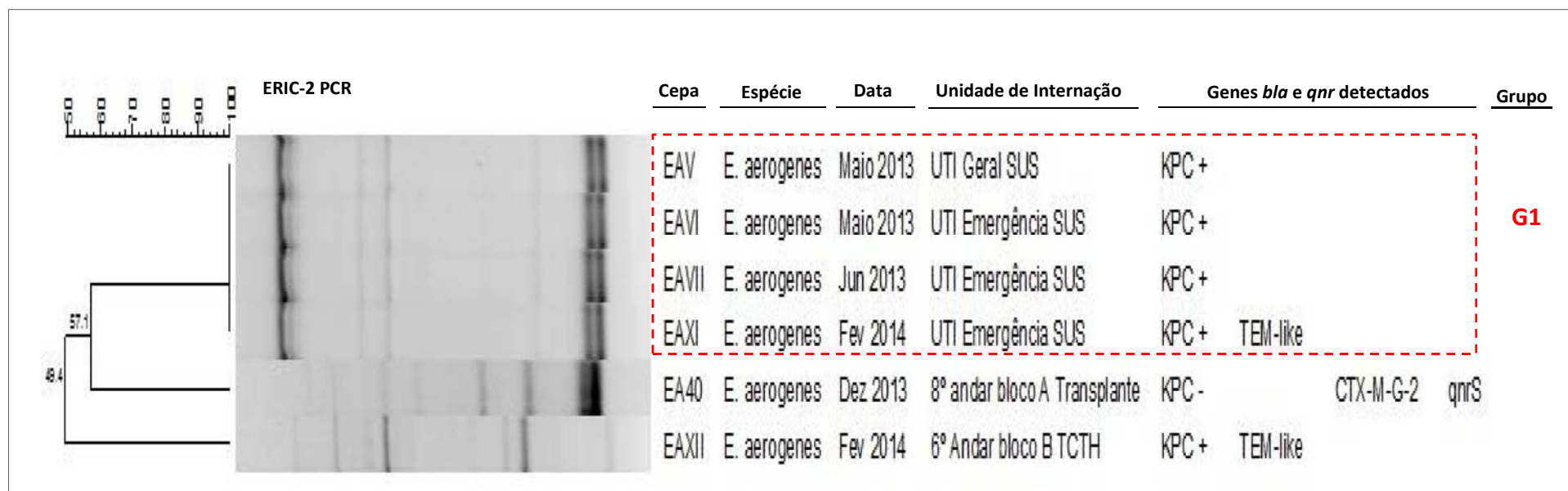


Figura 12 Dendrograma gerado pelo software BioNumerics, ilustrando a relação epidemiológica entre os isolados clínicos (*E. aerogenes*) estudados.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Os isolados clínicos estudados apresentaram altas taxas de resistência às cefalosporinas de terceira e quarta geração, e às quinolonas com altos valores de concentração inibitória mínima se comparado aos carbapenêmicos.
- O gene *bla_{KPC}* é o único determinante da produção de carbapenemases entre os *Enterobacter* spp.
- O gene *bla_{TEM-like}* encontra-se disseminado entre os *Enterobacter* spp, *bla_{SHV-like}* é pouco frequente. O sequenciamento destes genes deverá ser realizado para a identificação da variante e seu espectro de atividade.
- As ESBLs tipo CTX-M são as principais responsáveis pela resistência às cefalosporinas de terceira e quarta geração apresentadas por *Enterobacter* spp.
- Predominam os genes que codificam CTX-M dos grupos -1 e -2, sendo *bla_{CTX-M}* do grupo 1 os mais comuns.
- A ESBL do tipo CTX-M é provavelmente as responsáveis pela grande maioria das resistências às cefalosporinas de terceira e quarta geração apresentadas pelos isolados de *Enterobacter* spp.
- Foi observada alta presença de *bla_{CTX-M}*, pertencentes à apenas dois grupos CTX-M-1 e CTX-M-2.
- Os genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e a variante *aac(6')-Ib-cr* (algumas *Enterobacter* spp) estão amplamente disseminados entre isolados selecionados para o estudo.
- Foram detectados os genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e a variante *aac(6')-Ib-cr* (algumas *Enterobacter* spp) nos isolados selecionados para o estudo.
- Os perfis de ERIC-PCR sugerem uma relação genética entre os isolados estudados, e também a ocorrência de infecção por cepas não relacionadas.

Referências

REFERÊNCIAS

- AL-HASAN, M.N.; ECKEL-PASSOW, J.E.; BADDOUR, L.M. Impact of healthcare-associated acquisition on community-onset Gram-negative bloodstream infection: a population-based study: healthcare-associated Gram-negative BSI. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v.31, n.6, p.1163-1171, June, 2012.
- ALMEIDA, A.C. et al. Carbapenem-resistant *Enterobacter gergoviae* harbouring *bla*_{KPC-2} in Brazil. **Int J Antimicrob Agents.** v.44, n.4, p.369-370, Oct. 2014.
- AL-MARZOOQ, F.; MOHD YUSOF, MY, TAY, ST. Molecular analysis of ciprofloxacin resistance mechanisms in Malaysian ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates and development of mismatch amplification mutation assays (MAMA) for rapid detection of *gyrA* and *parC* mutations. **Biomed Res Int.** p.1-10, Apr. 2014.
- AL MOHAJER, M.; DAROUICHE, R.O. Sepsis syndrome, bloodstream infections, and device-related infections. **Med Clin North Am.** v.96, n.6, p.1203-23, Nov. 2012.
- AMBLER RP. The structure of β -lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** v.289, n. 1036, p.321-331, 1980.
- ANDERSSON, M.I.; MACGOWAN, A.P. Development of the quinolones. **J.Antimicrob Chemother.** v.51, n.1, p. 1-11, May, 2003.
- ANDRADE, S.S. et al. Antimicrobial susceptibility of gram-negative bacilli isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2003-2008). **Braz J Infect Dis.** v. 12, n.2, p.3-9, 2008.
- ANVISA. Nota Técnica Nº 01/2013: Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Online] 17 de Abril de 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/nota17-04-2013.pdf?MOD=AJPERES> >
- AUBRON, C. et al. High level cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae ventilator-associated pneumoniae: prognostic factors based on a cohort study. **J Hosp Infect.** v.77, n.1, p.64-69, Jan. 2011.
- AZUCENA, E.; MOBASHERY, S. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. **Drug Resistance Updates.** v.4, p.106-117, Apr. 2001.
- BABIC, M.; HUJER, A.M.; BONOMO, R.A. What's new in antibiotic resistance? Focus on β -lactamases. **Drug Resist Updat.** v.9, n.3, p.142-56, Jun.2006.
- BAHAR, G. et al. PER-1 production in a urinary isolate of *Providencia rettgeri*. **J Chemother.** v.16, n.4, p.343-346, Aug. 2004.

BALL, P. Quinolone generations: natural history or natural selection? **J Antimicrob Chemother.** v.46, p.17-24, 2000.

BARL, P. et al. Spread of CTX-M-15 positive *Providencia* spp. causing urinary tract infections at the university hospital split in Croatia. **MED Glas Zenica** v.9, n.2, p.317-324, Aug. 2012.

BASSETTI, M. et al. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** v.12, p.12-22, Aug.2013.

BEBRONE, B. et al. GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. **Antimicrob Agents Chemother.** v.57, n.1, p.396-401, Jan. 2013.

BECKER, B.; COOPER, M.A. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. **ACS Chem. Biol.** v.8, n.1, p.105–115, Jan 2013.

BERGEN, P.J.; LI, J.; NATION, R.L. Dosing of colistin – back to basic PK/PD. **Curr Opin Pharmacol.** v.11, n.1, p.464–9, Oct. 2011.

BIENDO, M. et al. Molecular typing and characterization of extended-spectrum TEM, SHV and CTX-M beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. **Rev. Microb.** v. 159, n.9-10, p.590-594, Nov-Dec. 2008.

BLAIR, J.M.A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiol.** p.1-10, Dec. 2014.

BOGAERTS, P. et al. Detection and characterization of VIM-31, a new variant of VIM-2 with Tyr224His and His252Arg mutations, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.6, n.6, p.3283-3287, Jun. 2012.

BOLON, M.K. The never fluoroquinolones. **Med Clin North Am.** v.95, n.5, p.793-817, Jul. 2011.

BONNET, G. et al. A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** v.44, n.11, p.3061-3068, Nov. 2000.

BONNET, R. et al. Novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** v.44, n.7, p.1936-1942, Jul. 2000.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrob Agents Chemother.** v.45, n.1, p.1-14, 2004.

BONNIN, R.A. et al. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.55, n.1, p.349-354, Jan. 2011.

BOWTON, D.L. et al. The impact of hospital-wide use of tarpered-cuff endotracheal tube on the incidence of ventilator-associated pneumonia. **Respir Care**. v.58, n.10, p.1582-1587, Oct. 2013.

BRATU, S. et al. Detection of KPC carbapenem-hidrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. **Antimicrob Agents Chemother**. v.49, n.2, p.776-778, Feb. 2005.

BRIALES, A. et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')-Ib-cr in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. **Int J Antimicrob Agents**. v.39, n.5, p.431-434, May, 2012.

BUSH, K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin Infect Dis**. v.32, n.7, p1085-1089, Apr. 2001

BUSH K.; JACOBY GA.; MEDEIROS A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 39, n.6, p.1211-1233, Jun. 1995.

BUSH K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Curr Opin Microbiol**. v.13, n.5, p.558-564, Oct. 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**. v.54, n. 3, p. 969-976, Mar. 2010.

BUSH, K.; FISHER, J.F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. **Annu Rev Microbiol**. v.65, p. 455-478, Oct. 2011.

CAMPOS, L.C. et al. Outbreak of *Enterobacter hormaechei* septicemia in newborns caused by contaminated parenteral nutrition in Brazil. **J Hosp Infect**. v.66, n.1, p.95-97, May. 2007.

CARATTOLI, A. Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. **Int J Med Microbiol**. v.301, n.8, p.654-658, Dec. 2011.

CARRÉR, A. et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid Turkey and beyond. **Antimicrob Agents Chemother**. v.54, n.3, p.1369-1373, Mar. 2010.

CARVALHAES, C.G. et. al. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemases production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. **J Antimicrob Chemother**. v.65, p.249-251, Fev. 2010.

CARVALHO-ASSEF D'ALINCOURT, A.P. et al. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**. v.58, n.4, p.2475-2476, Apr. 2014.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular characterization of a beta-lactamase gene *bla*GIM-1 encoding a new subclasse of metallo-beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**. v.48, n.12, p.4654-4661, Dec. 2004.

CASTANHEIRA, M. et al. In71, an *Enterobacter cloacae* blaVIM-1-carrying integron related to In70.2 from Italian *Pseudomonas aeruginosa* isolates: a Sentry Antimicrobial Surveillance Program report. **Microb Drug Resist.** v.13, n.2, p.130-134, July 2007.

CATTOIR, V. et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL- Producing enterobacterial isolates. **J Antimicrob Chemother.** v.60, p. 394-397, Aug. 2007.

CAVACO, L.M. et al. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin. **Antimicrob Agents Chemother.** v.53, n.2, p.603-608, Feb. 2009.

CHANG, M.R. et al. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the bla(Kpc) gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.46, n.1 p. Jan./Fev. 2013.

CHEBABO, A. et al. Critérios Diagnósticos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde. Brasília: Anvisa, 2013. Disponível em:<
<http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/images/documentos/livros/Livro2-CriteriosDiagnosticosIRASaude.pdf> > acesso: 16 Jun. 2015.

CHEN, C.H.; HUANG, C.C. Risk factor analysis for extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* bloodstream infections in central Taiwan. **BMC Infect Dis.** v.13, p.1- 6, Set. 2013.

CHEN, L.R. et al. Detection of plasmid-mediated IMP-1 metallo-beta-lactamase and quinolone resistance determinants in an ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* isolate. **J Zhejiang Univ Sci B.** v.10, n.5, p.348-354, May 2009.

CHEN, L.F.; ANDERSON, D.J.; PATERSON, D.L. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. **Infect Drug Resist.** p.133-141, Sep. 2012.

CHEMELNISTSKY, I. et al. Detection of *aac(6')-ib-cr* in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tel Aviv, Israel. **J Antimicrob Chemother.** v.64, n.4, p.718-722, Oct. 2009.

CHOI, S-H. et al. Prevalence, microbiology, and clinical characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, and *Morganella morganii* in Korea. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v.26, n.8, p.557-561, Aug. 2007.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100-S23. CLSI, Wayne, PA, USA, 2013.

COLLIGNON, P. Clinical impact of antimicrobial resistance in humans. **Rev Sci Tech.** v. 31, n.1, p.211-220, Apr. 2012.

CURCIO, D. Multidrug-resistant Gram-negative bacterial Infections: are you ready for the challenge? **Curr Clin Pharmacol.** v.9, n.1, p.27-38, Feb. 2014.

DAI, W. et al. Characterization of carbapenemases, extended spectrum β -lactamases and molecular epidemiology of carbapenems-non-susceptible *Enterobacter cloacae* in a Chinese hospital in Chongqing. **Infec Genet Evol.** v.14, p. 1-7, Mar. 2013.

DALBEN, M. et al. Investigation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit and review of the literature. **J Hosp Infect.** v.70, n.1, p.7-14, Sep. 2008.

DALHOFF, A. Resistance surveillance studies: a multifaceted problem-the fluoroquinolone example. **Infection.** v.40, n.3, p.239-262, Jun. 2012.

DALLENNE, C. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother.** v.65, p.490-495, Mar. 2010.

DELMAS, J. et al. Rapid identification of Enterobacteriaceae by sequencing DNA gyrase subunit B encoding gene. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.55, n.4, p.263-268, Aug. 2006.

DEMIR, T. et al. Pneumonias due to *Enterobacter cancerogenus* infection. **Folia Microbiol.** v.59, n.6, p.527-530, Nov. 2014.

DIAHMI, N. et al. Epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. **Biomed Res Int.** p, 3057-3084, May 2014.

DIAZ, J. et al. Diversity of *Escherichia coli* strains producing Extended-Spectrum- β -Lactamases in Spain: second nationwide study. **J Clin Microbiol.** v.48, n.8, p.2840-2845, Aug. 2010.

DOAN, T.L. et al. Tigecycline: a glycylcycline antimicrobial agent. **Clin Ther.** v.28, n.8, p.1079-106, Aug. 2006.

DOTIS, J. et al. Urinary tract infections caused by extended-spectrum betalactamase-producing bacteria in children: a matched case control study. **Turk J Pediatr.** v.55, n.6, p.571-574, Nov-Dec. 2013.

DOUMITH, M. et al. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp clinical isolates from the UK. **J Antimicrob Chemother.** v.63, n.4, p.659-667, Apr. 2009.

DOYLE, D. et al. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. **J Clin Microbiol.** v.50, n.12, p.3877-3880, Dec. 2012.

DRAWZ, S.M; BONOMO, R.A. Three decades of beta-lactamases inhibitors. **ClinMicrobiol Rev.** v.23, n.1 p.160-201, Jan. 2010.

DRLICA, K. et al. Quinolone-mediated bacterial death. **Antimicrob Agents Chemother.** v.52, n.2, p.385-392, Feb. 2008.

EDELSTEIN, M. et al. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. **Antimicrob Agents Chemother.** v.47, n.12, p.3724-3732, Dec. 2003.

EL-AGGERY, S.M.; AL-HAZMI, S.S. Microbiological and molecular detection of VIM-1 metallo beta lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** v.18, n.7, p.965-970, 2014.

EMMERSON, A.M.; JONES, A.M. The quinolone: decades of development and use. **J Antimicrob Chemother.** v.51, p.13-20, May 2003.

FALCONER, S.B.; CZARNY, L.T.; BROWN, E.D. Antibiotics as probes of biological complexity. **Nat Chem Biol.** v.7, n.7, p.415-423, Jul. 2011.

FEHLBERG, L.C. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. **Braz J Infect Dis.** v.16, n.6, p.577-580, Nov-Dec. 2012.

FEHLBERG, L.C. et al. Detection of PER-2-Production *Enterobacter cloacae* in a brazilian liver transplantation unit. **Antimicrob Agents Chemother.** v.58, n.3, p.1831-1832, Mar. 2014.

GARCIA, A. et al. Acquisition and diffusion of *bla*CTX-M-9 gene by R478-IncH12 derivatide plasmids. **FEMS Microbiol.** v.271, n.1, p.71-77, Jun. 2007.

GARAZZINO, S. et al., Osteomyelitis caused by *Enterobacter cancerogenus* infection following a traumatic injury: case report and review of the literature. **J Clin Microbiol.** v.43, n.3, p.1459-1461, Mar. 2005.

GARNER, J.R. et al. CDC definitions for nosocomial infections. **Am J Infect Control.** v.16, p.128-140, Jun. 1998.

GIAKOUPI, P. et al. The Greek System for the Surveillance of Antimicrobial Resistance. KPC-2- producing *Klebsiella pneumonia* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyperepidemic clone. **Euro Surveill.** v.14, n.21, p.1-5, May. 2009.

GLATZ, K.; TÓTH, A. PÁSZTI, J. The cyclohexane tolerance and Phe-Arg- β -naphthylamide susceptibility of multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* clinical isolates, and the predominance of one PFGE clone in Hungary. **Clin Microbiol Infect.** v.17, n.8, p.1254-1261, Aug. 2011.

GUPTA, V. An update on newer beta-lactamases. **Indian J Med Res.** v.126, n.5, p.417-427, Nov. 2007.

HAMPRECHET, A. et al. Detection of the carbapenemase GIM-1 in *Enterobacter cloacae* in Germany. **J Antimicrob Chemother.** v. 68, n.3, p.558-561, Mar. 2013.

HARRIS, P.N.A; FERGUSON, J.K. Antibiotic therapy for inducible Amp-C β -lactamase-producing gram-negative bacilli: what are the alternatives to carbapenems, quinolones and aminoglycosides? **Int J Antimicrob Agents**. v.40, p.295-305, Oct. 2012.

HATA, M. et al. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. **Antimicrob Agents Chemother**. v.49, n.2, p.801-803, Feb. 2005.

HAWKEY, P.M. Mechanisms of quinolone action and microbiol response. **J Antimicrob Chemother**. v.51, Suppl. S1, p.29-35, May. 2003.

HENNIGS, J.K.. et al. Characterization of *Enterobacter cloacae* pneumonia: a single-center retrospective analysis. **Lung**. v.189, n.6, p.475-483, Dec. 2011.

HIDRON, A.I. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2006-2007. **Infect Control Hosp Epidemiol**. v. 29, n.11, p. 996-1011, Nov. 2008.

HILTY, M. et al. Characterization and clinical features of *Enterobacter cloacae* bloodstream infections occurring at a tertiary care university hospital in Switzerland: is cefepime adequate therapy? **Int J Antimicrob Agents**. v.41, p.236-249, Mar. 2013.

HO, T.S. et al. Long-term characteristics of healthcare-associated infections in a neonatal intensive care unit. **J Microbiol Immunol Infect**. v.43, n.5, p.407-415, Oct. 2010.

HOFFMANN, H; ROGGENKAMP, A. Population genetics of the nomenclotype *Enterobacter cloacae*. **Appl Environ Microbiol**. v.69, n.9, p.5306-18, Sep. 2003.

HOPKINS, K. L. et al. Identification of novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-57 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Int J Antimicrob Agents**. v.31, n.1, p.85-86, Jan. 2008.

IRENGE, L.M. et al. Antimicrobial resistance in urinary isolates from inpatients and outpatients at a tertiary care hospital in South-Kivu Province (Democratic Republic of Congo). **BMC Research Notes**. v.374, n.7, p.1-6, Jun. 2014.

IVERSEN, C. et al. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazaki* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp.nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *Lactaridi*. **Int JSyst Evol Microbiol**. v.58, p.1442-47, Jun. 2008.

JACOBY, G.A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clin Infect Dis**. v.41, Supl 2, n. S120-S126, Jul. 2005b.

JACOBY, G.A.; BUSH, K. β -Lactamase nomenclature. **J Clin Microbiol**. v.43, n.12, p. 6220, Dec. 2005a.

JACOBY, G.A.; BUSH, K. β -Lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. Disponível em: < <http://www.lahey.org/studies/> > Acesso em: 18 abril 2015.

JASKULSKI, M.R. et al. Assessment of extended-spectrum β -lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance, mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. **Int J Antimicrob Agents**. n.42, p. 76-79, Jul. 2013.

JIANG, X. et al. Outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3 beta-lactamase in China. **J Clin Microbiol**. v.43, p.826-831, Fev. 2005.

KESIEME, E.B. et al. Tension Pneumatocoele due to *Enterobacter gergoviae* Pneumonia: A case Report. **Case Rep Med**. p. 1-3, Sep. 2012.

KHAJURA, A. et al. First report of and *Enterobacter ludwigii* isolate coharboring NDM-1 and OXA-48 carbapenemases. **Antimicrob Agents Chemother**. v.57, n.10, p.5189-5190, Oct. 2013.

KHAJURIA, A. et al. Carbapenem resistance among *Enterobacter* species in a tertiary care hospital in central India. **Chemother Res Pract**. p.1-6, Aug. 2014.

KANAMORI, H. et al. Molecular characteristics of Extended-Spectrum beta-lactamases and *qnr* determinants in *Enterobacter* species from Japan. **PLoS One**. v.7, n.6, p.1-5, Jun. 2012.

KANIGA, K. et al. Worldwide experience with the use of doripenem against extended-spectrum- β -lactamase-producing and ciprofloxacin-resistant Enterobacteriaceae: analysis of six phase 3 clinical studies. **Antimicrob Agents Chemother**. v.54, n.5, p.2119-2124, May. 2010.

KIM, H.B. et al. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**. v.53, n.8, p.3582-3584, Aug. 2009.

KNOTHE, H. et al. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitina, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Clin Infect Dis**. v.11, n.6, p.315-317, Nov-Dec. 1983.

KOHANSKI, M.A., DWYER, D.J.; COLLINS, J.J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nat Rev Microbiol**. v.8, n.6, p.423-435, Jun. 2010.

KUAI, S. et al. KPC-2 carbapenemase and DHA-1 AmpC determinants carried on the same plasmid in *Enterobacter aerogenes*. **Med. Microbiol**. v.63, n.3, p.367-370, Mar. 2014.

LAMOUREAUX, T.L. et al. Antibiotic resistance and substrate profiles of the class A carbapenemase KPC-6. **Antimicrob Agents Chemother**. v.56, n.11, p.6006-6008, Nov. 2012.

LANGE, D. et al. Bacterial sepsis after prostate biopsy: a new perspective. **Urology**. v.74, n.6, p.1200-1205, Dec. 2009.

LAURETTI, L. et al. Cloning and characterization of *bla*VIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother.** v.43, n.7, p.1584-1590, Jul. 1999.

LAVIGNE, J-P. et al. An adaptive response of *Enterobacter aerogenes* to imipenem: regulation of porin balance in clinical isolates. **Int J Antimicrob Agents.** v.43, p.130-136, Feb. 2013.

LEE, M.K.; KANATANI, M.S. Quinolones: which generation for which microbe? **West J Med.** v.170, n.6, p.359-361, Jun. 1999.

LEE, M.; CHUNG, H.S. Different antimicrobial susceptibility testing methods to detect ertapenem resistance in Enterobacteriaceae: VITEK2, MicroScan, Etest, disk diffusion, and broth microdilution. **J Microbiol Methods.** v.112, p.87-91, May. 2015.

LEE, K.. et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla*(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrob Agents Chemother.** v.49, n.11, p.4485-4491, Nov. 2005.

LEVI, S.B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nat. Med.** v.10, n12, p.S122-129, Dec. 2004.

LIEBANA, E. et al. Longitudinal farm study of extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance. **J Clin Microbiol.** v.33, n.11, p. 1611-13, May. 2006.

LI, X.Z.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. **Drugs.** v.69, n.12, p.1555-1623, Aug. 2009.

LIU, W.Y. et al. Comparative genome analysis of *Enterobacter cloacae*. **PLoS One.** v.8, n.9, p.1-14, Sep. 2013.

LIVEMORE, D.M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Rev.** v.8, n.4, p. 557-584, Oct. 1995.

LONGHI, C. et al. Plasmid-mediated fluoroquinolones resistance determinants in *Escherichia coli* from community uncomplicated urinary tract infection in an area of high prevalence of quinolone resistance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v.31, n.8, p.1917-1921, Aug.2012.

LPSN-List of prokaryotic names with standing in nomenclature – genus *Enterobacter* Disponível em: < www.bacterio.cict.fr/e/enterobacter.html. > Acesso em: 21/06/2015.

LYTSY, B. et al. The first major extended-spectrum beta-lactamase outbreak in Scandinavia was caused by clonal spread of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* CTX-M-15. **APMIS** v.114, n.4, p.302-308, Apr. 2008.

MACHADO, E.; COQUE, T.M.; CANTÓN, R. et. al. Portuguese resistance study group. High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal. **J Antimicrob Chemother.** v. 60, n. 6, p. 1370-4, 2007.

MAGIORAKOS, A.P. et al. Multidrug-resistance, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect.** v.18, n.3, p.268-271, Mar. 2012.

MARCHAIM, D. et al. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology and outcomes. **Antimicrob Agents Chemother.** v.52, n.9, p. 1413-1418, Apr. 2008.

MARCOS, M. et al. Effect of antimicrobial therapy on mortality in 377 episodes of *Enterobacter* spp. bacteremia. **J Antimicrob Chemother.** v.62, p.397-403, Aug. 2008.

MARRA, A.R. et al. Nosocomial bloodstream infections in brazilian hospital: analysis of 2563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **J Clin Microbiol.** v.49, n.5, p.1866-1871, May 2011.

MARTIN, S.J.; YOST. R.J. Infectious Diseases in the Critically ill Patients. **J Pharm Pract.** v.24, n.1, p.35-43, Feb. 2011.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; CALVO, J. The growing problem of antibiotic resistance in clinically relevant Gram-negative bacteria: current situation. **Enferm Infecc Microbiol.** v.28, n.2, p.25-31, Sep. 2010.

McGETTIGAN, E.S.; ANDREACCHIO, K.; EDELSTEIN, P.H. Specificity of ertapenem susceptibility screening for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **J Clin Microbiol.** v.47, n.3, p.785-786, Mar. 2009.

MEZZATESTA, M.L.; GONA, F.; STEFANI, S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. **Future Microbiol.** v.7, n.7, p.887-902, Jul. 2012.

MUNOZ-PRICE, L.S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infect Dis.** v.13, n.9, p.785-796, Sep. 2013.

NAAS, T.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Minor, extended-spectrum beta-lactamases. **Clin Microbiol Infect.** v.14, Suppl 1, p.42-52, May 2008b.

NAAS. T. et al. Genetic Structures at the Origen of Acquisition of the Lactamase *bla_{KPC}* Gene. **Antimicrob Agents Chemother.** v.52, n.4, p.1257-1263, Apr. 2008a.

NAMDARI, H; TAN, T.Y; DOWZICKY, M.J. Activity of tigecycline and comparators against skin and skin structure pathogens: global results of the tigecycline evaluation and surveillance trial, 2004-2009. **Int J Infect Dis.** v.16, n.1, p.60-66, Jan. 2012.

NHUNG, P.H. et al. Phylogeny and species identification of the family *Enterobacteraceae* based on *dnaJ* sequences. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.58, n.2, p153-161, Jun. 2007.

NOGUEIRA, K.da S. et. al. Emergence of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in Southern Brazil. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** v.32, n.2, p. 87-92, Feb. 2014.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T.. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v.9, n.4, p.228–36, Apr. 2009.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases-producing bacteria. **Clin Microbiol Infect**. v. 8, n.6, p.321-331, Jun. 2002.

NORDMANN, P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. **Med Mal Infect**. v.44, n.2, p. 51-56, Feb. 2014.

NOVAK, A. et al. Monoclonal outbreak of VIM-1-carbapenemase producing *Enterobacter cloacae* in intensive care unit, University Hospital Centre Split, Croatia. **Microb Drug Resist**. v.20, n.5, p.399-403, Oct. 2014.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organism. **J Clin Microbiol**. v.37, n.6, p.1661-1669, Jun. 1999.

OSANO, E. et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrob Agents Chemother**. v.38, n.1, p.71-78, Jan. 1994.

PAGÈS, J.M.; AMARAL, L.; FANNING, S. An original deal for new molecule: reversal of efflux pump activity, a rational strategy to combat gram-negative resistant bacteria. **Curr Med Chem**. v.18, n.19, p.2969-2980, 2011.

PAIVA, M.C. et al. The first report of the *qnrB19*, *qnrS1* and *aac(6')-Ib-cr* genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** v.107, n.5, p.687-689, Aug. 2012.

PANIAGUA, R. et al. Assessment of prevalence and changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae fecal carriers using a chromogenic medium. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v.67, n.4, p.376-379, Aug. 2010.

PAPP-WALLACE, K.M. et al. Inhibitor resistance in the KPC-2 beta-lactamase, a preeminent property of this class A beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**. v.54, n.2, p.890-897, Feb. 2010.

PARK, C.H. et al. Prevalence in the United States of *aac(6')-ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. **Antimicrob Agents Chemother**. v.50, n. 11, p. 3953-3955, Nov. 2006.

PASTERNAK, J. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. **Einstein (São Paulo)**. v.10, n.1, p. 118-119, Jan-Mar. 2012.

PATERSON, D.L.; BONOMO, R.A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clin Microbiol Rev**. v.18, n.4, p. 657-86, Oct. 2005.

PAVLOVIK, M. et al. Dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. **FEMS Microbiol Lett**. v.328, n.1, p. 46-53, Mar. 2012.

- PEIRANO, G. et al. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. **Clin Microbiol Infect.** v.17, p.1039-43, Jul. 2011.
- PENA, I. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. **J Antimicrob Chemother.** v. 43, p. 460-464, May 2014.
- PÉREZ-LOSADA, M. et al. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. **Infect Gene Evol.** v.16, p.38-53, June 2013.
- PÉRICHON, B.; COURVALIN, P.; GALIMAND, M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.51, n.7, p.2464-2469, Jul. 2007.
- PEYMANI, A. et al. Emergence of TEM, SHV, and CTX-M-extended spectrum β -lactamases and class 1 integron among *Enterobacter cloacae* isolates collected from hospitals of Tehran and Qazvin, Iran. **Microbiol Drug Resistance** v.20, n.5, p. 424-430, Oct. 2014.
- PFALLER, M.A. et al. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. **Clin Infect Dis.** v.32, n.2, p.156-167, May 2001.
- PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in gram-negative bacterial pathogens. **Int. J. Med. Microbiol.** v.300, n.6, p.371-379, Aug. 2010.
- PICÃO, R.C. et al. Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** v.53, n.9, p.3908-3913, Sep. 2009.
- PICÃO, R.C. et al. Detection of GES-5 producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **J. Antimicrob Chemother.** v.65, p.796-797, Apr. 2010.
- PINTADO, V. et al. Intravenous colistin sulphomethane sodium for therapy of infections due to multidrug-resistant gram-negative bacteria. **J Infect.** v.56, n.3, p. 185-190, Mar. 2008.
- POIREL, L. et al. Multidrug resistant *Providencia stuartii* expressing extended-spectrum beta-lactamase PER-1 originating in Kosovo. **J Antimicrob Chemother.** v.61, p.1392-1393, Jun. 2008.
- POIREL, L. et al. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. **Antimicrob Agents Chemother.** v.43, p.573-81, Mar. 1999.
- POIREL, L.; PITOUT, J.D.; NORDMANN, P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiol.** v.2, n.5, p.501-512, Oct. 2007.

POIREL, L. et al. VIM-5 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida* from Turkey. **Int J Antimicrob Agents**. v.33, n.3, p.287, Mar. 2009.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**. v.54, n.1, p.24-38, Jan. 2010.

POIREL, L.; CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Plamid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. **Front Microbiol**. v.3, n.24, p.1-7, Fev. 2012.

POLOTTO, M. et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring *bla*CTX-M-2, *bla*GES-1 and *bla*GES-5, *bla*IMP-1 and *bla*SPM-1 causing Infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC Infect Dis**. v.176, n.12, p.1-8, Aug. 2012.

PONTES, D.S. et al. Phenotypic and genetic analysis of *Enterobacter spp.* from a brazilian oligotrophic freshwater lake. **Can J Microbiol**. v.54, n.8, p.983-991, Aug. 2007.

QIN, X. et al. Hospital clonal dissemination of *Enterobacter aerogenes* producing carbapenemase KPC-2 in a Chinese teaching hospital. **J Med Microbiol**. v.63, n.2, p.222-228, Feb. 2014.

QUEENAM, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: The Versatile β -Lactamases. **Clin Microbiol Rev**. v.20, n.3, p. 440-458, Jul. 2007.

QURESHI, Z.A. et al. Risk factors and outcome of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* bloodstream infections. **Int J Antimicrob Agents**. v.37, n.1, p.26-32, Jan. 2011.

RAMAZANZADEH, R.; CHITSAZ, M.; BAHMANI, N. Prevalence and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in intensive care units of Sanandaj general hospitals (Kurdistan, Iran). **Chemotherapy**. v.55, n.4, p.287-292, June 2009.

RAMIREZ, M.S.; NIKOLAIDIS, N.; TOLMASKY, M.E. Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the *aac*(6')-Ib paradigm. **Front Microbiol**. v.4, p.1-13, May 2013.

REDGRAVE, L.S. et al. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Trends Microbiol**. v.22, n.8, p.887-893, Aug. 2012.

RIBEIRO, V.B. et. al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. **J Med Microbiol**. v.62, p.1721-1727, Nov. 2013.

RICHTER, S.S. et al. Identification of *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v.32, n.12, p.1571-78, Dec. 2013.

ROBICSEK, A. et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. **Nat Med**. v.12, n.1, p.83-88, Jan. 2006a.

ROBICSEK, A. et al. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. **Antimicrob Agents Chemother.** v.50, n.8, p.2872-74, Aug. 2006b.

ROCHA, L.A. et al. Ventilator-associated pneumonia in adult clinical-surgical intensive care unit of a Brazilian university hospital: incidence, risk factors, etiology, and antibiotic resistance. **Braz J Infect Dis.** v.12, n.1, p. 80-85, Feb. 2008.

RODRIGUES, C. et al. Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized: A successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIIK). **Int J Med Microbiol.** v.304, n.8, p.1100-1108, Nov. 2014.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J.M. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. **J Infect Chemother.** v.17, n.2, p.149-182, Apr. 2011.

ROSSI, F; ANDREAZZI, D.B. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma.** São Paulo: Atheneu, p. 96, 2005.

ROZALES, F.P. et al. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. **Int J Infect Dis.** v.25, p.79-81, Aug. 2014.

RUIZ, J.; PONS, M.J.; GOMES, C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. **Int J. Antimicrob Agents.** v.40, n.3, p.196-203, Sep. 2012.

SADER, H.S.; HOLLIS, R.J.; PFALLER, M.A. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. **Clin Lab Med.** v.15, n.2, p.407-431, Jun. 1995.

SADER, H.S. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized with pneumoniae in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012. **Int J Antimicrob Agents.** v.43, n.4, p.328-334, Apr. 2014.

SALABI, A.E. et al. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrob Agents Chemother.** v.54, n.1, p.582, Jan. 2010.

SALLEM, R.B. et al. First detection of CTX-M-1, CMY-2, and QnrB19 resistance mechanisms in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy pets in Tunisia. **Vector Borne Zoonotic Dis.** v.13, n.2, p.98-102, Feb. 2013.

SAMPAIO, J.L. et al. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D β -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 58, n.6, p.3566-3567, Jun. 2014.

SATLIN, M.J. et al. Septic Shock Caused by *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Enterobacter gergoviae* in Neutropenic Patient with leukemia. **J Clin Microbiol.** v.51, n.8, p.2794-2796, Aug. 2013.

SANDIUMENGE, A.; RELLO, J. Ventilator-associated pneumonia caused by ESKAPE organisms: cause, clinical features, and management. **Curr Opin Pulm Med.** v.18, n.3, p. 187-193, May 2012.

SCHULTSZ, C.; GEERLINGS, S. Plasmid-mediated resistance in Enterobacteriaceae: changing landscape and implications for therapy. **Drugs**. v.72, n.1, p.1-16, Jan. 2012.

SEKIGUCHI, J. et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother**. v.52, n.11, p.4194-4197, Nov. 2008.

SEKI, L.M. et al. Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. **Braz J Infect Dis**. v.17, n.6, p. 640-646, Nov-Dec. 2013.

SILBERT, S. et al. Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v.47, n.4, p.847-851, Dec. 2003.

SILBERT, S. et al. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. **Infect Control Hosp Epidemiol**. v.25, n.10, p. 847-851, Oct. 2004.

SILVA-SANCHEZ, J. et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae causing nosocomial infections in Mexico. A retrospective and multicenter study. **Arch Med Res**. v.42, n.2, p.156-162, Feb. 2011.

SINGH, A. et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clin Microbiol Rev**. v.19, n.3, p.512-530, Jul. 2006.

SONG, W. et al. Chromosome-encoded AmpC and CTX-M extended-spectrum β -lactamases in clinical of *Proteus Mirabilis* from Korea. **Antimicrob Agents Chemother**. v.55, n.4, p.1414-1419, Apr. 2011.

STEIN, G.E.; BABINCHAK, T. Tigecycline: an update. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 75, n.4, p.331-336, Apr. 2013.

STRAHILEVITZ, J. et al. Changes in *qnr* Prevalence and Fluorquinolones Resistance in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. Collected from 1990 to 2005. **Antimicrob Agents Chemother**. v.51, n.8, p.3001-3003, Aug. 2007.

STREIT, J. et al. Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (North America, 2001). **Int J Antimicrob Agents**. v.24, n.2, p. 111-118, Aug. 2004.

STUMPF, A.N.; ROGGENKAMP, A.; HOFFMANN, H. Specificity of enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction for the detection of clonality within the *Enterobacter cloacae* complex. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v.53, n.1, p. 9-16, Sep. 2005.

SU, P.A. et al. Screening extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* using antibiogram-based methods. **J Microbiol Immunol Infect**. v.43, n.1, p.26-34, Feb. 2010.

SUÁREZ, C; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** v. 27, n.2, p.116-129, Feb. 2009.

SZABÓ, D. et al. Outer membrane protein changes and efflux pump express on together may confer resistance to ertapenem in *Enterobacter cloacae*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.50, n.8, p. 2833-2835, Aug. 2006.

TEJERINA, E. et al. Incidence, risk factors, and outcome of ventilator-associated pneumonia. **J Crit Care** v.21, n.1, p.56-65, Mar. 2006.

TENOVER, F.C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol.** v.33, n.9, p.2233-2239, Sep. 2001.

TOLEDO, P.V. et al. Surveillance programme for multidrug-resistant bacteria in healthcare-associated infections: an urban perspective in South Brazil. **J Hosp Infect.** v.80, n.4, p.351-355, Apr. 2012.

TOLEMAN, M.A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Antimicrob Chemother.** v.55, n.5, p.673-679, Nov. 2002.

TOLEMAM, M.A.; BENNETT, P.; WALSH, T.R. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? **Microbiol Mol Bil Rev.** v.70, n.2, p.296-316, Jun. 2006.

TOLENTINO, F. M. et al. High prevalence of *bla*_{CTX-M} extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-31}, *bla*_{SHV-38}, and *bla*_{CTX-M-15} in Brazil. **Microbiol Drug Resistance** v.17, n.1, p.7-16, Mar. 2011.

TUON, F.F. et al. KPC-producing *Enterobacter aerogenes* infection. **Braz J Infec Dis.** v.19, n.3, p. 324-327, Jun. 2015.

VAARA, M. Novel derivatides of polymyxins. **J. Antimicrob Chemother.** v.68, n.6, p. 1213-1219, Jun. 2013.

VAN BAMBEKE, F. et. al. Quinolones in 2005: an update. **Clin Microbiol Infect.** v.11, n.6, p.256-280, Apr. 2005.

VAN DUIN, D. et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.75, n.2, p.115-120, Feb. 2013.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.** v.19, n.24, p.6823-6831, Dec. 1991.

VIANA, A.L.M. et al. Extended-spectrum β -lactamase in Enterobacteriaceae isolated in Brazil carry distinct types of plasmid-mediated quinolone resistance genes. **J Med Microbiol.** v.62, p.1326-1331, Jun. 2013.

VOURLI, S. et al. Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. **FEMS Microbiol Lett.** v.234, n.2, p.209-213, May 2004.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. Class A carbapenemases. **J Antimicrob Chemother.** v.60, n.3, p.470-482, Sep. 2007.

WANG, M. et al. SOS regulation of qnrB expression. **Antimicrob Agents Chemother.** v.53, n.2, p.821-823, Feb. 2009a.

WANG, M. et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. **Antimicrob Agents Chemother.** v.53, n.5, p.1892-1897, May 2009b.

WANG, X. et al. Novel NDM-9 metallo- β -lactamase identified from a ST107 *Klebsiella pneumoniae* strain isolated in China. **Int J Antimicrob Agents.** v.44, n.1, p.90-91, Jul. 2014.

WEESE, J.S. Investigation of *Enterobacter cloacae* infections at as small animal veterinary teaching hospital. **Vet Microbiol.** v.130, n.3, p. 426-428, Aug. 2008.

WINN, W. Jr. et al. **Koneman Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.262, 2010.

YAHAV, D. et al. Colistin: new lessons on an old antibiotic. **Clin Microbiol Infect.** v.18, p.18–29, Jan. 2011.

YAMANE, K.; WACHINO, J.; SUZUKI, S.; KIMURA, N. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an Escherichia coli clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother.** v.51, n.9, p.3354-3360, 2007.

YE, Y. et al. Enterobacter bacteremia: clinical features, risk factors for multiresistance and mortality in a chinese university hospital. **Infection.** v.34, n.5, p. 252-257, Oct. 2006.

YONG, D. et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother.** v.53, n.12, p.5046-5054, Dec. 2009.

ZAVASCKI, A.P. et al. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **Int J Antimicrob Agents.** v.34, n.3, p.286-288, Sep. 2009.

ZHANG, S. et al. Prevalence and plasmid characterization of the *qnrD* determinant in Enterobacteriaceae isolated from animals. Retail meat products, and humans. **Microb Drug Resist.** v.19, n.4, p.331-335, Aug. 2013.

ZHAO, X. et. al. Decreased quinolone susceptibility in high percentage of *Enterobacter cloacae* isolates caused only by Qnr determinants. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.67, n.1, p. 110-113, May 2010.

Anexo I

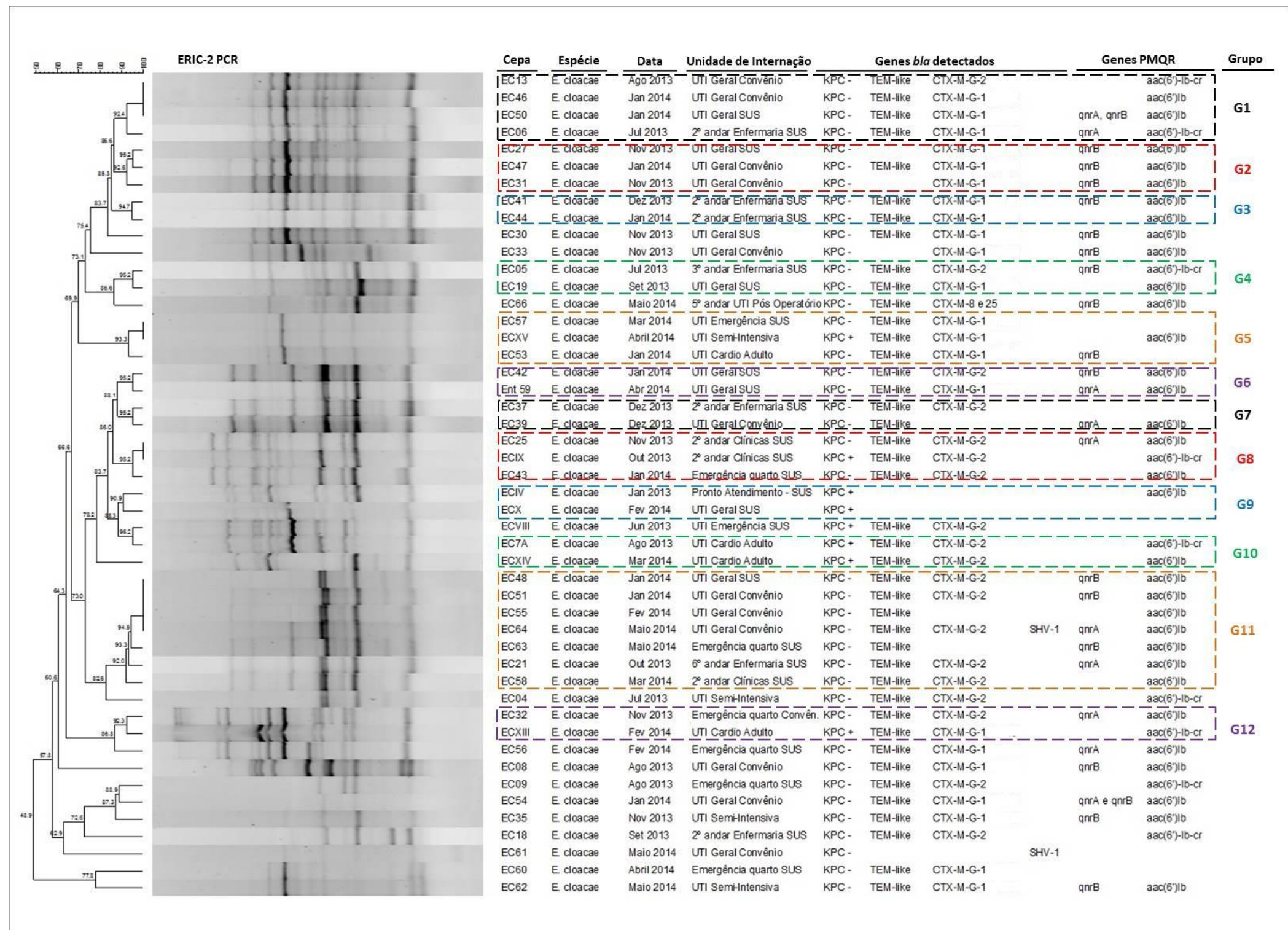


Figura 11. Dendrograma gerado pelo software BioNumerics, ilustrando a relação epidemiológica entre os isolados clínicos de *Enterobacter cloacae* estudados.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura