**Disseminação da resistência a antimicrobianos em
cepas clínicas e ambientais de *Enterobacteriaceae*:
identificação e mapeamento do ambiente genético de
genes codificadores de ESBL.**

Milena Dropa

**Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Saúde
Pública da Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São
Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências.**

**Área de concentração: Serviços
de Saúde Pública.**

**Orientação: Prof^a. Associada
Maria Helena Matté.**

**São Paulo
2012**

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese

.

DEDICATÓRIA

À minha família, mais uma vez, Paizinho, Ligia, Mãezinha, Nina, Mô, Frê e Lucca,
sem vocês nada disso faria sentido.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, pela minha saúde, e por toda a proteção e luz em meu caminho.

À minha família...

Ao meu pai, por me ensinar que eu sempre posso, e que conhecimento não se perde, e à Ligia, essa alma maravilhosa que eu admiro demais...

À minha mãe, pela minha vida e pelo orgulho que sente das minhas conquistas...

À minha irmã Marina (Bã!), a quem eu sempre tentei ensinar e sempre acabei aprendendo algo...

À minha irmã Mônica e meu irmão de coração Frê, apenas agradecer nunca será suficiente...

Ao meu sobrinho Lucca, essa alma especial que aos 4 anos já me ensina lições que eu ainda não havia aprendido...

Ao King, meu filhote de quatro patas, por esses oito anos de amor incondicional... *“Seja a pessoa que seu cão pensa que você é!”*

A toda minha família, por não entender muito bem o que eu faço, e mesmo assim se orgulharem das minhas conquistas...

Obrigada! Amo todos vocês!!!

À professora Maria Helena Matté, pela orientação e por acreditar neste tema e em mais este projeto, muito obrigada!

Ao professor Glavur Rogério Matté, pelo apoio e suporte durante este trabalho, e por apostar em minha carreira.

Ao professor Nilton Lincopan, por toda colaboração e apoio intelectual desde o primeiro contato durante meu mestrado até hoje, e pela participação na avaliação desta tese.

Às professoras Maria Inês Sato, Maria Tereza Pepe Razzolini e Ana Cristina Gales, por doarem seu tempo para participar da avaliação deste trabalho.

Aos queridos estagiários Flávia Nacache e Rafael Arrabaça de Carvalho, e aprimorandas Bruna Aguiar e Ana Paula Amaral, pela ajuda essencial na reta final deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Prática de Saúde Pública, e a todos os aprimorandos e estagiários que colaboraram de alguma forma com a realização deste projeto desde 2009, muito obrigada!

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento dos dois projetos regulares que possibilitaram a realização deste trabalho (Processos Fapesp 2008/08312-3 e 2010/12841-1).

Às minhas amigas...

Regina, minha irmã de coração, tão longe e tão perto, sempre torcendo pelo meu sucesso!

Livia, minha pequena grande pessoa, obrigada por me ajudar neste trabalho, você é uma parceira incrível, pesquisadora da qual eu me orgulho sempre, e de quebra ainda me empresta sua família quando a minha não está por perto!

Ronalda, companheira pra todas as horas, tem o dom de falar sem ofender, de fazer rir, de deixar os momentos sempre mais alegres, de cuidar, obrigada pela sua amizade, admiro você demais!

Martha, minha amiga corajosa, por todos os momentos que se fez presente, mesmo estando tão longe, você faz muita falta nos meus cafês e na minha vida!

Danielle (DanE!), por toda ajuda durante este projeto, pelo companheirismo e amizade dentro e fora do laboratório, e por estar sempre por perto!

Marina, por toda ajuda no laboratório, por se interessar pelo meu projeto, e pelas conversas distraídas e divertidas que sempre me fazem rir muito!

Bruna, por todos os PCRs e géis, pela dedicação e cuidado com o meu trabalho, e pela amizade e confiança, admiro muito sua personalidade e sua alma generosa!

Renata Leal, minha professora e amiga, obrigada por todas as conversas divertidas e pelos alongamentos e fisioterapias pra que eu pudesse continuar este trabalho maltratando menos minha postura!

Cybele, minha amiga da porta ao lado, por todas as conversas e principalmente pelo cuidado que tem comigo!

E a todos os meus amigos que estiveram por perto durante esses quatro anos, me apoiando e encorajando, e principalmente se orgulhando de mim!

Muito obrigada!!!

EPÍGRAFE

“Toda célula viva carrega consigo a experiência de um bilhão de anos de experimentações por seus ancestrais.”

(Max Delbrück)

RESUMO

Dropa M. Disseminação da Resistência a Antimicrobianos em Cepas Clínicas e Ambientais de *Enterobacteriaceae*: Identificação e Mapeamento do Ambiente Genético de Genes Codificadores de ESBL [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2012.

Introdução. A resistência bacteriana é facilitada pela pressão seletiva do uso de antimicrobianos na clínica e em outras atividades, como a agricultura e pecuária, além de poder ser disseminada para a natureza por meio do lançamento inadequado do esgoto ou pela aplicação do lodo de esgoto na agricultura. As β -lactamases de espectro estendido (ESBL) são uma das formas mais prevalentes de resistência em Gram negativos no mundo, e seus genes codificadores são disseminados por meio de diversos elementos genéticos, principalmente transposons e integrons mobilizados para plasmídios. **Objetivo.** Identificar e caracterizar genes codificadores de ESBL, bem como suas prováveis formas de mobilização, em enterobactérias isoladas de fontes ambientais e clínicas. **Material e Métodos.** Quarenta e cinco cepas isoladas de um hospital público em 2004 e 2005, responsáveis por infecções hospitalares (14), infecções comunitárias (7) e colonizações (24), e 7 isoladas de estações de tratamento de esgoto (ETE) em 2009, em São Paulo, geneticamente distintas e produtoras de ESBL da família *Enterobacteriaceae*, foram estudadas. A técnica de PCR seguida de sequenciamento foi utilizada para a identificação dos genes *bla*_{ESBL}, triagem de elementos móveis e mapeamento do ambiente genético de *bla*_{ESBL}. A identificação dos grupos de incompatibilidade plasmidial (Inc) foi realizada pela técnica de PBRT, e a determinação dos tamanhos dos plasmídios pela técnica de S1-PFGE. **Resultados.** Os genes *bla*_{ESBL} identificados foram: amostras clínicas - *bla*_{TEM-15}, *bla*_{TEM-197}, *bla*_{SHV-5}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-27}, *bla*_{SHV-28}, *bla*_{SHV-45}, *bla*_{SHV-55}, *bla*_{SHV-110}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-59} e *bla*_{CTX-M-131}; amostras ambientais - *bla*_{SHV-28}, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-8}. Os genes *bla*_{TEM-15} e *bla*_{TEM-197} estavam associados aos elementos Tn2* e Tn3, respectivamente. Os genes *bla*_{SHV-5} e *bla*_{SHV-12} estavam associados à IS26, e não foi possível determinar o ambiente genético dos demais genes *bla*_{SHV}. Os genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-59} e *bla*_{CTX-M-131} estavam inseridos em integrons de classe 1 complexos, *bla*_{CTX-M-15} estava associado à *ISEcp1* interrompida pela IS26, e *bla*_{CTX-M-8} estava associado à IS10, também interrompida pela IS26. Os principais grupos Inc detectados foram IncA/C (37%) e IncF (30,4%). Exceto por 7 cepas clínicas, todas apresentavam plasmídios de alto peso molecular, entre 48,5kb e 388kb. **Conclusões.** Este estudo detectou 15 genes *bla*_{ESBL} diferentes, dos quais dois são genes novos (*bla*_{TEM-197} e *bla*_{CTX-M-131}) e três são inéditos no Brasil (*bla*_{TEM-15}, *bla*_{SHV-55} e *bla*_{SHV-110}). A maioria das cepas deste estudo possuía genes *bla*_{ESBL} associados a elementos mobilizáveis, bem como continham plasmídios de grupos Inc envolvidos na disseminação da resistência antimicrobiana. Além disso, carregavam plasmídios provavelmente conjugativos. Os resultados deste estudo mostram genes de resistência associados a elementos mobilizáveis em cepas contendo elementos transferíveis. As cepas foram isoladas tanto em uma instituição de saúde como nas ETEs da Grande São Paulo, mostrando o potencial de disseminação da resistência da clínica para o ambiente em nossa região.

Descritores: Saúde Pública; Resistência antimicrobiana; Transferência genética horizontal; β -lactamases; ESBL; Plasmídios; Integrons; Transposons.

ABSTRACT

Dropa M. Disseminação da Resistência a Antimicrobianos em Cepas Clínicas e Ambientais de *Enterobacteriaceae*: Identificação e Mapeamento do Ambiente Genético de Genes Codificadores de ESBL / Spread of Antimicrobial Resistance in *Enterobacteriaceae* clinical and environmental strains: Identification and Genetic Environment Mapping of ESBL Encoding Genes [Thesis]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da USP; 2012.

Introduction. Bacterial resistance is facilitated by selective pressure of antimicrobial use in clinical and other activities, as agriculture and livestock, and can be spread to nature through the inadequate discharge of sewage or by the use of sludge in agriculture. Extended-spectrum β -lactamases (ESBL) are the most prevalent forms of resistance in Gram-negative bacteria in the world, and their encoding genes are disseminated through several genetic elements, especially transposons and integrons mobilized to plasmids. **Objective.** To identify and characterize ESBL-encoding genes, as well as their probable mobilization pathways, in enterobacteria isolated from clinical and environmental sources. **Material and Methods.** Forty-five strains isolated from a public hospital in 2004 and 2005, responsible for hospital infections (14), community-acquired infections (7) and colonizations (24), and 7 isolated from sewage treatment plants (ETE) in 2009, in São Paulo, genetically distinct and ESBL producers from *Enterobacteriaceae* family, were studied. PCR technique followed by sequencing was used for *bla*_{ESBL} genes identification, mobile elements screening and *bla*_{ESBL} genetic environment mapping. Plasmid incompatibility groups (Inc) were identified by PBRT technique, and plasmid sizes were determined by S1-PFGE technique. **Results.** The *bla*_{ESBL} genes identified were: clinical samples - *bla*_{TEM-15}, *bla*_{TEM-197}, *bla*_{SHV-5}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-27}, *bla*_{SHV-28}, *bla*_{SHV-45}, *bla*_{SHV-55}, *bla*_{SHV-110}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-59} and *bla*_{CTX-M-131}; environmental samples - *bla*_{SHV-28}, *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{CTX-M-8}. Genes *bla*_{TEM-15} and *bla*_{TEM-197} were associated to the elements Tn2* and Tn3, respectively. Genes *bla*_{SHV-5} and *bla*_{SHV-12} were associated to IS26, and it was not possible to detect the genetic environment of the other *bla*_{SHV} genes. Genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-59} and *bla*_{CTX-M-131} were inserted in complex class 1 integrons, *bla*_{CTX-M-15} was associated to ISEcp1 interrupted by IS26, and *bla*_{CTX-M-8} was associated to IS10, also interrupted by IS26. The most common Inc groups detected were IncA/C (37%) and IncF (30,4%). Except for 7 clinical strains, all isolates showed high molecular weight plasmids, ranging from 48,5kb to 388kb. **Conclusions.** This study detected 15 different *bla*_{ESBL} genes, from which 2 are new genes (*bla*_{TEM-197} e *bla*_{CTX-M-131}) and 3 are still unpublished in Brazil (*bla*_{TEM-15}, *bla*_{SHV-55} and *bla*_{SHV-110}). Most of the strains from this study had *bla*_{ESBL} genes associated to mobile elements, as well as they had plasmids from Inc groups involved in the spread of antimicrobial resistance. Moreover, the strains probably carried conjugative plasmids. Results from the present work show resistance genes associated to mobile elements in strains carrying transferable elements. The strains were isolated either from a healthcare institution or from ETEs in São Paulo, which shows the spread potential of resistance from the clinic to the environment in our region.

Descriptors: Public Health; Antimicrobial resistance; Horizontal gene transfer; β -lactamases; ESBL; Plasmids; Integrons; Transposons.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Resistência Antimicrobiana.....	21
1.1.1 <i>Comunidade e Serviços Relacionados à Saúde.....</i>	23
1.1.2 <i>Disseminação no Ambiente.....</i>	25
1.2 β-Lactâmicos e β-Lactamases.....	30
1.2.1 <i>β-Lactamases de Espectro Estendido - ESBL.....</i>	33
1.2.2 <i>Mobilização dos Genes Codificadores de ESBL.....</i>	37
1.2.3 <i>Transposons.....</i>	38
1.2.4 <i>Integrans.....</i>	44
1.2.5 <i>Plasmídios.....</i>	48
2. OBJETIVOS.....	53
2.1 <i>Objetivo Geral.....</i>	53
2.2 <i>Objetivos Específicos.....</i>	53
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.1 <i>Cepas Bacterianas.....</i>	54
3.2 <i>Extração de DNA total.....</i>	58
3.3 <i>Desenho dos Iniciadores.....</i>	58
3.4 <i>Pesquisa de Genes Codificadores de ESBL pela PCR.....</i>	59
3.5 <i>Determinação do Ambiente Genético dos Genes bla_{ESBL}.....</i>	61
3.5.1 <i>Genes bla_{TEM}.....</i>	62
3.5.2 <i>Genes bla_{SHV}.....</i>	63
3.5.3 <i>Genes bla_{CTX-M}.....</i>	63
3.6 <i>Tipagem Plasmidial por PCR-Based Replicon Typing (PBRT).....</i>	64
3.7 <i>Deteccção e Determinação do Tamanho dos Plasmídios.....</i>	67
3.7.1 <i>Preparo dos Plugs.....</i>	67
3.7.2 <i>S1 - PFGE.....</i>	68

5. RESULTADOS.....	69
4.1 Detecção de Genes <i>bla</i>_{ESBL} pela PCR.....	69
4.1.1 TEM.....	69
4.1.2 SHV.....	71
4.1.3 CTX-M.....	74
4.2 Tipagem Plasmidial por PBRT.....	79
4.3 Detecção e Determinação do Tamanho dos Plasmídios.....	80
5. DISCUSSÃO.....	83
5.1 Genes <i>bla</i>_{TEM}.....	85
5.2 Genes <i>bla</i>_{SHV}.....	87
5.3 Genes <i>bla</i>_{CTX-M}.....	93
5.4 Considerações Finais.....	101
6. CONCLUSÕES.....	105
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

Lista de Quadros

Quadro 1. Principais grupos de antimicrobianos β -lactâmicos.....	31
Quadro 2. Classificação geral das β -lactamases.....	32
Quadro 3. Relação das cepas-controle utilizadas nas reações de PCR do estudo.....	59
Quadro 4. Sequências dos iniciadores desenvolvidos neste estudo para a pesquisa dos genes <i>bla</i> _{ESBL}	60
Quadro 5. Sequências de iniciadores utilizados na triagem dos elementos genéticos móveis relacionados aos genes <i>bla</i> _{ESBL}	62
Quadro 6. Sequências de iniciadores para a tipagem plasmidial em grupos Inc.....	66
Quadro 7. Relação dos números de acesso ao banco de dados <i>GenBank</i> para os genes novos e genes relatados pela primeira vez no Brasil.....	79

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características das cepas clínicas e ambientais produtoras de ESBL selecionadas para o estudo.....	56
Tabela 2. Número e porcentagem de cepas clínicas e ambientais positivas para a presença de cada grupo de genes <i>bla</i>	69
Tabela 3. Características das cepas clínicas de <i>K. pneumoniae</i> contendo genes <i>bla</i> _{TEM} que codificam enzimas ESBL.....	71
Tabela 4. Número e porcentagem de cepas produtoras de ESBL do grupo CTX-M-2, de acordo com a classificação do tipo de infecção.....	75
Tabela 5. Cepas ambientais isoladas no estudo, de acordo com o local de isolamento, tipo de amostra, enzimas ESBL detectadas e grupos de incompatibilidade plasmidial (Inc).....	78
Tabela 6. Conjuntos de genes <i>bla</i> _{ESBL} e respectivos ambientes genéticos, grupos de incompatibilidade plasmidial (Inc) e plasmídios de alto peso molecular.....	81

Lista de Figuras

Figura 1. Vias de transmissão da resistência a antimicrobianos entre diversas fontes.....	29
Figura 2. Estrutura esquemática das Sequências de Inserção e Transposons.....	40
Figura 3. Representação esquemática do integron de classe 1 In40.....	46
Figura 4. Representação esquemática do Integron de Classe 1 Complexo.....	48
Figura 5. Representação esquemática dos tipos de mobilização plasmidial.....	51
Figura 6. Esquema da estrutura dos transposons Tn1, 2 e 3 quando associados a genes <i>bla</i> _{TEM}	62
Figura 7. Esquema da associação mais comum entre IS26 e genes <i>bla</i> _{SHV}	63
Figura 8. Esquema do integron de classe 1 complexo.....	63
Figura 9. Possíveis associações das sequências de inserção ISEcp1 e IS26 com genes <i>bla</i> _{CTX-M}	64
Figura 10. Representação esquemática do ambiente genético dos genes <i>bla</i> _{TEM}	71
Figura 11. Distribuição em porcentagem das cepas produtoras de ESBL do grupo SHV de acordo com o setor hospitalar onde foram isoladas.....	72
Figura 12. Número de cepas produtoras de ESBL do grupo SHV de acordo com o tipo de infecção.....	72
Figura 13. Representação esquemática do ambiente genético dos genes <i>bla</i> _{SHV-5} e <i>bla</i> _{SHV-12}	74
Figura 14. Distribuição das cepas produtoras de ESBL do grupo CTX-M-2, de acordo com o setor hospitalar onde que foram isoladas.....	75
Figura 15. Representação esquemática do ambiente genético dos genes <i>bla</i> _{CTX-M}	78
Figura 16. Eletroforese em campo pulsado após a digestão com S1 nuclease.....	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 Resistência Antimicrobiana

O tratamento e a prevenção de infecções se tornaram possíveis na medicina a partir da década de 1930, com o uso das sulfonamidas, seguido da descoberta de antibióticos naturais (1940 a 1960) e do sucesso obtido pela modificação dos mesmos, até a década de 1980. Posteriormente, o desenvolvimento de antimicrobianos teve uma severa diminuição, por fatores como a dificuldade de se descobrir novos princípios ativos (especialmente contra Gram negativos), a complexidade dos processos regulatórios para introdução de novos medicamentos no mercado, e o baixo custo-benefício para as indústrias em desenvolver drogas utilizadas em tratamentos de curto prazo (LIVERMORE 2012).

A resistência antimicrobiana é um fenômeno natural de evolução dos microrganismos, e surge normalmente após mutações e recombinações genéticas. Por definição, é a habilidade de um microrganismo de sobreviver a concentrações de antimicrobianos que matariam células sensíveis do mesmo clone. A exposição aos antimicrobianos, seja no corpo humano, em animais ou no ambiente, aplica uma pressão seletiva que favorece o crescimento de bactérias naturalmente resistentes ou a aquisição de genes de resistência por cepas suscetíveis (BAQUERO *et al.* 2008; ASM 2009).

Bactérias Gram negativas possuem mecanismos de defesa contra os antimicrobianos por meio de alterações nas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs – *Penicillin-binding Proteins*), o que ocorre em espécies mais fastidiosas

(*Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis*) e com menos frequência, e pela produção de β -lactamases periplasmáticas e bombas de efluxo na membrana citoplasmática. Essa combinação de depuração plasmática (*clearance*) com impermeabilidade explica a maior resistência de microrganismos Gram negativos em relação aos Gram positivos, e também o porque da dificuldade de se desenvolver novos antimicrobianos contra eles (LIVERMORE 2012).

Células bacterianas resistentes podem se replicar originando clones resistentes, como também podem transmitir genes de resistência por meio da transferência horizontal, na qual a informação genética é transmitida de uma célula bacteriana para outra, e permite que determinantes de resistência sejam disseminados para microrganismos ambientais ou comensais inofensivos e para patógenos, criando assim reservatórios de resistência (BAQUERO *et al.* 2008; LORD SOULSBY OF SWAFFHAM PRIOR 2008; ASM 2009).

Alguns fatores que possuem papel importante no desenvolvimento da resistência são o uso de antimicrobianos na medicina humana e veterinária, na agricultura e na criação de animais, e o descarte dos mesmos no ambiente, facilitando a disseminação da resistência principalmente pela transferência genética horizontal e por fatores como trânsito de humanos e animais (insetos, aves, roedores e animais selvagens), fluxo das águas superficiais e oceânicas, e poeira. Assim, o trato gastrointestinal (TGI) de determinados animais e do homem pode ser um importante reservatório de cepas comensais multi-resistentes, as quais podem causar infecções oportunistas ou ainda transferir genes de resistência para patógenos sensíveis que

venham a causar infecções (ASM 2009; HAWKEY & JONES 2009; GARCIA-ALVAREZ *et al.* 2012).

1.1.1 Comunidade e Serviços Relacionados à Assistência à Saúde

A resistência aos antimicrobianos tornou-se um dos assuntos mais preocupantes no que se refere à saúde coletiva mundial, uma vez que sua evolução e disseminação ocorrem mais rapidamente que a conscientização sobre o controle do uso de antimicrobianos e o desenvolvimento de novas drogas.

O uso inadequado dos antimicrobianos, como em infecções virais e parasitárias, e a administração de antimicrobianos em doses abaixo das recomendadas (sub-doses), são fatores que podem gerar o aumento da população bacteriana resistente, além de possuírem pouco ou nenhum efeito sobre a morbidade e a mortalidade. Sub-doses de antimicrobianos também aumentam a tendência à mutação nas bactérias expostas, pela ativação de uma resposta SOS para reparo do DNA, além de resultar na seleção de cepas que aumentam a expressão de seus genes de resistência pré-existentes quando em contato com o antimicrobiano (ANSARI & MALIK 2009; ASM 2009).

Os conceitos e critérios para definição de infecções hospitalares e comunitárias foram estabelecidos pela Portaria 2.616 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 12 de maio de 1998 (ANVISA 1998).

A infecção hospitalar, ou relacionada à assistência à saúde, é aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares. Estas

infecções contribuem para elevar os índices de morbidade e mortalidade, prolongar os períodos de internação, aumentar os custos de tratamento, e principalmente representam uma ameaça constante de disseminação de bactérias multi-resistentes (ANVISA 1998; EL FAR *et al.* 2001; YOKOE & CLASSEN 2008).

Infecções comunitárias, por sua vez, são aquelas constatadas ou em incubação no ato de admissão do paciente, desde que não relacionadas com internação anterior no mesmo hospital (ANVISA 1998), e as principais são infecções do trato urinário e trato respiratório. A resistência nestes casos pode ocorrer devido ao uso inadequado dos antimicrobianos, especialmente na automedicação, que leva ao erro na escolha da classe e da dosagem do medicamento. Infecções recorrentes sem tratamento antimicrobiano adequado também podem levar à seleção de cepas resistentes no organismo (RODRÍGUEZ-BAÑO & NAVARRO 2008).

Nos países desenvolvidos, a distinção entre a disseminação da infecção na comunidade e nas instituições de saúde é muito clara, enquanto que nos países em desenvolvimento esta divisão é menos óbvia, pois pacientes internados são frequentemente alimentados e assistidos por membros da família, e os patógenos comunitários são trazidos para o ambiente do serviço de saúde, e vice-versa. Assim, as barreiras físicas para genes de resistência são escassas, o que aumenta o risco de infecções por cepas multi-resistentes na população em geral (ASM 2009).

Segundo a Sociedade America de Microbiologia (ASM) (2009), modelos de gerenciamento da resistência mostram que, se a colonização por cepas resistentes na comunidade for baixa, o controle da resistência pode ser mais eficiente nos hospitais. No Brasil, a venda de antimicrobianos sem prescrição médica nas farmácias está

proibida desde 2010, de acordo com a Resolução RDC 44/10 da ANVISA (2010), porém o acesso da comunidade aos hospitais ainda possui poucas restrições, o que pode facilitar o trânsito de cepas multi-resistentes entre esses dois ambientes.

Os genes de resistência em cepas clínicas são amplamente estudados e já foram identificados em diversos tipos de elementos genéticos mobilizáveis, com arranjos genéticos diferenciados. Genes codificadores das β -lactamases da família CTX-M, por exemplo, podem ser adquiridos por elementos relacionados a bacteriófagos ou por meio de sequências de inserção, bem como podem estar localizados em estruturas mais complexas, como os integrons, e serem mobilizados por plasmídios. Estes elementos têm o potencial de adquirir novos genes e de se disseminar rapidamente para uma variedade de espécies bacterianas, carregando diversos marcadores de resistência aos antimicrobianos (POIREL *et al.* 2008).

1.1.2 Disseminação no Ambiente

Para o controle da resistência antimicrobiana, é necessário compreender a distribuição de seus genes codificadores no ambiente, e também como a ação antrópica afeta esta distribuição. Pesquisas recentes têm estudado a presença de genes codificadores de resistência em isolados de bactérias de fontes não-clínicas, como alimentos e matrizes ambientais, como solo e água de diversas origens. Porém, o papel do ambiente na origem e transmissão da resistência a partir dos alimentos ou pela contaminação da água e plantações é um tema que ainda necessita de investigações apropriadas (PRADO *et al.* 2008; LORD SOULSBY OF SWAFFHAM PRIOR 2008; ANSARI & MALIK 2009; LACHMAYR *et al.* 2009; MOURA *et al.* 2010; GARCIA-ALVAREZ *et al.* 2012).

O ambiente é um importante reservatório de genes de resistência, os quais são geralmente derivados de genes essenciais da célula. Cepas resistentes podem estar em sítios como a pele e o trato gastrointestinal do homem e animais, e no ambiente, especialmente no esgoto, onde antimicrobianos e microrganismos estão presentes em uma alta densidade, o que pode favorecer o surgimento e a disseminação de cepas resistentes (ASM 2009; MOURA *et al.* 2010; GARCIA-ALVAREZ *et al.* 2012).

Outro aspecto relevante a ser considerado é que os antimicrobianos são amplamente utilizados no tratamento e na criação de animais e na agricultura. Uma vez que as classes de antimicrobianos aplicados para estes fins são por vezes as mesmas utilizadas no homem, existe uma preocupação a respeito da ocorrência de resistência cruzada nas infecções por patógenos alimentares (CARATTOLI 2008; LORD SOULSBY OF SWAFFHAM PRIOR 2008; WARREN *et al.* 2008; ASM 2009; GARCIA-ALVAREZ *et al.* 2012).

Os antimicrobianos são aplicados tanto para o tratamento e profilaxia de infecções dos animais como para fins de estimular seu crescimento, mas esta prática já foi banida para alguns antimicrobianos na Europa, onde programas de vigilância para o uso dos antimicrobianos vem sendo aplicados (BROWN *et al.* 2006; LORD SOULSBY OF SWAFFHAM PRIOR 2008; ASM 2009; GARCIA-ALVAREZ *et al.* 2012). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece limites para a presença dos antimicrobianos em cada tipo de carne, por meio de Instruções Normativas, sendo que a última divulgada foi a IN nº 11, de 22 de maio de 2012 (MAPA 2012).

Na agricultura, muitos sanitizantes e antimicrobianos são utilizados para prevenir a infecção por fungos e bactérias. Um bom exemplo é o da estreptomicina, que é utilizada em larga escala na prevenção de doenças bacterianas em maçãs e peras, assim como é utilizada na medicina humana, o que pode causar impacto na resistência a este antimicrobiano (SCHLÜTER *et al.* 2007; LORD SOULSBY OF SWAFFHAM PRIOR 2008; ASM 2009; HAWKEY & JONES 2009).

Em aquicultura, a aplicação de grandes quantidades de antimicrobianos como tetraciclina e florfenicol pode gerar impacto na saúde humana devido à transferência horizontal de genes de resistência, considerando-se o fluxo das fontes de águas de fazendas, recreacionais, praias e talvez até da água potável (BAQUERO *et al.* 2008; ASM 2009).

As estações de tratamento de esgoto (ETEs) são a interface entre os dejetos humanos e o solo e ambientes aquáticos, uma vez que recebem e tratam efluentes de diversas origens que contribuem para o ecossistema final encontrado nas estações, incluindo as frações orgânica, química e microbiológica (STALDER *et al.* 2012). O descarte de antimicrobianos no ambiente também enriquece a população de bactérias multi-resistentes e seus elementos móveis (HAWKEY & JONES 2009). Além da água do esgoto vinda de instituições de saúde, o esgoto proveniente de outros locais contém matéria orgânica oriunda dos dejetos humanos e animais, sendo, então, uma importante fonte de bactérias clínicas, e um meio extremamente rico para o surgimento e a transmissão de genes de resistência. Isto se dá porque apesar do meio estar enriquecido com matéria orgânica, o que favorece o crescimento bacteriano, há também poluentes (pesticidas, detergentes, antimicrobianos) que desafiam a

sobrevivência das bactérias, favorecendo adaptações moleculares, como recombinações e aquisições de novos genes. Durante o tratamento do esgoto, a floculação e a formação de biofilme, bem como as atividades metabólicas no aerador e nos clarificadores podem também promover a troca genética por conjugação (BROWN *et al.* 2006; SCHLÜTER *et al.* 2007; BAQUERO *et al.* 2008; PRADO *et al.* 2008; MOURA *et al.* 2010; STALDER *et al.* 2012).

O tratamento e o destino dado ao esgoto são questões primordiais na prevenção da disseminação da resistência. As plantas das estações de tratamento devem prever e validar a eficácia, tanto da remoção de matéria orgânica como dos patógenos, uma vez que os efluentes tratados que serão liberados no ambiente podem comprometer a saúde da população pela contaminação e disseminação de genes de resistência no solo e nas águas de abastecimento e recreacionais. Em amostras de esgoto das cidades de Hong Kong e Shenzhen, os níveis de antimicrobianos foram medidos e os resultados obtidos mostraram que a cefalosporina de terceira geração cefotaxima estava em concentrações acima de 1µg/mL, podendo assim favorecer o crescimento de cepas produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (BAQUERO *et al.* 2008). A remoção de bactérias contendo estruturas de resistência a antimicrobianos é o novo desafio das ETEs, e diversos estudos têm investigado a eficiência de alguns tratamentos, como luz ultra-violeta, reatores de membrana biológica e cloração, e a ineficiência desses tratamentos poderia resultar em rotas de disseminação de bactérias multi-resistentes (PRADO *et al.* 2008; STALDER *et al.* 2012).

Quando o lodo do esgoto tratado, por exemplo, é utilizado como fertilizante na agricultura, há um risco de que tanto antimicrobianos como cepas resistentes contaminem os alimentos. Este risco também existe nos casos de irrigação de plantações com o efluente tratado proveniente do esgoto (ANSARI & MALIK 2009; ASM 2009; STALDER *et al.* 2012).

A Figura 1 mostra as principais rotas de transmissão dos genes de resistência entre humanos, animais, alimentos e ambiente, o que ilustra que o controle da disseminação e a prevenção de novos mecanismos de resistência dependem de esforços multidisciplinares.

Figura 1. Vias de transmissão da resistência a antimicrobianos entre diversas fontes, adaptada de GARCIA-ALVAREZ *et al* (2012).

Os genes localizados em elementos móveis no ambiente têm sido pesquisados com frequência. Comunidades bacterianas provenientes de fontes ambientais têm sido investigadas em relação à vasta diversidade de elementos móveis que podem

conter, incluindo principalmente plasmídios, integrons e transposons (SCHLÜTER *et al.* 2007; BAQUERO *et al.* 2008; STALDER *et al.* 2012). MOURA *et al.* (2010) determinaram os tipos de plasmídios e integrons presentes em efluentes de esgoto urbano e de matadouros em Portugal. Sete grupos de incompatibilidade plasmidial e três tipos diferentes de integrons foram identificados nos dois tipos de efluentes, demonstrando a riqueza e a variedade desses elementos nos efluentes liberados no ambiente.

A revisão de STALDER *et al.* (2012) sobre a disseminação de integrons de classe 1 no ambiente revela que adubos orgânicos tratados utilizados na agricultura, ETEs e efluentes industriais são os principais reservatórios para esses elementos disseminadores de resistência, e que os tratamentos utilizados atualmente não são eficientes na redução da disseminação dos mesmos, o que pode representar um risco à saúde humana e animal.

1.2 β -Lactâmicos e β -lactamases

A classe dos antimicrobianos β -lactâmicos é a mais utilizada no tratamento e profilaxia de infecções, tanto em ambientes de serviços de assistência à saúde como na comunidade. Infelizmente, o desenvolvimento de resistência a estes antimicrobianos pelas bactérias Gram negativas é rápido, por meio principalmente da produção de enzimas β -lactamases. O espectro de ação das β -lactamases pode se modificar e/ou se estender após mutações pontuais em seus genes codificadores, e a substituição e/ou a deleção de um único aminoácido pode originar uma nova enzima (BRADFORD 2001; HAWKEY & JONES 2009; LACHMAYR *et al.* 2009).

As β -lactamases podem seguir a classificação molecular de Ambler, baseada nas seqüências de nucleotídeos e aminoácidos das enzimas, ou a classificação de Bush & Jacoby, baseada nas propriedades bioquímicas, estrutura molecular e seqüência nucleotídica das enzimas, separando-as em grupos funcionais (BRADFORD 2001; BUSH & JACOBY 2010).

Os Quadros 1 e 2 mostram, respectivamente, a classificação dos antimicrobianos β -lactâmicos e das enzimas β -lactamases.

Quadro 1. Principais grupos de antimicrobianos β -lactâmicos (CLSI 2012).

GRUPO		EXEMPLOS
Penicilinas		Ampicilina Piperacilina Ticarcilina
Cefalosporinas	1ª Geração	Cefalotina Cefazolina
	2ª Geração	Cefuroxima Cefamandol
	3ª Geração	Ceftazidima Cefotaxima Ceftriaxona Cefoperazona
	4ª Geração	Cefepime
	Cefamicinas	Cefoxitina Cefotetan
Monobactâmicos		Aztreonam
Carbapenêmicos		Imipenem Meropenem Ertapenem Doripenem Razupenem

Quadro 2. Classificação geral das β -lactamases, adaptada de BUSH & JACOBY (2010).

AMBLER	BUSH & JACOBY	SUBSTRATO	INIBIDOR		Enzimas Representativas
			AC ou TZB	EDTA	
C	1	Cefalosporinas	Não	Não	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
	1e	Cefalosporinas	Não	Não	GC1, CMY-37
A	2a	Penicilinas	Sim	Não	PC1
	2b	Penicilinas e primeiras Cefalosporinas	Sim	Não	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	(ESBL)	Cefalosporinas de amplo espectro/Monobactâmicos	Sim	Não	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
	2br	Penicilina	Não	Não	TEM-30, SHV-10
	2ber (ESBL)	Cefalosporinas de amplo espectro/Monobactâmicos	Não	Não	TEM-50
	2c	Carbenicilina	Sim	Não	PSE-1, CARB-3
	2ce	Carbenicilina/Cefepime	Sim	Não	RTG-4
D	2d	Cloxacilina	Variável	Não	OXA-1, OXA-10
	2de (ESBL)	Cefalosporina de amplo espectro	Variável	Não	OXA-11, OXA-15
	2df	Carbapenens	Variável	Não	OXA-23, OXA-48
A	2e	Cefalosporina de amplo espectro	Sim	Não	CepA
	2f	Carbapenens	Variável	Sim	KPC-2, IMI-1, SME-1
B (B1) (B3)	3a	Carbapenens	Não	Sim	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
B (B2)	3b	Carbapenens	Não	Sim	CphA, Sfh-1

AC, ácido clavulânico; TZB, tazobactam; EDTA, ácido etilenodiaminotetracético.

1.2.1 *β -Lactamases de Espectro Estendido - ESBL*

As ESBL são, por definição, enzimas da classe molecular A (classificação de Ambler), ou das classes 2b, 2ber ou 2de (classificação de Bush & Jacoby), capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração (oximino-cefalosporinas) 10% a mais do que hidrolisam as benzilpenicilinas. Possuem sítio de ação contendo o aminoácido serina como resíduo catalítico principal, e geralmente são inibidas por compostos como ácido clavulânico (clavulanato), sulbactam e/ou tazobactam. Mutações pontuais que geram substituições, inserções e deleções de aminoácidos na estrutura básica dessas enzimas podem alterar seu espectro de atividade, aumentando sua habilidade de hidrolisar cefalosporinas de terceira e quarta gerações e monobactâmicos (LIVERMORE 2008; BUSH & JACOBY 2010).

A primeira ESBL foi observada na Europa, em 1983, em uma cepa de *Klebsiella ozaenae*, e denominada SHV-2 devido à grande homologia observada com os genes *bla* da β -lactamase SHV-1, sua precursora (KNOTHE *et al.* 1983; KLIEBE *et al.* 1985). As enzimas ESBL do grupo TEM também são derivadas de penicilinas precursoras, neste caso de *Escherichia coli*, as quais sofreram mutações e foram disseminadas por meio de plasmídios. A distribuição das enzimas ESBL sofreu uma grande mudança nos anos 2000, com a disseminação das CTX-M β -lactamases, as quais já haviam sido descritas na Argentina dez anos antes, e atualmente são divididas em cinco grupos (*clusters*): CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25. Os genes codificadores das enzimas CTX-M surgiram a partir de genes cromossômicos de *Kluyvera* spp e foram mobilizados para plasmídios

por meio de sequências de inserção (TOLEMAN & WALSH 2011; CANTÓN *et al.* 2012).

Desde então, as ESBL tem sido descritas no mundo todo, em diversas espécies da família *Enterobacteriaceae* e em bacilos Gram negativos não fermentadores de glicose (BRADFORD 2001; GNIADKOWSKI 2008). Na América do Sul, os índices de produção de ESBL em enterobactérias estão entre os mais altos do mundo (PATERSON & BONOMO 2005; VILLEGAS *et al.* 2008). As enzimas do grupo SHV foram as primeiras ESBL relatadas, identificadas em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* no Chile e na Argentina (GUTMANN *et al.* 1989; CASELLAS & GOLDBERG 1989), enquanto que as ESBL do grupo TEM só foram descritas mais de uma década depois (PATERSON *et al.* 2003; VIGNOLI *et al.* 2005). Já as enzimas derivadas da família CTX-M são endêmicas e dominantes nessa região, principalmente as variantes CTX-M-2 e CTX-M-15 (RADICE *et al.* 2002; CANTÓN & COQUE 2006; HAWKEY & JONES 2009).

Os grupos de enzimas CTX-M são predominantes em áreas geográficas distintas. O grupo CTX-M-1, especialmente CTX-M-15, está distribuído mundialmente, com destaque para Europa, América do Norte e Oriente Médio (LIVERMORE 2012). O grupo CTX-M-2 predomina na América Latina, Israel e Japão, o grupo CTX-M-8 foi descrito no Brasil (BONNET *et al.* 2000) e possui relatos de ocorrência nos Estados Unidos, Europa e África, e a ocorrência do grupo CTX-M-9 foi relatada com frequência na China, Ásia e Espanha (LIVERMORE 2012).

No Brasil, o índice de enterobactérias produtoras de ESBL é alto, com destaque para as espécies *K. pneumoniae* (50%) e *E. coli* (13%) (GALES *et al.* 2012).

As enzimas CTX-M são consideradas endêmicas, e há relatos de todos os grupos, exceto CTX-M-25, em enterobactérias de origem clínica. No grupo das enzimas CTX-M-1, há alguns relatos de cepas produtoras de CTX-M-15 em São Paulo e no Rio de Janeiro (CERGOLLE-NOVELLA *et al.* 2010; CHAGAS *et al.* 2011; PEIRANO *et al.* 2011; TOLLENTINO *et al.* 2011), enquanto que o grupo CTX-M-2 está disseminado em diversas regiões do país (FERNANDES *et al.* 2009; PEIRANO *et al.* 2009; PICÃO *et al.* 2009; CLÍMACO *et al.* 2010; LOPES *et al.* 2010; CHAGAS *et al.* 2011; TOLLENTINO *et al.* 2011; QUEIROZ *et al.* 2012; ZAVASCKI *et al.* 2012). O grupo CTX-M-8 foi descrito no Brasil por BONNET *et al.* (2000), em cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas no Rio de Janeiro. Após sua descrição, genes *bla*_{CTX-M-8} só foram relatados em 2009 em Minas Gerais e em 2011 no Rio de Janeiro, e em ambos os casos foram detectados em cepas de *E. coli* de origem clínica (MINARINI *et al.* 2009; PEIRANO *et al.* 2011). O grupo de enzimas CTX-M-9 também possui poucos relatos no Brasil, apenas em cepas isoladas também na região Sudeste (BONNET *et al.* 2001; MINARINI *et al.* 2009; CLÍMACO *et al.* 2010; CHAGAS *et al.* 2011; QUEIROZ *et al.* 2012).

Os grupos TEM e SHV são relatados com menos frequência no Brasil. Aparentemente não há relatos da presença de genes *bla*_{TEM} que codificam enzimas ESBL, isto é, relatos em que a análise da sequência de aminoácidos confirma a presença de uma enzima de espectro estendido. Em relação ao grupo SHV, há duas

enzimas que foram descritas no Brasil: SHV-27, por Corkill *et al.* (2001), em uma cepa clínica de *K. pneumoniae*, e SHV-45, em *K. pneumoniae* isolada em Pernambuco, para a qual não foi identificada uma publicação, apenas sua sequência de nucleotídeos no banco de dados *GenBank* (nº de acesso AF547625), depositada em 2002. De acordo com a literatura consultada, não houve mais relatos no Brasil da produção de enzimas SHV-27 e SHV-45 após sua descrição. A enzima SHV-4 foi relatada por MENDES *et al.* (2004), em uma cepa multi-resistente de *K. pneumoniae*. SHV-5 possui alguns relatos no Brasil, em enterobactérias isoladas no Rio de Janeiro (MULVEY *et al.* 2004), Minas Gerais (MINARINI *et al.* 2007, MINARINI *et al.* 2009) e São Paulo (TOLLENTINO *et al.* 2011). Em 2011, SHV-28 foi relatada pela primeira vez no Brasil (VERAS *et al.* 2011), e neste mesmo ano TOLLENTINO *et al.* (2011) relataram, além de SHV-5, a presença de SHV-2, SHV-2a, SHV-12, SHV-31 e SHV-38 em cepas clínicas de *K. pneumoniae*, em São Paulo.

De acordo com o site www.lahey.org/studies, organizado por BUSH & JACOBY (c2003), existem 509 ESBL dos grupos SHV (168), TEM (205) e CTX-M (136) descritas e caracterizadas segundo suas diferentes alterações de aminoácidos e sua afinidade por cada substrato. Apesar de haver outros grupos de ESBL com número crescente de variantes, o presente estudo irá abordar esses três grupos principais, uma vez que são mais frequentes em bactérias isoladas no Brasil e na América Latina, conforme citado anteriormente.

Há diversas pesquisas que descrevem a produção de ESBL e outras β -lactamases em cepas isoladas do ambiente e dos alimentos, demonstrando sua disseminação além dos serviços relacionados à saúde (CARATTOLI 2008; PRADO

et al. 2008; WARREN *et al.* 2008; REINTHALER *et al.* 2010; HARTMANN *et al.* 2012; DE BOECK *et al.* 2012; DIWAN *et al.* 2012). Isto ocorre devido à presença de elementos móveis nas cepas produtoras de ESBL, que facilitam a aquisição e mobilização dos genes *bla*_{ESBL}. A maioria desses mecanismos estão relacionados a sequências de inserção, transposons e integrons de classe 1, além de elementos conjugativos que possibilitam sua transferência para outras cepas. Algumas destas estruturas podem mobilizar genes de forma muito fácil e eficiente, enquanto outras são mais complexas devido aos eventos que originaram sua mobilidade (POIREL *et al.* 2008; TOLEMAN & WALSH 2011; CANTÓN *et al.* 2012).

Os genes codificadores de resistência podem estar localizados no DNA cromossômico ou plasmidial das bactérias Gram negativas, e isto está diretamente relacionado ao seu potencial de disseminação entre as cepas. Uma vez localizados em elementos móveis como bacteriófagos, plasmídios conjugativos e mobilizáveis, transposons ou integrons, esses genes podem ser transferidos até para cepas de gêneros e reinos diferentes (CARATTOLI 2009).

1.2.2 Mobilização dos Genes Codificadores de ESBL

Os genes codificadores do grupo TEM de β -lactamases são carregados por transposons das famílias Tn1, Tn2 e Tn3, sendo que a maioria das estruturas próximas a genes *bla*_{TEM} que codificam ESBLs derivam de uma estrutura Tn3, enquanto que a aquisição e mobilização de genes *bla*_{SHV} está provavelmente relacionada ao elemento IS26. Genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} nunca foram descritos em integrons, devido provavelmente a não possuírem características compatíveis com a formação de cassetes genéticos (PARTRIDGE & HALL 2005; POIREL *et al.* 2008).

Os genes da família CTX-M de ESBLs originam-se de genes *bla_{KLU}* cromossômicos no gênero *Kluyvera*, presente na microbiota intestinal do homem e na natureza (água, solo, esgoto e alimentos de origem animal). A expressão desses genes cromossômicos é fraca e necessita de um promotor forte na extremidade 5' para que haja um aumento da concentração inibitória mínima (CIM) de antimicrobianos e seja considerada resistente. Estes genes foram mobilizados para plasmídios por meio de transposons, e transferidos horizontalmente para espécies de enterobactérias. A taxa de mobilização de genes *bla_{CTX-M}* para plasmídios é 10 vezes maior que de outros genes codificadores de ESBL. Podem estar associados a diversos elementos genéticos, especialmente as sequências de inserção *ISEcp1* e *ISCRI*, as quais além de mobilizar genes *bla_{CTX-M}* por transposição, também fornecem as sequências promotoras que aumentam os níveis de expressão dos mesmos (CANTÓN & COQUE 2006; BARLOW *et al.* 2008; POIREL *et al.* 2008; TOLEMAN & WALSH 2011; CANTÓN *et al.* 2012).

A seguir, considerações gerais sobre os elementos genéticos mais frequentemente relacionados à mobilização dos genes dos grupos de ESBL *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}*.

1.2.3 *Transposons (Tn)*

Transposons são elementos de DNA capazes de se mover dentro da sequência de DNA onde estão localizados, de um local do DNA para outro, ao que se chama transposição, e as enzimas mediadoras deste mecanismo são as transposases, codificadas pelo gene *tnpA*. A transposição pode ocorrer também do DNA cromossômico para o plasmidial e vice-versa. Todos os seres vivos possuem

transposons, porém estes são melhor compreendidos nas bactérias, onde possuem um importante papel na evolução, uma vez que causam inserções, deleções e translocações de DNA no genoma. Todos os transposons contêm genes codificadores das transposases (*tnpA*) e repetições invertidas (IRs) em suas extremidades, e podem ser classificados em Sequências de Inserção (IS), Transposons Compostos e Transposons não-Compostos (Figura 2) (SNYDER e CHAMPNESS 1997; MULLANY 2002; TOLEMAN & WALSH 2011).

As **ISs** são os menores transposons existentes (750-2000pb), e geralmente codificam apenas as transposases que promovem sua transposição e possuem uma IR em cada extremidade. Quando duas ISs do mesmo tipo se movem e ficam próximas uma da outra, formam um transposon maior, denominado **transposon composto**, o qual pode conter um cassete de genes entre suas ISs, podendo transpor todo seu conteúdo de um DNA para outro, inclusive do DNA cromossômico para o plasmidial. Como exemplos de transposons compostos, as famílias Tn5 (IS50), Tn9 (IS1) e Tn10 (IS10), que codificam genes de resistência entre as suas ISs. **Transposons não-Compostos** possuem IRs nas extremidades e genes de resistência a antimicrobianos como parte da unidade mínima de transposição. São exemplos as famílias Tn3 e Tn21 (SNYDER & CHAMPNESS 1997). A Figura 2 representa esquematicamente as estruturas das ISs e dos transposons.

Figura 2. Estrutura esquemática das Sequências de Inserção e Transposons.

A transposição de forma geral ocorre por recombinação não-homóloga, após o pareamento entre duas IRs, excisão do elemento e inserção no novo local da fita de DNA. Todo esse mecanismo é mediado pela transposase, codificada por genes *tnpA* específicos para cada transposon. Uma vez que este mecanismo gera danos ao DNA, a célula bacteriana aciona mecanismos de reparo, exceto quando o transposon possui o gene da resolvase (*tnpR*), a qual reconhece sítios denominados *res* e faz o reparo na fita danificada, causando menos prejuízos à célula. A frequência em que a transposição ocorre depende da natureza do elemento e da existência ou não de mecanismos regulatórios (SNYDER & CHAMPNESS 1997; MULLANY 2002).

Transposons Tn1, Tn2 e Tn3

Os genes *bla*_{TEM} podem estar localizados em transposons não-compostos denominados Tn1, Tn2 ou Tn3, dependendo de qual seja seu gene precursor: Tn3 se

evoluiu de *bla*_{TEM-1A}, Tn2 se evoluiu de *bla*_{TEM-1B} e Tn1 se evoluiu de *bla*_{TEM-2}. Algumas diferenças entre os três elementos pode ser observada na sequência do gene da resolvase *tnpR*, na qual o iniciador utilizado neste estudo foi baseado (PARTRIDGE & HALL 2005; NOVAIS *et al.* 2010).

Enquanto Tn1 e Tn2 mobilizam-se por recombinação não-homóloga, como descrito anteriormente, o transposon Tn3 possui um mecanismo denominado “imunidade de transposição”, no qual a frequência da transposição do Tn3 para um plasmídeo diminui quando este já possui uma cópia do Tn3, impedindo que haja mais de duas cópias do elemento no mesmo replicon (LEE *et al.* 1983; ARTHUR *et al.* 1984). Assim como algumas sequências de inserção, os transposons da família Tn3 fazem “transposição de extremidade única”, ou seja, não conseguem reconhecer uma de suas sequências terminais, e acabam reconhecendo sequências substitutas geneticamente mais distantes. A vantagem deste mecanismo é que o transposon só depende da funcionalidade de uma de suas extremidades, e portanto só necessita de uma cópia na sequência, ao invés de duas. Assim, a chance do elemento se mover para uma posição adjacente a um gene de resistência é muito maior, e uma vez próximos um do outro, o gene será mobilizado juntamente com o Tn3 nos demais eventos de transposição. Além do Tn3, os elementos *ISEcp1* e *ISCR1* também realizam transposição de extremidade única (ARTHUR *et al.* 1984; TOLEMAN & WALSH 2011).

Sequências de Inserção *ISEcp1*, *ISCR1*, *IS10* e *IS26*

Em 2001, a sequência de inserção *ISEcp1* foi identificada pela primeira vez próxima a um gene de resistência (*bla*_{CTX-M-15}), e encontra-se disseminada no mundo

todo. Há evidências de que seja responsável pela mobilização de genes dos grupos *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-9}, além de genes codificadores de AmpC β -lactamases e resistência a quinolonas (*qnrB19*) e aminoglicosídeos (*rmtC*). A localização da *ISEcp1* próxima à extremidade 5' dos genes *bla*_{CTX-M} torna a expressão dos mesmos maior devido à presença de seu promotor *P_{out}*, sugerindo que a localização da IS tenha um papel importante na seleção e disseminação das CTX-Ms. Além disso, a distância entre a *ISEcp1* e o gene *bla*_{CTX-M} está relacionada à concentração inibitória mínima das cefalosporinas. A transposição da *ISEcp1* ocorre de forma muito semelhante ao Tn3, em duas etapas: após se transpor para uma região próxima a um gene de resistência, realiza a transposição de extremidade única, mobilizando o gene (TOLEMAN & WALSH 2011; CANTÓN *et al.* 2012).

A *ISCR1* foi descrita primeiramente como uma região comum (CR) ou como a região aberta de leitura *orf513* identificada como parte de alguns integrons, hoje denominados integrons de classe 1 complexos, descritos posteriormente. Atualmente há 23 *ISCRs* descritas, e todas foram descobertas muito próximas a genes de resistência adquiridos por transferência horizontal (TOLEMAN *et al.* 2006; TOLEMAN & WALSH 2011).

A *ISCR1* possui uma maior habilidade de mobilização que *ISEcp1*, devido ao seu mecanismo de transposição que envolve transposição de extremidade única e replicação por círculo rolante, um mecanismo peculiar que envolve replicação e recombinação do elemento após sua circularização, e permite que uma região mais extensa de DNA seja mobilizada (28 kb ou mais) (CANTÓN & COQUE 2006; POIREL *et al.* 2008; TOLEMAN & WALSH 2011; CANTÓN *et al.* 2012).

A *IS10* faz parte do transposon composto *Tn10*, e pode mobilizar tanto o elemento *Tn10* completo como parte dele, atuando apenas como uma sequência de inserção individual. Pode também fazer parte de elementos auto-replicativos e auto-conjugativos denominados elementos integrativos-conjugativos (ICE). A frequência da transposição da *IS10* é baixa e estritamente regulada por mecanismos celulares que reduzem a expressão da transposase. Porém, essa frequência pode aumentar devido à influência de fatores externos que estimulam a resposta SOS da célula, como incubação contínua na fase estacionária e a irradiação de luz ultra-violeta (EICHENBAUM & LIVNEH 1998; TOLEMAN & WALSH 2011).

IS26 foi um dos primeiros elementos relacionados à aquisição de genes de resistência. Necessita de duas cópias na sequência de DNA para realizar a transposição, o que não a impede de se mobilizar muitas vezes já que não apresenta mecanismos regulatórios e portanto possui muitas cópias ao longo do genoma (TOLEMAN & WALSH 2011).

IS26 foi o elemento responsável pelos dois eventos de captura e mobilização cromossomo-plasmídeo que ocorreram com os genes *bla_{SHV}* em *Klebsiella pneumoniae*. O primeiro evento deu origem a uma estrutura denominada “grande transposon”, comum nas variantes SHV-1, -2 e -5, a qual possui um promotor forte devido a algumas mutações em sua sequência. O segundo evento de mobilização mediado pela *IS26* gerou a estrutura denominada “pequeno transposon”, comum para genes *bla_{SHV-2a}*, *bla_{SHV-11}* e *bla_{SHV-12}*, e que possui um promotor forte gerado pela inserção da *IS26* dentro da sua sequência. Dessa forma, as estruturas resultantes destes eventos possuem promotores fortes frequentemente identificados em

plasmídios, tanto de *K. pneumoniae* como outras *Enterobacteriaceae*, o que sugere que a localização de genes *bla_{SHV}* em cepas que expressam o fenótipo ESBL seja plasmidial, uma vez que a expressão do gene no cromossomo não seria suficiente para resultar neste fenótipo (HAMMOND *et al.* 2008; TURNER *et al.* 2009). É importante observar que, para que a IS26 realizasse estes eventos, ela teria que estar no genoma da *Klebsiella*, onde provavelmente chegou por meio de um plasmídio do ambiente. A presença da IS26 em *Klebsiella* no ambiente permite a movimentação genética entre bactérias ambientais e clínicas, aumentando o potencial de disseminação deste elemento (TOLEMAN & WALSH 2011).

Além da mobilização de genes *bla_{SHV}*, a IS26 também está associada à mobilização de genes *bla_{CTX-M}*, porém em menor frequência que *ISEcp1* e *ISCR1*. Apesar disso, é importante notar que as diversas posições da inserção de IS26 sugerem rearranjos frequentes dentro do ambiente genético das *Enterobacteriaceae*. É comum observar, por exemplo, a IS26 interrompendo a sequência de *ISEcp1* que precede genes *bla_{CTX-M}* (TOLEMAN & WALSH 2011; CANTÓN *et al.* 2012; SHAHID *et al.* 2012).

1.2.4 *Integrans (In)*

Integrans são elementos que incorporam cassetes genéticos por recombinação sítio-específica e os converte em genes funcionais garantindo sua expressão correta, por possuírem promotores. Fornecem às bactérias um sistema de captura de genes perfeitamente adaptado aos desafios impostos pelos tratamentos com antimicrobianos (MAZEL 2006).

Os integrons podem ser divididos em móveis e imóveis. Os integrons móveis pertencem às classes 1 a 5, e os imóveis são os denominados super-integrons. Porém, mesmo classificados como móveis, os integrons das classes 1 a 5 não são capazes de se mobilizar sozinhos, para isso necessitam estar ligados a outros elementos móveis para que ocorra a transmissão de material genético intra e inter-espécies (MAZEL 2006).

São compostos por duas regiões conservadas (5'CS e 3'CS) e uma região variável entre elas, geralmente contendo genes de resistência (FLUIT & SCHMITZ 2004; MAZEL 2006). A região 5'CS é composta pelo gene *intI1* codificando uma integrase da família das tirosina-recombinases, um sítio de recombinação primária *attI*, e uma região contendo o promotor P_{ant} . O promotor P_{ant} é constituído por duas sequências de seis bases nas posições -35 e -10, respectivamente, e é responsável pelo direcionamento da transcrição dos cassetes gênicos inseridos entre as regiões conservadas. Pode haver também um segundo promotor, localizado 119pb após P_{ant} (MAZEL 2006).

A região conservada 3'CS é composta pelos genes *qacEΔ1* e *sul1* conjugados, codificando respectivamente resistência a compostos de amônio quaternário e sulfonamidas, e por duas regiões abertas de leitura (*open reading frames – orf*), *orf5* e *orf6*, de função desconhecida (MAZEL 2006; PARTRIDGE *et al.* 2009).

A região variável dos integrons pode apresentar diversos cassetes gênicos, que são inseridos e extraídos pela integrase *IntI1*. Estes cassetes possuem tamanho variável (500-1000pb) e são constituídos por dois componentes funcionais: o(s) gene(s) codificando alguma proteína, e um sítio de recombinação 59-be (elementos

de base), que é uma repetição invertida (IR) imperfeita e variável na extremidade 3' do gene, também denominada região *attC*. Os cassetes normalmente dependem do promotor contido no integron para serem transcritos e expressos (FLUIT & SCHMITZ 2004; MAZEL 2006; PARTRIDGE *et al.* 2009). A Figura 3 representa esquematicamente a estrutura de um integron de classe 1.

A integrase IntI1 é uma recombinase sítio-específica cujos dois sítios preferenciais de ação se situam na região *attC* do cassette gênico e em *attI1* do integron, podendo promover a recombinação de sequências não relacionadas de DNA. Promove a mobilização dos cassetes genéticos que estão dentro do integron por meio da excisão, circularização e reintegração dos mesmos. A recombinação pode ocorrer, em ordem decrescente de eficiência, principalmente entre *attI* x *attC*, *attC* x *attC* ou *attI* x *attI*, e este processo pode gerar deleções, duplicações e rearranjos dos cassetes genéticos nos integrons (FLUIT & SCHMITZ 2004; MAZEL 2006).

Os integrons de classe 1 são funcionais e amplamente identificados em isolados clínicos, e a maioria dos cassetes de resistência a diversas classes de antimicrobianos pertencem a este grupo (MAZEL 2006; PARTRIDGE *et al.* 2009).

Figura 3. Representação esquemática do integron de classe 1 In40 (MAZEL 2006).

Integrans de Classe 1 Complexos

Integrans de Classe 1 Complexos surgiram após alguns eventos de recombinação e mobilização que resultaram na fusão da sequência de inserção *ISCR1* com a porção 3'CS do integron de classe 1. A *ISCR1* se transpôs para uma posição próxima à extremidade 3' da porção *qacEΔIsu11*, ocasionando a deleção das regiões abertas de leitura *orf5* e *orf6* e da porção *terIS*, responsável pelo término da replicação por círculo rolante (TOLEMAN & WALSH 2011).

Isto resultou em um elemento que, além de adquirir cassetes genéticos de resistência integrando os mesmos em sua região variável por meio de recombinação sítio-específica, se tornou móvel devido à presença da *ISCR1*, a qual como já mencionado pode mover pelo menos 28kb da sequência adjacente a ela graças à sua forma de mobilização, e que neste caso em que houve a deleção da região *terIS* permite que a replicação por círculo rolante seja contínua através da estrutura do integron de classe 1, mobilizando-a (ou parte dela) portanto com maior frequência (TOLEMAN & WALSH 2011; CANTÓN *et al.* 2012; STALDER *et al.* 2012).

Da forma como ficaram posicionados, esses elementos geram formas circulares que incluem a região 3'CS, o integron de classe 1 e o recém adquirido gene de resistência, e estas formas circularizadas podem ser resgatadas por recombinação homóloga para a região 3'CS de outro integron na mesma célula. Isto resulta em integrans de classe 1 complexos contendo repetições diretas de 3'CS e um gene de resistência não derivado de um cassette posicionado entre as repetições, configurando portanto uma nova forma de aquisição de genes (Figura 4) (POWER *et al.* 2005; TOLEMAN & WALSH 2011).

Em relação às ESBL, os integrons de classe 1 complexos já foram associados com genes dos grupos *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-9}, justificando de mais uma forma a disseminação mundial dos mesmos, com destaque para o relato destes elementos em diversos trabalhos da América Latina (POWER *et al.* 2005; VIGNOLI *et al.* 2006; QUIROGA *et al.* 2007; BAE *et al.* 2008).

Figura 4. Representação esquemática do Integron de Classe 1 Complexo, adaptada de POWER *et al.* (2005).

1.2.5 Plasmídios

Enterobactérias possuem frequentemente elementos genéticos extra-cromossômicos auto-replicativos denominados plasmídios. São moléculas de DNA circular dupla fita que não carregam genes essenciais para o crescimento das células hospedeiras sem que haja situações de estresse. Possuem sistemas tanto para assegurar sua auto-replicação como para controlar seu número de cópias na célula. Muitos plasmídios possuem também sistemas toxina-antitoxina que matam células-filhas que não herdam suas cópias na divisão celular (CARATTOLI 2009).

Os plasmídios podem, por meio da conjugação, ser transferidos horizontalmente para outras células, inclusive de outros gêneros e até de outros reinos. A conjugação é um mecanismo sofisticado e eficiente que necessita de um maquinário que envolve um grande conjunto de genes. Plasmídios que codificam o maquinário protéico completo para a conjugação são denominados conjugativos ou

auto-transmissíveis. Porém, alguns plasmídios possuem apenas parte dos genes necessários para a transferência, o que permite a eles serem transmitidos por conjugação apenas na presença de um plasmídio conjugativo, e são denominados plasmídios mobilizáveis (Figura 5). Tanto plasmídios conjugativos como mobilizáveis representam um grande impacto na transferência horizontal de genes na natureza, incluindo a disseminação da resistência a antimicrobianos (FROST *et al.* 1994; FRANCIA *et al.* 2004; ZAHRL *et al.* 2007; CARATTOLI 2009; GARCILLÁN-BARCIA *et al.* 2009).

Os **plasmídios conjugativos** são grandes (>30kb), pois carregam genes que codificam todo o sistema de transferência horizontal, sendo compostos essencialmente por uma origem de replicação *oriV* (genes *oriV*), uma origem de transferência *oriT* (genes *oriT*), e pelas proteínas do sistema Tra (genes *tra*), formadoras do pilus conjugativo, do canal de transferência e da enzima relaxase (SNYDER & CHAMPNESS 1997; GARCILLÁN-BARCIA *et al.* 2009).

A região *oriT* normalmente possui uma repetição invertida (IR) e é por onde se inicia toda transferência por conjugação. O sistema Tra é um sistema de secreção do tipo IV. É um operon, composto de muitos genes *tra* para a transcrição de um grande sistema protéico, a partir da ativação pelo gene *traJ* (FROST *et al.* 1994; ZAHRL *et al.* 2007; GARCILLÁN-BARCIA *et al.* 2009).

O mecanismo da conjugação se inicia com a secreção das proteínas do pilus, que é utilizado para aproximar a célula doadora da receptora. Forma-se então o canal protéico de ligação entre as células e o processo de transferência se inicia. A relaxase é a enzima essencial à conjugação, pois reconhece a região *oriT* de seu próprio

plasmídio, clivando-a e permanecendo ligada covalentemente à sua extremidade 5'. A relaxase é então reconhecida pela proteína acopladora tipo IV (T4CP), que transporta ativamente o complexo relaxase-plasmídio fita simples (relaxossoma) pelo canal protéico para a célula receptora. A relaxase une as extremidades da fita simples e se desliga. Tanto a fita simples que restou na célula doadora como a que foi transferida para a célula receptora são então replicadas e cada célula fica com uma cópia do plasmídio (FROST *et al.* 1994; GARCILLÁN-BARCIA *et al* 2009).

Plasmídios mobilizáveis são pequenos (<15kb), compostos apenas por origem de replicação *oriV* (genes *oriV*), origem de transferência *oriT* (genes *oriT*), e pela enzima relaxase, além de outras proteínas acessórias (genes *mob*). Como codificam sua própria relaxase, o mecanismo a partir da clivagem da região *oriT* é o mesmo descrito acima, porém para o transporte do complexo relaxossoma, os plasmídios mobilizáveis necessitam utilizar o sistema montado pelo plasmídio conjugativo, cuja proteína acopladora reconhece ambas as relaxases, e o transporte ativo do complexo ocorre normalmente. Assim, tanto o plasmídio mobilizável como o conjugativo são transferidos e replicados (FRANCIA *et al.* 2004; GARCILLÁN-BARCIA *et al* 2009).

O mecanismo de replicação ocorrido na transferência plasmidial descrita acima é conhecido como Círculo Rolante (*Rolling Circle*), porém é importante lembrar que plasmídios conjugativos e mobilizáveis possuem a origem de replicação *oriV* e podem, dentro de sua célula hospedeira, fazer a replicação convencional do tipo Teta (θ), além de poder também iniciar a replicação por meio de iniciadores RNA ao invés de proteínas (FROST *et al.* 1994; GARCILLÁN-BARCIA *et al* 2009).

Figura 5. Representação esquemática dos tipos de mobilização plasmidial. **A** - a transferência do plasmídeo conjugativo (maior) ocorre simultaneamente com a do plasmídeo mobilizável (menor); **B** - a transferência do plasmídeo conjugativo ocorre em um primeiro evento, e a do plasmídeo mobilizável em eventos posteriores. Adaptada de Timmerly *et al.* (2009).

Grupos de Incompatibilidade Plasmidial (Inc)

A incompatibilidade entre plasmídios é a impossibilidade de dois plasmídios relacionados se propagarem de forma estável na mesma linhagem celular por possuírem sistemas de replicação semelhantes. A partir desta característica, os plasmídios foram classificados em grupos de incompatibilidade (Inc), uma vez que dois plasmídios do mesmo grupo Inc não coexistem na mesma célula ou linhagem bacteriana. Os primeiros grupos Inc definidos foram IncI, IncN, IncF e IncP, e na família *Enterobacteriaceae* há 27 grupos Inc reconhecidos, dentre eles seis variantes de IncF, e três variantes de IncI (CARATTOLI 2009).

Os plasmídios dos grupos IncFII, IncA/C, IncL/M e IncII são os mais frequentes entre plasmídios de resistência a antimicrobianos, podendo ser considerados epidêmicos, uma vez que foram detectados em bactérias de diferentes origens, isoladas de diversos países. A ocorrência desses plasmídios está aparentemente ligada à pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos, pois

sua prevalência é menor em bactérias que não foram expostas a estes compostos. Em relação às ESBL, genes *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} estão mais associados com os grupos IncF, IncA/C, IncL/M, IncI1 e IncH12 (CARATTOLI 2009).

A partir dos grupos Inc, foram propostos esquemas de tipagem plasmidial baseados em *replicons* (regiões de replicação clonadas), primeiramente utilizando *Southern Blot* e hibridização, que subestimou a diversidade plasmidial devido a reações cruzadas de hibridização entre *replicons* altamente relacionados, e posteriormente utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR), em uma técnica denominada *PCR-based replicon typing*, PBRT, padronizada para os grupos Inc de *Enterobacteriaceae* e utilizada nas pesquisas desde então (CARATTOLI *et al.* 2005; CARATTOLI 2009; NOVAIS *et al.* 2010; QUEIROZ *et al.* 2012). A limitação desta técnica é que os plasmídios podem carregar múltiplos replicons ou apresentar mosaicismos nos mesmos, além de se aplicar apenas aos replicons dos principais grupos de incompatibilidade plasmidial das enterobactérias (CARATTOLI *et al.* 2005; GARCILLÁN-BARCIA *et al.* 2009).

Considerando, portanto, as evidências de que genes de resistência que codificam ESBLs estão presentes em estruturas genéticas complexas e altamente mobilizáveis, e que estão disseminados em bactérias Gram negativas presentes em diversos tipos de ambientes, este estudo propôs a investigação da presença desses genes e estruturas móveis em cepas de origem clínica e ambiental, em uma tentativa de visualizar quais seriam os genes carregados por essas cepas, e também quais as prováveis formas de mobilização e disseminação dos mesmos nos diferentes ambientes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar genes codificadores de β -lactamases de espectro estendido, bem como suas prováveis formas de mobilização, em enterobactérias isoladas de fontes ambientais e clínicas.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar, a partir do banco de cepas do Laboratório de Prática de Saúde Pública da USP, cepas de enterobactérias produtoras de ESBL das famílias TEM, SHV e CTX-M geneticamente distintas, isoladas de um hospital público e de estações de tratamento de esgoto da Grande São Paulo;
- Identificar, por PCR e análise de sequenciamento, os genes codificadores de ESBL *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} presentes nas cepas selecionadas;
- Determinar o ambiente genético adjacente aos genes detectados, bem como sua provável forma de mobilização.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas Bacterianas

As cepas estudadas no presente trabalho fazem parte da família *Enterobacteriaceae* e pertencem à coleção de cultura do Laboratório de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Foram analisadas 135 cepas clínicas isoladas em 2004/2005, provenientes de infecções relacionadas à assistência à saúde, infecções comunitárias ou colonizações (DROPA 2006, DROPA *et al.* 2009), e 200 cepas ambientais, isoladas em 2009 de esgoto e lodo brutos ou tratados, de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) da Grande São Paulo (Projeto Finep/CNPq “Detecção e genotipagem de *Aeromonas*, *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras ambientais”).

As 335 cepas foram submetidas ao teste de suscetibilidade a antimicrobianos β -lactâmicos (Ampicilina, Cefalotina, Cefoxitina, Cefotetan, Ceftazidima, Cefotaxima, Cefepime, Aztreonam, Meropenem e Ertapenem) por disco-difusão, e aquelas que apresentavam resistência às cefalosporinas de 3^a e 4^a geração e/ou aztreonam foram analisadas quanto à produção fenotípica de ESBL, pelo método de aproximação de discos (BRADFORD 2001; CLSI 2012). Das 335 cepas, 142 eram produtoras de ESBL (135 clínicas e 7 ambientais), e foram submetidas à medida da concentração inibitória mínima (CIM) para β -lactâmicos pelo método Etest[®] (Tabela 1), e à genotipagem por eletroforese em campo pulsado (PFGE), para possibilitar a eliminação de clones (DROPA 2006; DROPA *et al.* 2009).

Após as análises descritas acima, foram selecionadas 52 cepas produtoras de ESBL com perfis genéticos distintos. São 45 cepas clínicas, provenientes de infecções hospitalares (n=14), infecções comunitárias (n=7) e colonizações (n=24), e 7 cepas ambientais, provenientes de cinco Estações de Tratamento de Esgoto da Grande São Paulo (Tabela 1).

Tabela 1. Características das cepas clínicas e ambientais produtoras de ESBL selecionadas para o estudo.

Cepas Clínicas (n=45) – Julho/2004 a Julho/2005													
Infecções Hospitalares (n=14)													
ID FSP	Espécie	Local	Amostra	CIM (µg/mL)									
				FOX	CTT	CAZ	CTX	ATM	FEP	AMC	PIP	MEM	ERT
209/05	<i>Morganella morganii</i>	Clínica Médica	Urina	>256	8	2	>256	>256	>256	>256	1,5	0,125	0,047
211/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Clínica Médica	Sangue	6	0,25	6	64	12	32	3	2	0,125	0,19
224/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UTI Neonatal	Secreção Ocular	3	0,38	96	12	>256	12	6	192	0,023	0,094
225/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Berçário	Sangue	4	0,38	128	8	96	1,5	6	12	0,032	0,047
226/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UTI Neonatal	Secreção Ocular	3	0,25	>256	6	>256	12	6	8	0,032	0,125
237/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Semi-UTI	Urina	3	0,125	24	>256	>256	64	12	4	0,032	0,25
246/05	<i>Escherichia coli</i>	Ambulatório	Urina	6	0,19	6	>256	>256	>256	6	2	0,023	0,047
262/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Berçário	Urina	3	0,38	256	24	>256	2	4	32	0,023	0,19
287/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UTI Neonatal	Liq. Peritonial	2	1,5	>256	>256	>256	32	8	>256	0,047	0,25
306/05	<i>Escherichia coli</i>	Clínica Cirúrgica	Urina	4	0,25	48	6	64	0,75	8	2	0,023	0,023
309/05	<i>Providencia rettgeri</i>	PS	Urina	8	0,38	6	256	6	64	128	1,5	0,094	0,094
318/05	<i>Providencia stuartii</i>	UTI	LBA ^a	24	0,38	2	48	4	64	48	6	0,094	0,094
326/05	<i>Escherichia coli</i>	UTI	LBA ^a	6	0,38	2	>256	12	24	6	3	0,023	0,047
328/05	<i>Escherichia coli</i>	UTI	LBA ^a	6	0,19	4	>256	32	192	6	4	0,016	0,023
Infecções Comunitárias (n=7)													
ID FSP	Espécie	Local	Amostra	CIM (µg/mL)									
				FOX	CTT	CAZ	CTX	ATM	FEP	AMC	PIP	MEM	ERT
214/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ambulatório	Urina	3	0,19	>256	3	>256	2	4	2	0,023	0,023
234/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ambulatório	Urina	16	0,75	4	>256	128	256	6	12	0,094	0,75
314/05	<i>Escherichia coli</i>	PS	Urina	8	0,38	8	>256	>256	>256	8	12	0,047	0,19
315/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PS	Urina	4	0,19	>256	12	>256	3	8	128	0,023	0,032
317/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PS	Sangue	24	1,5	>256	>256	>256	>256	12	>256	0,125	0,5
324/05	<i>Klebsiella oxytoca</i>	UTI	Liq. Ascítico	48	2	32	>256	192	>256	12	>256	0,064	0,38
325/05	<i>Morganella morganii</i>	PS	Urina	96	3	0,5	256	4	0,75	64	0,75	0,064	0,012

^aLBA: Lavado Bronco-Alveolar; CIM – Concentração Inibitória Mínima; PS – Pronto Socorro; UTI – Unidade de Tratamento Intensivo; FOX – Cefoxitina; CTT – Cefotetan; CAZ – Ceftazidima; CTX – Cefotaxima; ATM – Aztreonam; FEP – Cefepime; AMC – Amoxicilina+Clavulanato; PIP – Piperacilina+Tazobactam; MEM – Meropenem; ERT – Ertapenem.

Colonizações (n=24)

ID FSP	Espécie	Local	Amostra	CIM (µg/mL)									
				FOX	CTT	CAZ	CTX	ATM	FEP	AMC	PIP	MEM	ERT
201/05	<i>Proteus mirabilis</i>	Semi-UTI	Prega Inguinal	4	0,25	1,5	>256	8	>256	4	0,38	0,032	0,032
202/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Semi-UTI	Prega Inguinal	4	0,125	3	32	12	0,094	6	8	0,023	0,016
205/05	<i>Escherichia coli</i>	UTI	Escara	16	2	25	>256	96	>256	6	>256	0,023	0,38
208/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UTI	Secreção Traqueal	3	0,19	8	128	32	64	8	6	0,047	0,19
220/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PS	Urina	12	3	8	>256	96	256	12	>256	0,25	3
227/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ambulatório	Urina	32	1,5	128	8	>256	128	6	6	0,047	0,125
243/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Berçário	Secreção Ocular	6	0,25	>256	48	>256	3	8	24	0,023	0,032
248/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Berçário	Fezes	8	2	16	>256	256	32	32	>256	0,19	1
253/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UTI	Urina	32	1,5	24	>256	96	32	12	>256	0,094	1,5
259/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UTI	Escara	32	1,5	6	128	>256	48	6	>256	0,047	0,5
263/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Clínica Cirúrgica	Urina	2	0,19	>256	6	>256	1,5	6	3	1,5	0,16
264/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UTI	Prega Axilar	12	0,75	64	>256	>256	256	12	256	0,64	5
265/05	<i>Escherichia coli</i>	Clínica Cirúrgica	Fragmento Ósseo	16	3	6	>256	96	48	12	>256	0,64	0,25
267/05	<i>Escherichia coli</i>	Clínica Médica	Prega Inguinal	3	0,25	48	8	48	0,38	8	3	0,016	0,008
269/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UTI	Urina	3	0,25	8	128	24	16	8	4	0,064	0,125
274/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Berçário	Swab Retal	4	0,38	256	16	96	4	6	64	0,023	0,023
275/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Berçário	Swab Retal	3	0,38	>256	64	256	6	8	>256	0,023	0,125
276/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UTI Pediátrica	Secreção Anal	12	0,75	4	>256	48	128	16	>256	0,094	0,25
286/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Berçário	Swab Retal	8	1	32	12	12	3	3	6	0,047	0,064
295/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Berçário	Swab Retal	3	0,19	>256	96	>256	6	16	128	0,032	0,047
305/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Clínica Pediátrica	Secreção Traqueal	4	0,19	256	8	192	2	6	6	0,023	0,032
308/05	<i>Morganella morganii</i>	Ambulatório	Urina	>256	16	64	96	16	6	>256	24	0,25	0,094
316/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Clínica Médica	Secreção Purulenta	8	1	128	>256	>256	64	16	>256	0,047	0,25
332/05	<i>Morganella morganii</i>	PS	Urina	>256	16	3	>256	24	192	>256	2	0,19	0,125

Cepas Ambientais (n=7) – Junho a Dezembro de 2009

ID FSP	Espécie	Local	Amostra	CIM (µg/mL)									
				FOX	CTT	CAZ	CTX	ATM	FEP	AMC	PIP	MEM	ERT
1271/09	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ETE 1 (Junho/09)	Esgoto Tratado	3	0,25	64	>256	48	48	4	4	0,064	0,094
1312/09	<i>Escherichia coli</i>	ETE 1 (Agosto/09)	Esgoto Bruto	4	0,25	2	12	3	8	6	4	0,047	0,016
1314/09	<i>Escherichia coli</i>	ETE 1 (Agosto/09)	Esgoto Bruto	6	0,50	128	>256	256	48	8	32	0,023	0,023
1333/09	<i>Escherichia coli</i>	ETE 2 (Agosto/09)	Esgoto Tratado	4	0,25	1	12	3	96	6	3	0,047	0,016
1356/09	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ETE 3 (Setembro/09)	Esgoto Bruto	4	0,19	8	128	12	96	8	16	0,094	0,064
1373/09	<i>Escherichia coli</i>	ETE 4 (Outubro/09)	Lodo de esgoto	4	0,38	1	12	3	96	8	3	0,047	0,016
1471/09	<i>Enterobacter cloacae</i>	ETE 5 (Dezembro/09)	Lodo de esgoto	>256	96	3	48	16	>256	192	6	0,094	0,75

CIM – Concentração Inibitória Mínima; PS – Pronto Socorro; UTI – Unidade de Tratamento Intensivo; ETE – Estação de Tratamento de Esgoto; FOX – Cefoxitina; CTT – Cefotetan; CAZ – Ceftazidima; CTX – Cefotaxima; ATM – Aztreonam; FEP – Cefepime; AMC – Amoxicilina+Clavulanato; PIP – Piperacilina+Tazobactam; MEM – Meropenem; ERT – Ertapenem.

3.2 Extração de DNA total

A extração do DNA total foi realizada segundo CHAPMAN *et al.* (2001).

As cepas selecionadas foram reisoladas em Ágar MacConkey e inoculadas em 10mL de caldo Luria 0,5% de NaCl e incubadas a 35°C por 18-24h. Após centrifugação por 10 minutos a temperatura ambiente, as células do sedimento foram ressuspensas em 1mL de água mQ[®] estéril e centrifugadas novamente por 3min.

O sedimento foi então ressuspenso em 200µL de água mQ[®] estéril, e a suspensão foi submetida ao banho de água a 95°C, por 10 minutos, e em seguida colocada em freezer a -20°C, por 30 minutos. Após o descongelamento, foi realizada uma nova centrifugação por 10min e o sobrenadante contendo o material genético transferido para um novo microtubo. Os tubos contendo o DNA foram armazenados em freezer a -20°C.

3.3 Desenho dos Iniciadores

Após alinhamento, por meio do programa *Bioedit Sequence Alignment Editor*, das sequências disponíveis para genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} no banco de dados GenBank e de acordo com o site www.lahey.org/studies, organizado por BUSH & JACOBY (c2003), as regiões codificadoras e dos promotores dos genes foram utilizadas para o desenho de novos iniciadores, para possibilitar a detecção de qualquer gene desses três grandes grupos de enzimas. Os iniciadores foram desenvolvidos no programa [Primer-BLAST](#), o qual utiliza o software [Primer 3](#), cuja função é apresentar o número de bases, o valor de TM (ponto de fusão) e a porcentagem de G/C (guanina/citosina) do iniciador desenhado, e o programa

[BLAST](#) para testar os novos iniciadores tanto contra a sequência de base fornecida pelo usuário como as sequências da base de dados GenBank.

Os novos iniciadores e respectivos genes-alvo estão listados no Quadro 4.

3.4 Pesquisa de Genes Codificadores de ESBL pela PCR

Foram pesquisados os grupos de genes codificadores das famílias de ESBL TEM, SHV e CTX-M.

Foram utilizadas cepas-controle da coleção de cultura do Laboratório de Prática de Saúde Pública da FSP-USP, validados por sequenciamento, além do controle positivo para o grupo *bla*_{CTX-M-9}, gentilmente cedido pelo Dr. Nilton Lincopan, do Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP) (Quadro 3).

Quadro 3. Relação das cepas-controle utilizadas nas reações de PCR do estudo.

ID	Espécie	Grupo de Genes
FSP202/05	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{TEM}
		<i>bla</i> _{SHV}
FSP1271/09	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
FSP202/05	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-2}
FSP1312/09	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-8}
ICB-USP (FSP339/05)	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-9}
não houve cepa-controle	-----	<i>bla</i> _{CTX-M-25/outros}

Cada microtubo de reação continha um volume total de 25µL, com a seguinte composição: DNA total 5µL, tampão 1X, MgCl₂ 1,5mM, dntp 200µM, iniciadores 0,5µM cada, e Taq DNA polimerase 1,25U (GoTaq® DNA Polymerase, Promega, WI, EUA).

A reação ocorreu com uma denaturação inicial a 94°C por 2 min., seguida de 30 ciclos consistindo de: denaturação a 94°C por 45s, anelamento 55°C por 1 min., e extensão a 72°C por 1minuto. Após a finalização dos ciclos, houve uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Quadro 4. Sequências dos iniciadores desenvolvidos neste estudo para a pesquisa dos genes *bla*_{ESBL}.

Iniciador	Sequência 5'-3'	Alvo	Produto (pb)
TEM P F	TAAAATTCTTGAAGACGAA	Grupo <i>bla</i> _{TEM}	1066
TEM CR F	CGWGTCGCCCTTATTCCCT		839
TEM R	CCAAWGCTTAATCAGTGAG		
SHV F	TTATCTCCCTGTTAGCCRCC	Grupo <i>bla</i> _{SHV}	838
SHV R	TTAGCGTTGCCAGTGYTCGA		870
SHV-5r R	GCTAGCAAGCGGGGTGCG		
CTX-M-1 F	AAATCACTGCGYCAGTTCA	Grupo <i>bla</i> _{CTX-M-1}	854
CTX-M-1 R	GGTGACGATTTTAGCCGCCG		
CTX-M-2 F	GACTCAGAGCATTCGCCGC	Grupo <i>bla</i> _{CTX-M-2}	870
CTX-M-2 R	TCAGAAACCGYGGGTTACGA		
CTX-M-8 F	GATGAGACATCGCGTTAAG	Grupo <i>bla</i> _{CTX-M-8}	861
CTX-M-8 R	GGTGACGATTTTCGCGGCA		
CTX-M-9 F	TGACAAAGAGARTGCAACGG	Grupo <i>bla</i> _{CTX-M-9}	857
CTX-M-9 R	CGATGATTCTCGCCGCTGAA		
CTX-M-25 F	ATGAGAAAAAGCGTAAGGCGGG	Grupo <i>bla</i> _{CTX-M-25} , e demais genes <i>bla</i> _{CTX-M}	865
CTX-M-25 R	CCGTCGGTGACWATTCTG		

Para a visualização dos produtos amplificados, juntamente com o marcador de peso molecular (100bp Plus MassRuler™ DNA Ladder, Fermentas), foi realizada uma eletroforese a 6V/cm em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta (Epi Chemi II Darkroom, UVP Bioimaging Systems).

Os fragmentos positivos foram purificados por meio de kit comercial (illustra™ GFX™ DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, UK) de acordo com as instruções do fabricante, sequenciados e analisados por meio do software *Bioedit Sequence Alignment Editor*.

3.5 Determinação do Ambiente Genético dos Genes *bla*_{ESBL}

Após a identificação dos genes *bla*_{ESBL}, foi pesquisado o ambiente genético dos mesmos, pelo mapeamento de alguns elementos móveis ou mobilizáveis, por meio de PCR e sequenciamento. O objetivo desta etapa do estudo foi determinar se os genes *bla*_{ESBL} estariam ou não associados a estes elementos, uma vez que o mapeamento completo do conteúdo genético envolvido no evento de mobilização só seria possível em um estudo que envolvesse um menor número de cepas.

Inicialmente, foi realizada a triagem de alguns elementos genéticos que, segundo a literatura consultada, poderiam estar relacionados aos genes *bla*_{ESBL}. O Quadro 5 apresenta os elementos pesquisados, com seus respectivos iniciadores e genes aos quais estariam relacionados. A pesquisa de integrases 2 e 3 foi realizada para todas as cepas.

Quadro 5. Sequências de iniciadores utilizados na triagem dos elementos genéticos móveis relacionados aos genes *bla*_{ESBL}.

Iniciador	Sequência 5'-3'	Alvo	Genes Relacionados	Produto (pb)	Referência
IntI 1 F	ACATGTGATGGCGACGCACGA	<i>intI 1</i>	<i>bla</i> _{CTX-M}	569	PAN <i>et al.</i> 2006
IntI 1 R	ATTTCTGTCCTGGCTGGCGA				
IntI 2 F	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	<i>intI 2</i>	—	789	
IntI 2 R	CACGGATATGCGACAAAAAGGT				
IntI 3 F	CATTTGTGTTGTGGACGGC	<i>intI 3</i>	—	717	XU <i>et al.</i> 2009
IntI 3 R	GACAGATACGTGTTTGGCAA				
ISEcp1 F	GCAGGTCTTTTCTGCTCC	<i>tnpA</i> de <i>ISEcp1</i>	<i>bla</i> _{CTX-M}	535	PARK <i>et al.</i> 2009
ISEcp1 R	TTTCCGCAGCACCGTTTGC				
ISCR1 F	AAGGAACGCCACGGCGAGTCAA	<i>tnpA</i> de <i>ISCR1</i>	<i>bla</i> _{CTX-M}	1200	
ISCR1 R	TGCAAAGACGCCGTGGAAGC				
IS26 F	CAGCGTGACATCATTCTGTG	<i>tnpA</i> de <i>IS26</i>	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV}	662	Este estudo
IS26 R	TCTGCTTACCAGGCGCATTT				
Tn1/2/3 F	ATGCGAMTTTTTGGTTAYGC	<i>tnpR</i> de <i>TnI</i> , 2 e 3	<i>bla</i> _{TEM}	Variável	PARTRIDGE & HALL 2005
TEM R	CCAAWGCTTAATCAGTGAG				

3.5.1 Genes *bla*_{TEM}

O ambiente genético dos genes *bla*_{TEM} que codificam enzimas ESBL foi determinado por meio do sequenciamento do produto de PCR obtido na reação de triagem dos transposons Tn1, Tn2 e Tn3 descrita acima, a qual já foi realizada com o iniciador reverso para os genes *bla*_{TEM} (Figura 6).

Figura 6. Esquema da estrutura dos transposons Tn1, 2 e 3 quando associados a genes *bla*_{TEM}. Setas pretas indicam a posição dos iniciadores utilizados no mapeamento.

3.5.2 Genes *bla_{SHV}*

De acordo com as estruturas geralmente descritas na literatura para a associação da IS26 com genes *bla_{SHV}*, foram realizadas amplificações utilizando apenas iniciadores reversos (Figura 7).

Figura 7. Esquema da associação mais comum entre IS26 e genes *bla_{SHV}*. Setas pretas indicam a posição dos iniciadores utilizados no mapeamento.

3.5.3 Genes *bla_{CTX-M}*

Os genes *bla_{CTX-M}* podem estar associados a diversos elementos genéticos mobilizáveis, como integrons de classe 1 simples ou complexos, ou sequências de inserção, especialmente *ISCR1*, *ISEcp1* e *IS26*.

Uma vez que genes *bla_{CTX-M-2}* estão frequentemente ligados à *ISCR1* e inseridos em integrons de classe 1 complexos, novos iniciadores foram desenhados e a amplificação representada na Figura 8 foi realizada:

Figura 8. Esquema do integron de classe 1 complexo. Setas pretas indicam a posição dos iniciadores utilizados no mapeamento.

Para os genes dos demais grupos de CTX-M, mais comumente associados à *ISEcp1* e/ou *IS26*, as reações esquematizadas na Figura 9 foram realizadas:

Figura 9. Possíveis associações das sequências de inserção *ISEcp1* e *IS26* com genes *bla*_{CTX-M}. Setas pretas indicam a posição dos iniciadores utilizados no mapeamento.

Os produtos amplificados foram purificados por meio de kit comercial (illustra™ GFX™ DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, UK), de acordo com as instruções do fabricante, e encaminhados para o sequenciamento, cujos resultados foram analisados por meio de alinhamento no programa *Bioedit Sequence Alignment Editor*, comparando sequências de nucleotídeos obtidas nos resultados com aquelas existentes no banco de dados *GenBank*.

3.6 Tipagem Plasmidial por *PCR-Based Replicon Typing* (PBRT)

Os plasmídios foram classificados de acordo com seus grupos Inc, pela metodologia padronizada por CARATTOLI *et al.* (2005) (Quadro 6). Não foram utilizados controles positivos, porém os produtos de PCR positivos foram sequenciados para validação das reações.

O DNA plasmidial utilizado nas reações de PCR foi extraído por kit comercial (Wizard *Plus* SV Minipreps, Promega, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As sequências e os alvos para os 18 pares de iniciadores utilizados nas reações estão no Quadro 6.

O PBRT consiste em cinco reações de PCR multiplex, para reconhecimento de 3 tipos de *replicons* cada, e três reações simples para IncF, IncK e IncB/O. As condições de reação para todas as amplificações, exceto a de IncF, são: denaturação inicial a 94°C por 5 min., seguida de 30 ciclos consistindo de: denaturação a 94°C por 1min., anelamento a 60°C por 30s, e extensão a 72°C por 1minuto. Após a finalização dos ciclos, há uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Para a reação do grupo IncF, a temperatura de anelamento passa a ser 52°C.

Para a visualização dos produtos amplificados, juntamente com o marcador de peso molecular (100bp Plus MassRuler™ DNA Ladder, Fermentas), foi realizada uma eletroforese a 6V/cm em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta (Epi Chemi II Darkroom, UVP Bioimaging Systems).

Quadro 6. Sequências de iniciadores para a tipagem plasmidial em grupos Inc (CARATTOLI *et al.* 2005).

Iniciador	Sequência 5'-3'	Alvo	Produto (pb)
H11 F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	parA-parB	471
H11 R	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA		
H12 F	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC	iterons	644
H12 R	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT		
II F	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	RNAI	139
II R	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
X F	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	ori γ	376
X R	TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTTAGC		
L/M F	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG	repA, B, C	785
L/M R	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG		
N F	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	repA	559
N R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		
FIA F	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	iterons	462
FIA R	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG		
FIB F	GGAGTTCTGACACAGATTTTCTG	repA	702
FIB R	CTCCCGTCGTTTCAGGGCATT		
W F	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	repA	242
W R	GGTGCGCGGCATAGAACCGT		
Y F	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	repA	765
Y R	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT		
P F	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	iterons	534
P R	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC		
FIC F	GTGAAGTGGCAGATGAGGAAGG	repA2	262
FIC R	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT		
A/C F	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	repA	465
A/C R	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT		
T F	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	repA	750
T R	CGTTGATTACCTTAGCTTTGGAC		
FII ₅ F	CTGTCGTAAGCTGATGGC	repA	270
FII ₅ R	CTCTGCCACAAACTTCAGC		
F _{repB} F	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	RNAI/repA	270
F _{repB} R	GAAGATCAGTCACACCATCC		
K/B F	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC	RNAI	160
K R	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA		
K/B F	GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC	RNAI	159
B/O R	TCTGCGTTCGCCAAGTTCGA		

3.7 Detecção e Determinação do Tamanho dos Plasmídios

3.7.1 *Preparo dos Plugs*

A extração do DNA em moldes para eletroforese em campo pulsado foi realizada de acordo com DROPA (2006).

Cada cepa foi cultivada em 30mL de caldo Luria 0,5% NaCl, por 18-24h a 37°C. As células foram ressuspensas em 1mL de solução tampão TE I (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 1mM, pH 8,0) e transferidas para microtubos tipo eppendorf, os quais foram centrifugados a 12.000RPM por 5 minutos a 24°C. A seguir, foram adicionados às células 400µL de TE I, e desta suspensão, 80µL foram adicionados a 320µL de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting*) a 1%, a 55-60°C. Em seguida, os moldes para confecção dos *plugs* foram preenchidos e incubados por 15 minutos a 4°C, para solidificação.

Os *plugs* foram então retirados dos moldes e colocados em 5mL de uma solução de lise (EDTA 50mM, pH8,0; Tris-HCl 50mM, pH 7,5; SDS 20%, Sarkosyl 1%, proteinase K 20mg/mL), em tubos tipo Falcow[®], e incubados a 55°C por 2h.

Após a incubação, foram realizadas 2 lavagens dos *plugs* em 10mL de água mQ[®] e 4 lavagens em 10mL de TE I (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 1mM, pH8,0), com intervalos de 15min, a 55°C.

Os *plugs* foram então transferidos para um microtubo tipo Eppendorf[®] e estocados em 1mL de TE I a 4°C, até o momento do uso.

3.7.2 *S1 - PFGE*

Para a conversão de plasmídios superenovelados (*supercoiled*) em plasmídios lineares, foi realizada a digestão dos *plugs* com a enzima S1 nuclease (Promega, WI, EUA) 10U por plug, em 350µL de tampão da enzima fornecido pelo fabricante. A digestão ocorreu a 37°C por 45min, e a reação foi interrompida transferindo-se o *plug* para um novo microtubo com tampão TE I (BARTÓN *et al.* 1995; MSHANA *et al.* 2009).

Após a digestão com S1, os *plugs* contendo plasmídios lineares foram submetidos à eletroforese em campo pulsado (Chef Mapper (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Em um gel de agarose para Pulsed Field a 1% em solução tampão TBE 0,5X (Tris-borato 45mM, EDTA dissódico 1mM, pH 8,0), foram colocados os *plugs* das amostras e de marcadores de peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker e MidRange PFG Marker I, New England Biolabs, USA). As condições utilizadas na eletroforese foram: voltagem de 6V/cm, a 14°C, por 20h, com intervalo de pulsos de 1s a 40s.

O gel de PFGE foi corado em brometo de etídio 1µg/mL, durante 1h, e visualizado em luz ultravioleta (Epi Chemi II Darkroom, UVP Bioimaging Systems). O tamanho dos plasmídios foi determinado pela comparação com as bandas dos marcadores de peso molecular.

4. RESULTADOS

4.1 Detecção de Genes *bla*_{ESBL} e seus Ambientes Genéticos

Do total de 45 isolados clínicos, 36 (80%) possuíam genes *bla*_{TEM}, 33 (73,3%) possuíam *bla*_{SHV} e 30 (66,7%) possuíam genes do grupo *bla*_{CTX-M-2}. Dentre os isolados ambientais, 3 (42,8%) possuíam *bla*_{TEM}, 2 (28,6%) possuíam *bla*_{SHV}, 2 (28,6%) possuíam genes do grupo *bla*_{CTX-M-1} e 5 (71,4%) possuíam genes do grupo *bla*_{CTX-M-8} (Tabela 2).

Tabela 2. Número e porcentagem de cepas clínicas e ambientais positivas para a presença de cada grupo de genes *bla*.

Grupos de Genes	Cepas Clínicas n (%)	Cepas Ambientais n (%)
<i>bla</i> _{TEM}	36 (80)	3 (42,8)
<i>bla</i> _{SHV}	33 (73,3)	2 (28,6)
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	0 (0)	2 (28,6)
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	30 (66,7)	0 (0)
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	0 (0)	5 (71,4)

4.1.1 TEM

Entre os genes *bla*_{TEM} amplificados em cepas clínicas (n=36), 33 (91,7%) eram genes não codificadores de ESBL *bla*_{TEM-1A} (11) e *bla*_{TEM-1B} (22), distribuídos entre todas as espécies. Os demais genes *bla*_{TEM} detectados foram *bla*_{TEM-15}, em apenas uma cepa de *K. pneumoniae* da UTI Adulta (FSP264/05, colonização), e o novo *bla*_{TEM-197}, muito semelhante ao *bla*_{TEM-15} com a substituição de aminoácido Ala₁₈₄→Val, em 2 isolados de *K. pneumoniae*, uma originária do Berçário (FSP286/05, colonização) e outra da UTI Neonatal (FSP287/05, infecção hospitalar).

Dentre os isolados das ETEs, apenas os genes não-ESBL *bla*_{TEM-1A} (n=2) e *bla*_{TEM-1B} (n=1) foram detectados.

Em nenhum isolado foi detectado mais de um gene *bla*_{TEM}.

A triagem dos elementos Tn1, Tn2, Tn3, *int2* e *int3* foi realizada apenas para as 3 cepas que continham *bla*_{TEM} codificadores de ESBL. Todas foram negativas para *int2* e *int3*.

A cepa clínica de *K. pneumoniae* produtora de TEM-15 possui também genes codificadores de SHV-110 e CTX-M-2. A análise do sequenciamento do produto de 1,5kb obtido na PCR utilizando os iniciadores Tn1/2/3 F e TEM R revelou que o gene *bla*_{TEM-15} está associado ao transposon Tn2* (Figura 10A) (PARTRIDGE & HALL 2004).

A nova enzima TEM-197 foi detectada em dois isolados clínicos de *K. pneumoniae*, sendo que um deles também possui SHV-5. O produto de 1,5kb mencionado anteriormente também foi obtido para estas cepas, revelando que o gene *bla*_{TEM-197} está associado ao transposon Tn3 (Figura 10B).

Os resultados descritos acima para as cepas produtoras de TEM-15 e TEM-197 estão resumidos na Tabela 3, e a Tabela 6 apresenta os resultados gerais deste estudo.

Figura 10. Representação esquemática do ambiente genético dos genes *bla*_{TEM}. **A** – Parte da estrutura do transposon Tn2*, associado ao gene *bla*_{TEM-15}. **B** – Parte da estrutura do transposon Tn3, associado ao gene *bla*_{TEM-197}.

Tabela 3. Características das cepas clínicas de *K. pneumoniae* contendo genes *bla*_{TEM} que codificam enzimas ESBL.

Cepa	Tipo de Infecção	Setor	ESBL	Ambiente Genético
FSP264/05	colonização (prega axilar)	UTI Adulta	TEM-15	Tn2*
FSP286/05	colonização (swab retal)	Berçário	TEM-197	Tn3
FSP287/05	infecção hospitalar (líquido peritonial)	UTI Neonatal	TEM-197	Tn3

4.1.2 SHV

Em relação aos genes *bla*_{SHV}, dos 33 isolados clínicos positivos, 28 (84,8%) eram *K. pneumoniae*, e os demais eram *E. coli* (4) e *K. oxytoca* (1). Uma cepa de *K. pneumoniae* (FSP286/05) foi negativa para a presença de genes *bla*_{SHV}. A análise do seqüenciamento revelou que 6 isolados de *K. pneumoniae* possuíam mais de um gene *bla*_{SHV}. Os genes *bla*_{SHV} identificados nas cepas clínicas foram: *bla*_{SHV-5} (12), *bla*_{SHV-12} (7), *bla*_{SHV-27} (2), *bla*_{SHV-28} (5), *bla*_{SHV-45} (1), *bla*_{SHV-55} (1) e *bla*_{SHV-110} (2) (Tabela 6). Foram também detectados os genes não codificadores de ESBL *bla*_{SHV-1} (2) e *bla*_{SHV-11} (7).

As cepas contendo genes *bla*_{SHV} estavam distribuídas em todos os setores do hospital, em cepas isoladas de colonizações e infecções hospitalares e comunitárias (Figuras 11 e 12).

Figura 11. Distribuição em porcentagem das cepas produtoras de ESBL do grupo SHV de acordo com o setor hospitalar onde foram isoladas.

Figura 12. Número de cepas produtoras de ESBL do grupo SHV de acordo com o tipo de infecção. IH – Infecção Hospitalar; IC – Infecção Comunitária; Col. – Colonização.

Com relação às duas cepas ambientais de *K. pneumoniae* positivas para *bla*_{SHV}, uma possui o gene *bla*_{OKP-B-13} (FSP1356/09), que codifica uma enzima do grupo OKP – Other *K. pneumoniae* β -lactamases, similar às SHV e não codificadora de ESBL (FEVRE *et al.* 2005), e a outra possui o gene *bla*_{SHV-28} (FSP1271/09), também detectado nas cepas clínicas (Tabelas 5 e 6).

A triagem para detecção da sequência de inserção IS26 resultou em 100% de positividade para as cepas produtoras de SHV. Em relação às integrases, uma cepa de *K. pneumoniae* possuía *int2* (FSP276/05, produtora de SHV-12 e CTX-M-59) e nenhuma foi positiva para a pesquisa de *int3*.

A pesquisa do ambiente genético dos genes *bla*_{SHV} foi realizada por meio de reações de PCR com iniciadores para genes *tnpA* (transposase) da IS26 em conjunto com os iniciadores para *bla*_{SHV}.

O gene *bla*_{SHV-5} foi detectado em 12 cepas clínicas, das quais 7 também carregavam genes codificadores dos grupos TEM e/ou CTX-M-2. As amplificações utilizando os iniciadores IS26 R e SHV-5r resultaram em produtos de cerca de 5kb. A análise do sequenciamento dos mesmos mostrou o gene *bla*_{SHV-5} (5'-3') precedido pelas sequências 3'-5' das regiões abertas de leitura *orf41*, *orf42* e *orf43*, as quais codificam proteínas hipotéticas, e da IS26 (Figura 13A).

O segundo gene mais abundante nas amostras clínicas foi *bla*_{SHV-12}, detectado em 6 cepas de *K. pneumoniae* e uma cepa de *E. coli*. O produto obtido na mesma reação de PCR realizada para SHV-5 foi de 2kb, e o sequenciamento do mesmo também revelou a associação de *bla*_{SHV-12} com IS26, a qual neste caso estava inserida

no promotor de *bla*_{SHV-12} (Figura 13B). Não foram realizadas reações de PCR para verificar se havia relação entre o gene *bla*_{SHV-12} e o integron de classe 2 identificado na cepa FSP276/05, uma vez que o ambiente genético de *bla*_{SHV-12} já havia sido estabelecido.

Não foi possível determinar a associação dos genes *bla*_{SHV-27}, *bla*_{SHV-28}, *bla*_{SHV-45}, *bla*_{SHV-55} e *bla*_{SHV-110} com IS26 por meio dos iniciadores e das reações de PCR utilizadas neste estudo.

Figura 13. Representação esquemática do ambiente genético dos genes *bla*_{SHV-5} e *bla*_{SHV-12}. **A** – Parte da estrutura do transposon (composto) que continha os genes *bla*_{SHV-5}. **B** – Parte da estrutura do transposon (composto) que continha os genes *bla*_{SHV-12}, com a IS26 inserida no promotor.

4.1.3 CTX-M

Dentre os 30 isolados clínicos com amplificações positivas para genes do grupo *bla*_{CTX-M-2}, 26 (86,7%) carregavam o gene *bla*_{CTX-M-2}, enquanto 3 (9,7%) possuíam *bla*_{CTX-M-59}. Além disso, foi identificado um novo gene do grupo CTX-M-2 denominado *bla*_{CTX-M-131} (Quadro 7), com a substituição de aminoácido Asp₂₄₂→Gly em relação a *bla*_{CTX-M-2}, em uma cepa de *Providencia rettgeri* (FSP309/05) (Tabelas 4 e 6).

Os genes do grupo *bla*_{CTX-M-2} estavam distribuídos em todos os setores do hospital, exceto por UTI Neonatal e Clínica Pediátrica, e foram detectados em todas as espécies clínicas do estudo (Figura 14). A Tabela 4 mostra a distribuição das cepas contendo genes do grupo *bla*_{CTX-M-2} de acordo com o tipo de infecção em que foram classificadas.

Figura 14. Distribuição das cepas produtoras de ESBL do grupo CTX-M-2, de acordo com o setor hospitalar onde foram isoladas.

Tabela 4. Número e porcentagem de cepas produtoras de ESBL do grupo CTX-M-2, de acordo com a classificação do tipo de infecção.

Tipo de Infecção	CTX-M-2 n (%)	CTX-M-59 n (%)	CTX-M-131 n (%)	TOTAL n (%)
Infecção Hospitalar	8 (26,7)	1(3,3)	1 (3,3)	10 (33,3)
Infecção Comunitária	5 (16,7)	0 (0)	0 (0)	5 (16,7)
Colonização	13 (43,3)	2 (6,7)	0 (0)	15 (50)
TOTAL	26 (86,7)	3 (10)	1 (3,3)	30 (100)

Das 30 cepas clínicas positivas para genes do grupo CTX-M-2, todas foram positivas para a presença da sequência de inserção *ISCR1*, e destas, 10 (33,3%) possuíam *ISEcp1* e 29 (96,78%) possuíam *IS26*.

A triagem das integrases resultou em 28 (93,3%) cepas positivas para *int1*, seis (20%) positivas para *int2* e nenhuma para *int3*.

A amplificação utilizando os iniciadores *sul* Fw e *qac* Rv (Figura 8) para as cepas contendo *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-59} e *bla*_{CTX-M-131} resultou em amplicons de 3,5kb para todas as cepas, cujas sequências foram analisadas, resultando na estrutura de parte do integron de classe 1 complexo, representada pela Figura 15A. A mesma estrutura foi encontrada em 7 espécies: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *M. morganii*, *P. rettgeri* e *P. stuartii*.

Não foram realizadas reações de PCR para verificar se havia relação entre os genes *bla*_{CTX-M-2} (cepas FSP308/05, FSP318/05, FSP325/05 e FSP332/05), *bla*_{CTX-M-59} (FSP276/05) e *bla*_{CTX-M-131} (FSP309/05) com o integron de classe 2, uma vez que o ambiente genético desses genes já havia sido estabelecido nessas cepas.

Com relação às amostras ambientais, as duas cepas positivas para o grupo CTX-M-1 carregavam o gene *bla*_{CTX-M-15}, enquanto que as 5 cepas positivas para o grupo CTX-M-8 possuíam o gene *bla*_{CTX-M-8} (Tabelas 5 e 6).

As cepas contendo *bla*_{CTX-M-15} foram isoladas da ETE 1, em datas diferentes. A primeira foi uma *K. pneumoniae* isolada de esgoto tratado em junho de 2009, e a segunda uma *E. coli* isolada de esgoto bruto em agosto de 2009. As cepas contendo *bla*_{CTX-M-8} foram recuperadas de cinco ETES diferentes (incluindo ETE 1), em datas

distintas, nos três tipos de amostra: esgoto bruto, esgoto tratado e lodo de esgoto (Tabela 5).

As cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* que carreavam o gene *bla*_{CTX-M-15}, isoladas da ETE 1, também possuíam os elementos IS26, *ISEcp1* e integron de classe 1.

A amplificação utilizando os iniciadores *ISEcp1* Fw e CTX-M-1 Rv resultou em um produto de aproximadamente 3kb, cujo sequenciamento revelou que a *ISEcp1* (5'-3'), truncada pela IS26 (3'-5'), estava associada ao gene *bla*_{CTX-M-15} (5'-3'), como representado na Figura 15B.

O gene *bla*_{CTX-M-8} foi detectado em 5 cepas, isoladas de 5 ETes diferentes (Tabelas 1 e 5). Os elementos mobilizáveis detectados foram IS26 (100%), *ISEcp1* (80%) e integrons de classe 1 (80%). As amplificações dos genes *bla*_{CTX-M-8} com *ISEcp1* pela PCR foram todas negativas, enquanto que com IS26 (IS26 Rv com CTX-M-8 Rv) resultaram em um produto com cerca de 3kb. O sequenciamento do mesmo revelou a presença da IS26 (3'-5'), truncando a sequência da IS10 (3'-5'), a qual precedia o gene *bla*_{CTX-M-8} (5'-3') (Figura 15C).

Figura 15. Representação esquemática do ambiente genético dos genes bla_{CTX-M} .

A – Parte da estrutura do integron de classe 1 complexo que continha os genes $bla_{CTX-M-2}$, $bla_{CTX-M-59}$ e $bla_{CTX-M-131}$ (grupo $bla_{CTX-M-2}$). **B** – Estrutura de ligação entre o gene $bla_{CTX-M-15}$ e as sequências de inserção $ISEcp1$ e $IS26$. **C** - Estrutura de ligação entre o gene $bla_{CTX-M-8}$ e as sequências de inserção $IS26$ e $IS10$. (t) = sequência truncada.

Tabela 5. Cepas ambientais isoladas no estudo, de acordo com o local de isolamento, tipo de amostra, enzimas ESBL detectadas e grupos de incompatibilidade plasmidial (Inc).

Cepa	Local	Amostra	ESBL	Grupo Inc
FSP1271/09	ETE 1	esgoto tratado	CTX-M-15 e SHV-28	não tipável por PBRT
FSP1314/09	ETE 1	esgoto bruto	CTX-M-15	FIA e FIB
FSP1312/09	ETE 1	esgoto bruto	CTX-M-8	II
FSP1333/09	ETE 2	esgoto tratado	CTX-M-8	II
FSP1356/09	ETE 3	esgoto bruto	CTX-M-8	L/M
FSP1373/09	ETE 4	lodo de esgoto	CTX-M-8	II e F
FSP1471/09	ETE 5	lodo de esgoto	CTX-M-8	L/M

Números de Acesso ao GenBank

O Quadro 7 apresenta os números de acesso no banco de dados *GenBank* das sequências de nucleotídeos e aminoácidos para os novos genes relatados no estudo, bem como para os genes relatados pela primeira vez no Brasil.

Quadro 7. Relação dos números de acesso ao banco de dados *GenBank* para os genes novos e genes relatados pela primeira vez no Brasil.

Número de Acesso	Cepas	Gene
HQ877606	FSP286/05	<i>bla</i> _{TEM-197}
HQ877607	FSP264/05	<i>bla</i> _{TEM-15}
JN969893	FSP309/05	<i>bla</i> _{CTX-M-131}
HQ877613	FSP317/05	<i>bla</i> _{SHV-55}
HQ877615	FSP264/05	<i>bla</i> _{SHV-110}

4.2 Tipagem Plasmidial por PBRT

Entre os isolados clínicos, o grupo de incompatibilidade mais comum foi IncA/C, detectado em todos os setores do hospital, em 17 (37%) cepas, das quais 14 (30,4%) possuíam genes *bla*_{SHV}. O segundo grupo mais frequente foi IncF e variantes, detectados em seis dos dez setores do hospital, em 11 (24,4%) cepas contendo tanto genes *bla*_{CTX-M-2} como *bla*_{SHV} (Tabela 6).

Os demais grupos Inc detectados foram H11 (3), H12 (3), I1 (1), L/M (5), K (1), N (1), P (4), W (1) e Y (2), distribuídos por todos os setores do hospital. Havia cepas contendo 1 a 5 grupos Inc, e 12 (26,7%) cepas não eram tipáveis pelo método de PBRT, das quais 11 (24,4%) possuíam genes do grupo *bla*_{CTX-M-2} (Tabela 6).

Com relação aos 7 isolados ambientais, os grupos detectados foram IncF (2), II (3) e L/M (2). Um isolado de *K. pneumoniae* que continha *bla*_{CTX-M-15} não era tipável pelo método de PBRT (Tabela 5).

4.3 Detecção e Determinação do Tamanho dos Plasmídios

A técnica de S1-PFGE revelou a presença de plasmídios de alto peso molecular em 38 (84,4%) isolados clínicos (48,5 a 388kb) e 7 (100%) isolados ambientais (48,5 a 209kb) (Figura 16).

Figura 16. Eletroforese em campo pulsado após a digestão com S1 nuclease. Linha 1 – marcador de peso molecular Lambda PFG Marker, bandas entre 48,5kb e 727,5kb. Linhas 2 a 15 – amostras de cepas de enterobactérias contendo plasmídios de alto peso molecular. Linha 16 - marcador de peso molecular MidRange PFG Marker I, bandas entre 15kb e 242,5kb.

Tabela 6. Conjuntos de genes *bla*_{ESBL} e respectivos ambientes genéticos, grupos de incompatibilidade plasmidial (Inc) e plasmídios de alto peso molecular.

<i>bla</i>	Ambiente Genético	Cepas FSP		Grupos Inc	Plasmídios de Alto PM (kb)
Clínicas					
CTX-M-2	Integron de Classe 1 Complexo (Figura 11A)	201/05	<i>Proteus mirabilis</i>	A/C FIC	179
		205/05	<i>Escherichia coli</i>	F FIB H12 P Y	48,5 / 97 / 291
		209/05	<i>Morganella morganii</i>	não tipável	não possui
		253/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	não tipável	>339,5
		259/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	não tipável	>339,5
		265/05	<i>Escherichia coli</i>	A/C FIA FIB	97 / 145,5 / 339,5 / 388
		269/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	K	194 / 436,5
		308/05	<i>Morganella morganii</i>	não tipável	não possui
		314/05	<i>Escherichia coli</i>	H11 P	97 / 242,5
		316/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	não tipável	242,5
		318/05	<i>Providencia stuartii</i>	A/C W	160,5; 339,5
		325/05	<i>Morganella morganii</i>	não tipável	não possui
		326/05	<i>Escherichia coli</i>	F FIB	145,5
		328/05	<i>Escherichia coli</i>	F FIB	145,5
		332/05	<i>Morganella morganii</i>	não tipável	não possui
CTX-M-2 SHV-5	Integron de Classe 1 Complexo (Figura 11A) IS26 e <i>orf41</i> , <i>orf42</i> e <i>orf43</i> (Figura 10A)	246/05	<i>Escherichia coli</i>	A/C	82 / 145,5
		262/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	F	48,5 / 97 / 194
		306/05	<i>Escherichia coli</i>	H11	130,5 / 209
CTX-M-2 SHV-12	Integron de Classe 1 Complexo (Figura 11A) IS26 inserida no promotor (Figura 10B)	220/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/C	48,5 / 97 / 145,5 / 209
CTX-M-2 SHV-28	Integron de Classe 1 Complexo (Figura 11A) desconhecido	202/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	não tipável	145,5 / <291
		211/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/C	112 / 194
		234/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/C	48,5 / 82 / 145,5
		324/05	<i>Klebsiella oxytoca</i>	FIIs H11	145,5 / 242,5 / 388
CTX-M-2 SHV-28 SHV-55 ^a	Integron de Classe 1 Complexo (Figura 11A) desconhecidos	317/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/C	63,5 / 112 / 209
CTX-M-2 SHV-27 SHV-45	Integron de Classe 1 Complexo (Figura 11A) desconhecidos	208/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/C	97 / 145,5
CTX-M-2 SHV-110 ^a TEM-15 ^a	Integron de Classe 1 Complexo (Figura 11A) desconhecido Tn2* (Figura 9A)	264/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	não tipável	130,5 / 291
CTX-M-59 SHV-12	Integron de Classe 1 Complexo (Figura 11A) IS26 inserida no promotor (Figura 10B)	276/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/C	82 / 145,5 / 160,5

<i>bla</i>	Ambiente Genético	Cepas FSP		Grupos Inc	Plasmídios de Alto PM (kb)
CTX-M-59 SHV-27	Integron de Classe 1 Complexo (Figura 11A) desconhecido	248/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/C	160,5 / 209
CTX-M-59 SHV-110 ^a	Integron de Classe 1 Complexo (Figura 11A) desconhecido	237/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	não tipável	não possui
CTX-M-131 ^b	Integron de Classe 1 Complexo (Figura 11A)	309/05	<i>Providencia rettgeri</i>	não tipável	112 / 145,5
SHV-5	IS26 e <i>orf41</i> , <i>orf42</i> e <i>orf43</i> (Figura 10A)	224/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	FIIs	48,5 / 97 / 194 / 209
		225/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	não tipável	48,5 / 97
		226/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	FIIs	48,5 / 97 / 209
		243/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	L/M	48,5 / 97 / 291
		274/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	L/M	48,5 / 97 / 291
		275/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/C	48,5 / 82 / 145,5 / 160,5
		295/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/C	48,5 / 82 / 130,5 / 145,5 / 291
		305/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/C	97 / 194
SHV-12	IS26 inserida no promotor (Figura 10B)	214/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/C H12	não possui
		227/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/C	194 / 209
		263/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/C H12	não possui
		267/05	<i>Escherichia coli</i>	L/M P Y	48,5
		315/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	FIIs L/M	48,5 / 63,5 / 97 / 112
SHV-5 TEM-197 ^b	IS26 e <i>orf41</i> , <i>orf42</i> e <i>orf43</i> (Figura 10A) Tn3 (Figura 9B)	287/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/C	48,5 / 82 / 179 / >291
TEM-197 ^b	Tn3 (Figura 9B)	286/05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	L/M	>63,5 / 97 / 112
Ambientais					
CTX-M-8	IS26 e IS10 (Figura 11C)	1312/09	<i>Escherichia coli</i>	I1	48,5
		1333/09	<i>Escherichia coli</i>	I1	82
		1356/09	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	L/M	63,5 / 160,5
		1373/09	<i>Escherichia coli</i>	I1 F	97 / 130,5
		1471/09	<i>Enterobacter cloacae</i>	L/M	63,5 / 145,5
CTX-M-15	ISEcp1 e IS26 (Figura 11B)	1314/09	<i>Escherichia coli</i>	FIA FIB	112
CTX-M-15 SHV-28	ISEcp1 e IS26 (Figura 11B) desconhecido	1271/09	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	não tipável	<130,5 / 209

^aPrimeiro relato no Brasil; ^bNovos genes ESBL; PM – peso molecular.

5. DISCUSSÃO

A resistência antimicrobiana é classificada pela Organização Mundial da Saúde como uma ameaça à saúde pública, impulsionada tanto pelo uso adequado como inadequado de medicamentos anti-infecciosos utilizados na saúde humana e animal bem como na produção de alimentos e, ainda, com medidas inapropriadas para controlar a disseminação de infecções (OMS 2013). É um problema que aumenta a morbidade, a mortalidade e os custos de tratamento (HAWKEY & JONES 2009). A resistência em amostras e ambientes diversos além da clínica é o foco principal das pesquisas atualmente, uma vez que a presença de genes de resistência na natureza e nos alimentos pode levar à disseminação dos mesmos para toda a população, tornando o tratamento das infecções ainda mais desafiador do que já se apresenta (GARCIA-ALVAREZ *et al.* 2012, STALDER *et al.* 2012).

O índice de β -lactamases de espectro estendido - uma das formas mais combatidas de resistência em bactérias Gram negativas no mundo - em *K. pneumoniae* e *E. coli* na América Latina é 50% e 26%, respectivamente (GALES *et al.* 2012), e está abaixo apenas de países superpopulosos como a Índia e a China, com 80% e 60% em média para as duas espécies juntas (LIVERMORE 2012). De acordo com os últimos dados referentes à América Latina divulgados pelo programa mundial de vigilância à resistência SENTRY (*SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*), os índices de ESBL em *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas no Brasil são de 12,8% e 49,9%, respectivamente (GALES *et al.* 2012).

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam a disseminação de genes codificadores de ESBL em uma instituição pública de saúde e em estações de

tratamento de esgoto da Grande São Paulo. O foco principal deste estudo foi demonstrar que tanto a identificação de genes codificadores de ESBL como a determinação de seu ambiente genético são ferramentas importantes na análise da disseminação da resistência, uma vez que se o gene está presente em cepas de espécies ou perfis genéticos diferentes, e/ou foi detectado em locais distintos, ou ainda fizer parte de uma estrutura genética mobilizável, sugere-se que possa ter havido algum tipo de evento de transferência horizontal que levou à disseminação do mesmo.

A razão deste estudo ter recuperado apenas sete cepas ambientais produtoras de ESBL, dentre 200 pesquisadas, pode ter sido devido ao fato de que no ambiente estas cepas estejam diluídas, ou seja, em densidades menores, e portanto mais difíceis de serem isoladas. Além da baixa recuperação de cepas resistentes nas amostras ambientais, as plataformas genéticas detectadas em cepas clínicas e naquelas isoladas de amostras de esgoto foram distintas, apesar do fato das ETEs receberem esgotos contendo dejetos oriundos tanto de instituições de saúde como da população em geral. Isto pode ter ocorrido devido à diferença entre as épocas de isolamento das cepas, que tiveram um intervalo de 4 anos. Outro fator responsável por esses resultados pode ter sido o fato de que as amostras provenientes das ETEs foram cultivadas, com posterior isolamento das cepas. O ambiente contém uma vasta variedade de espécies bacterianas, e os métodos de cultivo só permitem o isolamento de uma pequena fração delas, em torno de 1%. Atualmente, a combinação de métodos de cultivo com técnicas baseadas no estudo do metagenoma do ambiente tem evitado esta limitação e evidenciado a disseminação da resistência de uma forma mais próxima à realidade (STALDER *et al.* 2012).

5.1 Genes *bla*_{TEM}

Os genes codificadores das beta-lactamases do grupo TEM identificados neste estudo, na sua grande maioria, não codificam enzimas ESBL (*bla*_{TEM-1A}, *bla*_{TEM-1B}), exceto por *bla*_{TEM-15} e *bla*_{TEM-197}. Os genes *bla*_{TEM-1A} e *bla*_{TEM-1B} codificam penicilinasas precursoras das ESBL, e diferem entre si apenas por mutações silenciosas em seus genes (BRADFORD 2001). Uma vez que todas as cepas incluídas no estudo são produtoras de ESBL, a maioria das cepas positivas para os genes *bla*_{TEM} estavam associadas a outros genes *bla*_{ESBL}.

A enzima TEM-15 difere de TEM-1 por duas substituições de aminoácidos (Glu₁₀₄→Lys e Gly₂₃₈→Ser) e de TEM-3 por apenas uma substituição (Lys₃₉→Gln), fatores que aumentam sua atividade catalítica e a caracterizam como ESBL. A produção de TEM-15 já foi relatada em diversos trabalhos na Europa e Ásia, em espécies da família *Enterobacteriaceae* (SHANNON *et al.* 1998; ARPIN *et al.* 2003; KIM *et al.* 2004; SEGATORE *et al.* 2004; ARPIN *et al.* 2005; ZARNAYOVÁ *et al.* 2005; CACCAMO *et al.* 2006; CHOUGHANI *et al.* 2007; PERILLI *et al.* 2011) e em *Haemophilus influenzae* (TRISTRAM *et al.* 2008), em isolados de ambientes hospitalares e na comunidade. Contudo, de acordo com a literatura consultada, este é o primeiro relato de TEM-15 na América Latina, o que mostra sua disseminação para mais um continente.

Os resultados deste estudo mostram que o gene *bla*_{TEM-15} está associado a um transposon descrito na literatura como Tn2*, o qual possui alta similaridade com TnI e Tn3, e cujo gene *tnpR* é quase idêntico ao do Tn2. O elemento Tn2* é um transposon mosaico que surgiu após eventos de recombinação homóloga seguida de

recombinação mediada pela resolvase, e foi identificado em um plasmídio de alto peso molecular contendo genes de resistência a antimicrobianos e mercúrio (PARTRIDGE & HALL 2004). Sendo assim, o gene *bla*_{TEM-15} identificado neste estudo está associado a um elemento mobilizável que poderia estar localizado em um plasmídio de alto peso molecular, uma vez que a cepa de *K. pneumoniae* FSP264/05 possui plasmídios de 130,5kb e 291kb. Outro fato relevante em relação a esta cepa é que também possui os genes *bla*_{SHV-110} e *bla*_{CTX-M-2}, sendo que o último foi detectado em diversas espécies e setores diferentes do hospital em estudo, o que sugere que foi disseminado por meio de transferência horizontal, e portanto poderia carrear os genes *bla*_{TEM-15} e *bla*_{SHV-110} no mesmo plasmídio. Sendo assim, mesmo que este estudo não tenha determinado a localização dos genes *bla*, é possível que possa ocorrer a mobilização dos mesmos para outras bactérias em caso de pressão seletiva de antimicrobianos.

A nova enzima TEM-197, com a substituição de aminoácidos Ala₁₈₄→Val em relação à TEM-15, foi identificada em dois isolados de *K. pneumoniae* não relacionados geneticamente (FSP286/05 e FSP287/05), de dois pacientes distintos, e de unidades hospitalares diferentes. TEM-197 foi identificada tanto em combinação com SHV-5 (Tabela 6), expressando valores altos de CIM para cefalosporinas de terceira geração e aztreonam (>256µg/mL), como isoladamente em outra cepa, com valores mais baixos de CIM, mas ainda altos o suficiente para caracterizar esta cepa como resistente a ceftazidima (CIM = 32µg/mL) e cefotaxima (CIM = 12µg/mL), e com sensibilidade intermediária ao aztreonam (CIM = 12µg/mL), e positiva para o teste de produção fenotípica de ESBL (Tabela 1) (CLSI 2012). Contudo, estudos

adicionais serão necessários para a caracterização bioquímica completa da nova enzima.

O gene *bla*_{TEM-197} está associado ao elemento Tn3, o qual possui “imunidade de transposição” e faz “transposição de extremidade única”, ou seja, possui um mecanismo regulatório para que não haja mais de duas cópias no mesmo plasmídio, ao mesmo tempo que consegue se mobilizar a partir de uma só extremidade (CARATOLLI 2009; TOLEMAN & WALSH 2011). As duas cepas produtoras de TEM-197 possuíam plasmídios de grupos Inc diferentes (IncA/C e IncL/M), porém ensaios de localização e mobilidade do gene *bla*_{TEM-197} seriam necessários para afirmar se estão contidos nesses plasmídios especificamente. O fato de ambas as cepas possuírem diversos plasmídios de alto peso molecular, porém, reforça a suspeita de que *bla*_{TEM-197} tenha sido mobilizado por transferência horizontal.

5.2 Genes *bla*_{SHV}

A família SHV de enzimas ESBL é predominante em estudos de cepas resistentes na América do Sul e pode estar presente em nosso continente desde antes da primeira descrição de uma ESBL (KLIEBE *et al.* 1985, VILLEGAS *et al.* 2008). Em relação à sua distribuição mundial, muitas variantes foram descritas apenas uma ou duas vezes, porém SHV-2, -5, -11 e -12 estão disseminadas em muitos países (PATERSON & BONOMO 2005; LIVERMORE 2012). Há um consenso de que a espécie *K. pneumoniae* possui naturalmente genes *bla*_{SHV-1} ou variantes do mesmo (BABINI & LIVERMORE 2000; CHAVES *et al.* 2001; HOWARD *et al.* 2002; HAMMOND *et al.* 2008), e no presente estudo apenas uma de 31 cepas não continha genes do grupo *bla*_{SHV}. Apenas duas destas cepas possuíam *bla*_{SHV-1}, enquanto que as

outras 29 possuíam variantes deste gene, como *bla*_{SHV-5}, *bla*_{SHV-11}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-27}, *bla*_{SHV-28}, *bla*_{SHV-45}, *bla*_{SHV-55} e *bla*_{SHV-110}, todos com exceção de *bla*_{SHV-11} codificando enzimas de espectro estendido.

O fato do gene *bla*_{SHV-1} não ter sido detectado em todas as cepas de *K. pneumoniae* corrobora com os estudos realizados por CHAVES *et al.* (2001) e HOWARD *et al.* (2002), os quais utilizam hibridização/PCR-RFLP e análise de sequenciamento, respectivamente, para a identificação dos genes *bla*_{SHV-1} de coleções de *K. pneumoniae*, e de forma semelhante a este estudo detectaram apenas variantes de *bla*_{SHV-1} em algumas cepas. Em relação à única cepa de *K. pneumoniae* (FSP286/05) da qual não foi possível amplificar genes do grupo *bla*_{SHV} com a metodologia aplicada neste trabalho, estudos futuros com novos iniciadores e/ou diferentes reações de PCR poderiam elucidar esta questão.

De todas as enzimas SHV identificadas, SHV-5 foi predominante e é de fato relatada na literatura como a mais disseminada na América Latina, e seu espectro estendido se deve às substituições de aminoácidos Leu₂₀₅→Arg e Glu₂₄₀→Lys em relação à SHV-3 (BILLOT-KLEIN *et al.* 1990; VILLEGAS *et al.* 2008). O gene *bla*_{SHV-5} foi identificado isoladamente em 8 cepas de *K. pneumoniae*, provenientes de três unidades hospitalares pediátricas (UTI Neonatal, Berçário e Clínica Pediátrica). Além disso, foi identificado também em associação com outros genes *bla*_{ESBL}, tanto em *K. pneumoniae* como em *E. coli*, o que mostra seu potencial de mobilidade entre as cepas (Tabelas 1 e 6).

A enzima SHV-12 difere da SHV-5 apenas pela substituição Leu₃₅→Gln (NÜESCH-INDERBINEM *et al.* 1997), e foi descrita pela primeira vez no Brasil por

TOLLENTINO *et al.* (2011), em cepas clínicas de *K. pneumoniae*. Em nosso estudo, foi identificada em *K. pneumoniae* e *E. coli*, em cinco setores hospitalares (Ambulatório, Pronto Socorro, Clínica Médica, Clínica Cirúrgica e UTI Pediátrica), e portanto também demonstrou seu potencial de disseminação nas cepas isoladas na instituição (Tabelas 1 e 6).

Os ambientes genéticos onde estavam contidos os genes *bla*_{SHV-5} (Figura 13A) e *bla*_{SHV-12} (Figura 13B) são conhecidos como “grande transposon” e “pequeno transposon”, respectivamente, como já descrito anteriormente. Portanto, possuem promotores fortes frequentemente identificados em plasmídios, tanto de *K. pneumoniae* como outras *Enterobacteriaceae*, o que sugere que sua localização seja plasmidial, uma vez que a expressão do gene no cromossomo não seria suficiente para resultar no fenótipo ESBL (HAMMOND *et al.* 2008; TURNER *et al.* 2009). Sendo assim, apesar da localização dos genes não estar definida neste estudo, é provável que *bla*_{SHV-5} e *bla*_{SHV-12}, especialmente nas cepas que não possuem outros genes ESBL, estejam localizados em plasmídios.

Plasmídios do grupo IncA/C, bem como plasmídios de 48,5kb e 97kb, foram detectados com frequência nas cepas produtoras de SHV-5 e SHV-12, porém não é possível afirmar que estejam associados e esses genes. Para isso, seriam necessários ensaios de mobilização e/ou localização genética.

A ESBL SHV-27 foi descrita no Brasil em 2001, em uma cepa clínica de *K. pneumoniae*, e possui uma substituição de aminoácido Gly₁₆₀→Asp, além de algumas mutações genéticas silenciosas, em relação à SHV-1 (CORKILL *et al.* 2001). A enzima tem sido relatada em alguns países africanos e asiáticos, inclusive

em amostras isoladas de animais (LIN *et al.* 2006; KIRATISIN *et al.* 2008; HAMMAD & SHIMAMOTO 2011; ZOU *et al.* 2011; JIANG *et al.* 2012), porém não teve mais relatos na América Latina. Neste estudo, foi identificada em 2 cepas de *K. pneumoniae* de setores hospitalares distintos, associada a CTX-M-59 ou CTX-M-2 + SHV-45. O gene *bla*_{SHV-45} foi descrito em 2002 também no Brasil (AF547625) e codifica uma ESBL com a substituição Gly₁₆₀→Asp (como a SHV-27), Gly₂₃₈→Ser e Glu₂₃₉→Lys (como a SHV-5). Aparentemente, com exceção de *bla*_{CTX-M-2}, apenas genes descritos no Brasil estavam presentes nestas cepas, e curiosamente ambas possuíam plasmídios do grupo IncA/C, o qual foi o mais frequente entre as cepas clínicas do estudo (37%) e recentemente foi relatado como possível agente disseminador dos genes *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-59} no Brasil (QUEIROZ *et al.* 2012).

A ESBL SHV-28 possui as substituições Tyr₇→Phe e Asp₁₅₆→Gly em relação à SHV-27, com preferência para os substratos cefotaxima e ceftazidima (JEMIMA & VERGHESE 2009). No Brasil, foi relatada pela primeira vez em 2011, em uma cepa clínica de *K. pneumoniae* que não expressava o fenótipo ESBL (VERAS *et al.* 2011). No presente estudo, *bla*_{SHV-28} foi detectado em cepas clínicas de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, associado aos genes *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{SHV-55}. A enzima SHV-28 também foi detectada em associação com CTX-M-15 em uma cepa de *K. pneumoniae* isolada do esgoto tratado da ETE 1 (FSP1271/09), sendo este o primeiro relato desta enzima em amostras ambientais. Ao contrário da cepa descrita por VERAS *et al.* (2011), as cepas deste estudo possuíam o fenótipo ESBL e CIM maiores para ceftazidima (de 1µg/mL para 3 a >256µg/mL) e cefotaxima (de 0,5µg/mL para 32 a >256µg/mL), uma vez que estavam todas associadas a genes *bla*_{CTX-M}.

Apesar de não ter sido possível determinar o ambiente genético dos genes *bla*_{SHV-28}, é possível que tenha havido a disseminação dos mesmos da clínica para o ambiente, por meio do descarte de esgoto hospitalar. Não se pode descartar, entretanto, a hipótese do gene ter sido levado da natureza ou da comunidade para o ambiente hospitalar, ou ainda de ter surgido em eventos independentes, como mutações de outros genes *bla*_{SHV} em cepas presentes nos dois locais (hospital e ETE 1). Uma vez que a cepa ambiental FSP1271/09, que também continha o gene *bla*_{CTX-M-15}, não é clone de nenhuma das cepas clínicas produtoras de SHV-28, os plasmídios de alto peso molecular detectados em todas essas cepas podem ter sido os responsáveis pela disseminação, caso essa tenha realmente ocorrido. O fato deste gene ter sido encontrado em uma amostra de esgoto tratado demonstra que o reuso dos produtos oriundos das ETEs necessita de protocolos que incluam a pesquisa de genes de resistência, para que seja possível evitar a disseminação para outras fontes.

O presente estudo identificou também o gene *bla*_{SHV-55}, o qual codifica a enzima SHV-55 que possui três substituições de aminoácidos em relação à SHV-1, Tyr₇→Phe, Gly₂₃₈→Ser e Glu₂₃₉→Lys, sendo que Gly₂₃₈→Ser é a mesma substituição que ocorre na SHV-5, e provavelmente é a responsável pelos altos valores de CIM para cefalosporinas de terceira e quarta geração e aztreonam. A cepa clínica de *K. pneumoniae* FSP317/05, que carregava os genes codificadores de SHV-28, SHV-55 e CTX-M-2, possuía valores de CIM maiores que 256µg/mL para ceftazidima, cefotaxima, cefepime, aztreonam e piperacilina-tazobactam (Tabela 1). Além disso, a cepa possuía três plasmídios de alto peso molecular, os quais poderiam mobilizar todos estes genes em caso de pressão seletiva de antimicrobianos. Este é o

primeiro relato de SHV-55 fora de Portugal, mostrando a disseminação de mais um gene *bla*_{ESBL} no Brasil (MENDONÇA *et al.* 2008; MENDONÇA *et al.* 2009).

A ESB� SHV-110 possui a substituição Gly₁₅₆→Asp e foi identificada em uma cepa de *K. pneumoniae* isolada de queijo egípcio no Japão (HAMMAD *et al.* 2009). Recentemente, foi detectada pela primeira vez em uma cepa clínica, um isolado de *K. pneumoniae* no Marrocos (BARGUIGUA *et al.* 2012). Portanto este é o terceiro relato de SHV-110 no mundo. No presente estudo, a enzima foi identificada em duas situações distintas, em cepas de *K. pneumoniae*: a primeira associada a CTX-M-59, em uma cepa isolada na UTI Semi-Intensiva, em outubro de 2004 (FSP237/05); no segundo caso, SHV-110 estava associada a TEM-15 e CTX-M-2, em uma cepa isolada na UTI Adulta, dois meses depois (FSP264/05), com valores de CIM mais altos que no primeiro caso para ceftazidima (de 8 para 64µg/mL) e cefepime (de 64 para 256µg/mL). A primeira cepa não possuía plasmídios de alto peso molecular (possuía apenas um plasmídio de aproximadamente 9kb detectado pela extração por kit comercial - dados não apresentados) e teve resultado negativo para os grupos Inc detectáveis pela técnica de PBRT, enquanto que a segunda, também negativa para PBRT, possuía plasmídios de 130,5kb e 291kb. Não é possível saber, com estes resultados, se ocorreram dois casos isolados de detecção do gene *bla*_{SHV-110}, o que seria raro, ou se a primeira cepa recebeu plasmídios por transferência horizontal e passou por algum evento de mobilização, por meio dos elementos móveis associados aos demais genes detectados nestas cepas, e transferiu o plasmídio contendo *bla*_{SHV-110} para a segunda cepa onde foi detectado.

Uma vez que não foi possível determinar o ambiente genético dos genes *bla*_{SHV-27}, *bla*_{SHV-28}, *bla*_{SHV-45}, *bla*_{SHV-55} e *bla*_{SHV-110}, seriam necessários ensaios de mobilização genética para determinar se estão localizados em plasmídios ou no cromossomo dos isolados de *Klebsiella* spp. Contudo, todas essas cepas exceto FSP237/05 possuíam plasmídios de alto peso molecular (48,5kb a 388kb), os quais podem ser conjugativos, haja visto que as cepas em questão estavam distribuídas em diversos setores da instituição estudada (Figura 11). Além disso, a maioria destas cepas (exceto as produtoras de SHV-110) possuía plasmídios do grupo IncA/C, o qual foi o mais frequente entre as cepas clínicas neste estudo (Tabela 6).

5.3 Genes *bla*_{CTX-M}

O presente estudo detectou genes do grupo *bla*_{CTX-M-2} (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-59} e *bla*_{CTX-M-131}) em cepas de diversas espécies isoladas de pacientes em diversas alas de um hospital, entre julho de 2004 e julho de 2005 (Tabela 1, Figura 14).

A família de β -lactamases CTX-M é composta por 5 grupos, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25, além de algumas enzimas isoladas. Apesar de terem sido descritas primeiramente na Europa, foi na América do Sul que se tornaram prevalentes, onde genes do grupo *bla*_{CTX-M-2} são os mais frequentes (ROSSOLINI *et al.* 2008; VILLEGAS *et al.* 2008; LIVERMORE 2012). Foram detectados na Argentina, em 1989 (BAUERNFEIND *et al.* 1992), e posteriormente disseminados para diversos países latinos, incluindo o Brasil, onde são considerados endêmicos. Este estudo é mais um relato do gene *bla*_{CTX-M-2} em cepas clínicas no Brasil, entre diversos publicados recentemente, mostrando que sua disseminação permanece ocorrendo em nossas instituições (VILLEGAS *et al.* 2008; FERNANDES

et al. 2009; PEIRANO *et al.* 2009; PICÃO *et al.* 2009; CLÍMACO *et al.* 2010; LOPES *et al.* 2010; CHAGAS *et al.* 2011; TOLLENTINO *et al.* 2011; QUEIROZ *et al.* 2012; ZAVASCKI *et al.* 2012).

Além de *bla*_{CTX-M-2}, o gene *bla*_{CTX-M-59} também foi detectado nas cepas clínicas deste trabalho, associado a *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-27} e *bla*_{SHV-110}. CTX-M-59 possui a substituição His₈₉→Leu em relação a CTX-M-2, e foi caracterizada em um estudo brasileiro, em meio a um surto de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-2 (DE OLIVEIRA GARCIA *et al.* 2009). Sua disseminação no Brasil foi recentemente associada a plasmídios do grupo IncA/C, os quais foram detectados em 2 das 3 cepas contendo *bla*_{CTX-M-59} deste trabalho (QUEIROZ *et al.* 2012).

Este estudo também identificou o novo gene *bla*_{CTX-M-131}, que codifica uma ESBL com a substituição Asp₂₃₉→Gly em relação à CTX-M-2, em um isolado de *Providencia rettgeri* (FSP309/05). Esta substituição é encontrada também na enzima CTX-M-43, porém na última há também a substituição Ser₂₇₂→Arg, a qual não está presente na nova sequência de aminoácidos. A cepa possui altos valores de CIM para cefotaxima (256µg/mL), cefepime (64µg/mL) e amoxicilina/clavulanato (128µg/mL), a última provavelmente devido à produção concomitante de AmpC β-lactamase cromossômica. A alta taxa de mobilidade dos genes *bla*_{CTX-M-2} entre os isolados de diversas espécies, bem como a pressão seletiva de antimicrobianos, são as causas mais prováveis do surgimento de um novo gene, devido a eventos de mutação. Apesar de não ter sido detectado nenhum grupo Inc por PBRT nesta cepa, a mesma possui plasmídios de 112kb e 145,5kb. Se o gene *bla*_{CTX-M-131} estiver

localizado em algum destes plasmídios, pode ter sido disseminado por transferência horizontal.

Os genes do grupo *bla*_{CTX-M-2} deste estudo faziam parte de uma estrutura denominada integron de classe 1 complexo, um elemento que além de adquirir cassetes genéticos de resistência integrando os mesmos em sua região variável por meio de recombinação sítio-específica, se tornou móvel devido à presença da *ISCR1*, a qual pode mover grandes porções de DNA (TOLEMAN & WALSH 2011; CANTÓN *et al.* 2012; STALDER *et al.* 2012).

A presença de genes do grupo *bla*_{CTX-M-2} em integrons de classe 1 complexos já foi relatada algumas vezes na América Latina, porém este é o primeiro relato no Brasil, mostrando a disseminação de uma estrutura de resistência altamente mobilizável em nosso país (POWER *et al.* 2005; VIGNOLI *et al.* 2006; QUIROGA *et al.* 2007).

Na época do isolamento das cepas produtoras de enzimas do grupo CTX-M-2 deste estudo, já havia sido observado que eram mais comuns em cepas de espécies variadas ou geneticamente distintas, sugerindo-se que poderia ter ocorrido um surto de genes *bla*_{CTX-M} na instituição (DROPA *et al.* 2009). Ainda que não se tenha determinado que os integrons de classe 1 complexos contendo *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-59} ou *bla*_{CTX-M-131} estivessem localizados em plasmídios, é possível que estes elementos tenham se mobilizado para os plasmídios de alto peso molecular presentes nessas cepas e que tenham sido transferidos por conjugação. As cepas de *M. morganii* e uma cepa de *K. pneumoniae* (FSP237/05) contendo essa estrutura não possuíam plasmídios de alto peso molecular e/ou tiveram resultados negativos para a técnica de

PBRT, e como não eram clones podem ter recebido o elemento por conjugação por meio de um plasmídio mobilizável (baixo peso molecular) e grupo Inc não detectável por PBRT, ou ainda o elemento pode ter se integrado em seu DNA cromossômico.

Como se pode observar nas Figuras 11 e 14, genes do grupo CTX-M-2 foram menos frequentes em setores pediátricos do hospital, nos quais foram detectados mais genes do grupo SHV. Pode ter ocorrido, em alguns casos, que cepas contendo plasmídios do mesmo grupo de incompatibilidade (grupo IncA/C, por exemplo), localizadas em setores distintos, não tenham tido êxito na conjugação de seus plasmídios, por serem do mesmo grupo Inc.

A epidemiologia das enzimas CTX-M envolve tanto disseminação plasmidial como sucesso clonal. Um exemplo disso é a disseminação de CTX-M-15 de formas diferentes em *K. pneumoniae* e *E. coli*: em *K. pneumoniae*, o gene *bla*_{CTX-M-15} é geralmente transferido por plasmídios do grupo IncF para cepas geneticamente distintas, sem grande sucesso na disseminação clonal, enquanto que cepas da linhagem ST₁₃₁ de *E. coli* contendo plasmídios IncF carreadores de *bla*_{CTX-M-15} estão distribuídas mundialmente. Não se sabe ao certo se uma ST₁₃₁ progenitora adquiriu o plasmídio e se disseminou, ou se esta linhagem de células adquiriu repetidamente plasmídios IncF-CTX-M-15 (LIVERMORE 2012). Plasmídios IncF não são exclusivos do clone ST₁₃₁, podendo estar presentes em outras linhagens de *E. coli* (CARATTOLI 2009).

Neste estudo, foram identificadas duas cepas produtoras de CTX-M-15, uma *E. coli* e uma *K. pneumoniae*, ambas isoladas da ETE 1. A cepa de *K. pneumoniae* FSP1271/09 era proveniente de uma amostra de esgoto tratado e possuía também

SHV-28, identificada em 5 cepas clínicas deste estudo, e foi negativa para a técnica de PBRT. A cepa de *E. coli* FSP1314/09 foi isolada do esgoto bruto da mesma ETE, em coleta realizada dois meses depois, e possuía plasmídios IncFIA e IncFIB, variantes de IncF. Seriam necessários estudos adicionais para investigar a linhagem celular da cepa FSP1314/09.

Apesar de não ter sido detectada nas cepas clínicas deste estudo em particular, a enzima CTX-M-15 já foi relatada diversas vezes em amostras clínicas no Brasil (CERGOLE-NOVELLA *et al.* 2010; CHAGAS *et al.* 2011; PEIRANO *et al.* 2011; TOLLENTINO *et al.* 2011), porém não em cepas de amostras ambientais, apesar de estar disseminada mundialmente, em amostras clínicas humanas e animais, bem como no ambiente (CANTÓN *et al.* 2012; LIVERMORE 2012). Portanto, este é o primeiro relato da enzima CTX-M-15 em uma amostra ambiental no Brasil.

Em ambas as cepas, o ambiente genético de *bla*_{CTX-M-15} envolvia o elemento *ISEcpI*, cuja sequência encontrava-se interrompida pela IS26. Assim como Tn3 e *ISCR1*, a *ISEcpI* se mobiliza por meio da transposição de extremidade única, e por estar frequentemente ligada ao gene *bla*_{CTX-M-15}, já está disseminada mundialmente apesar de ter sido descrita há pouco mais de 10 anos (TOLEMAN & WALSH 2011; CANTÓN *et al.* 2012). Apesar disso, nas cepas deste estudo o fato de estar truncada pela IS26 provavelmente impede a transposição da *ISEcpI* e confina sua localização para genótipos específicos, e a mobilização do gene *bla*_{CTX-M-15} fica a cargo da IS26, a qual apesar de não realizar transposição de extremidade única possui normalmente muitas cópias ao longo do DNA e por isso se transpõe com facilidade (TOLEMAN & WALSH 2011; SHAHID *et al.* 2012). O recente estudo de DIMUDE & AMYES

(2012) também descreve esta estrutura (*ISEcp1-IS26-ISEcp1*) em algumas cepas produtoras de CTX-M-15, entre outras onde a *ISEcp1* não estava interrompida.

Este estudo relata, portanto, a detecção do gene *bla*_{CTX-M-15} associado a um elemento genético que possui facilidade de mobilização. Este é um achado importante e preocupante em termos de disseminação da resistência, uma vez que independente de como esse gene tenha chegado ou surgido nas amostras de esgoto (inclusive tratado) da ETE 1, o mesmo pode a partir deste local ser disseminado para outras matrizes ambientais, como água e solo, podendo então atingir os alimentos, os animais ou o homem (Figura 1), representando portanto um risco à saúde da população.

O gene *bla*_{CTX-M-8} foi detectado em 5 cepas provenientes de ETEs diferentes da Grande São Paulo, em amostras de esgoto bruto, esgoto tratado e lodo de esgoto. Este gene foi descrito no Brasil em 2000, e deu origem a um novo cluster de genes *bla*_{CTX-M} (BONNET *et al.* 2000). Após sua caracterização, novos relatos de CTX-M-8 só foram publicados a partir de 2007, tanto na América Latina como nos Estados Unidos, Europa e África, em amostras clínicas e de alimentos (LEWIS *et al.* 2007; JOUINI *et al.* 2007; MINARINI *et al.* 2009; PEIRANO *et al.* 2009; VINUÉ *et al.* 2009; GARCÍA-FULGUEIRAS *et al.* 2011; KIIRU *et al.* 2012; MAHROUKI *et al.* 2012; SENNATI *et al.* 2012). Portanto, este é o primeiro relato da enzima CTX-M-8 em amostras de esgoto e/ou derivados, sugerindo que cepas de origem clínica e seus genes de resistência estão atingindo as estações de tratamento de esgoto, podendo então se disseminar na natureza após o lançamento do esgoto tratado no ambiente. O fato de genes do grupo *bla*_{CTX-M-2} não terem sido identificados nessas amostras de

esgoto pode ter ocorrido devido a alguma mudança na epidemiologia das enzimas CTX-M em nossa região, como está ocorrendo na Argentina, onde a ESBL CTX-M-2 permanece endêmica e as enzimas CTX-M-15 e CTX-M-8 estão emergindo (SENNATI *et al.* 2012). Outro motivo pode ter sido o fato dos genes terem sido pesquisados em cepas cultivadas, o que limita muito a detecção dos genes de resistência (STALDER *et al.* 2012).

O gene *bla*_{CTX-M-8} das cepas deste estudo está associado à IS26, que como já foi mencionado, possui muitas cópias no genoma e por isso encontra com facilidade outra IS26 para realizar a mobilização de toda a estrutura que estiver entre elas. Por outro lado, o gene *bla*_{CTX-M-8} estava diretamente ligado a outra sequência de inserção, IS10, que ao contrário da IS26 é estritamente regulada e possui baixa frequência de transposição (EICHENBAUM & LIVNEH 1998; HARADA *et al.* 2010; STOEBEL & DORMAN 2010; TOLEMAN & WALSH 2011). No caso das cepas deste estudo, a IS10 encontrava-se interrompida pela IS26, o que provavelmente impede a transcrição da sua transposase. Seria necessário mapear regiões maiores das duas extremidades que compõem o ambiente genético de *bla*_{CTX-M-8} para afirmar a provável forma de mobilização do mesmo. Apesar disso, o fato de estar associado à IS26, cuja frequência de transposição é naturalmente alta, pode sugerir que em algum momento possa ter havido a mobilização do gene *bla*_{CTX-M-8} por meio da IS26 ou de uma estrutura maior para um plasmídio, o qual iniciou sua disseminação.

As três cepas de *E. coli* que continham *bla*_{CTX-M-8} possuíam também plasmídios do grupo IncII, enquanto as cepas de *K. pneumoniae* e *E. cloacae* possuíam plasmídios IncL/M. Ambos os grupos Inc estão entre os principais

disseminadores de resistência entre enterobactérias no mundo (CARATTOLI 2009). As cinco cepas continham plasmídios de alto peso molecular de tamanhos diferentes, e não foi possível associá-los a um grupo Inc específico, ou à disseminação do gene *bla*_{CTX-M-8}. Apesar disso, o fato deste gene estar sendo carregado por cepas geneticamente distintas, isoladas de amostras diferentes de estações de tratamento de esgoto diferentes, sugere que a disseminação de CTX-M-8 esteja ocorrendo por meio de transferência genética horizontal.

A dispersão da família CTX-M de β -lactamases no mundo todo é considerada uma pandemia, devido ao crescente número de relatos e à disseminação de seus genes em estruturas genéticas altamente mobilizáveis, bem como a presença dessas estruturas em clones bem sucedidos (CANTÓN *et al.* 2012). Este estudo destaca a permanência e disseminação dos genes do grupo *bla*_{CTX-M-2} em uma instituição hospitalar durante 1 ano entre 2004 e 2005, devido provavelmente à sua presença em integrons de classe 1 complexos, além de relatar pela primeira vez no Brasil a presença dos genes *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-8} em amostras ambientais, coletadas de estações de tratamento de esgoto da Grande São Paulo em 2009.

Não foi possível detectar os grupos Inc de 12 cepas clínicas e uma cepa ambiental. Isto pode ter ocorrido devido às limitações da técnica de PBRT, a qual foi padronizada para os 18 replicons que representam os grupos de incompatibilidade principais das espécies de *Enterobacteriaceae*, deixando portanto de detectar grupos mais raros ou ainda não caracterizados (CARATTOLI *et al.* 2005).

5.4 Considerações Finais

Os resultados deste estudo trazem a identificação de genes codificadores de ESBL presentes tanto em cepas clínicas isoladas em um hospital público em 2004/2005, como em cepas isoladas do esgoto de cinco ETEs da Grande São Paulo em 2009. Além disso, os resultados aqui apresentados mostram a variedade de elementos genéticos mobilizáveis relacionados aos genes *bla*_{ESBL} identificados em ambas as fontes.

Em relação às cepas clínicas, o estudo mostra a importância da consciência de que a disseminação da resistência antimicrobiana no ambiente de uma instituição independe muitas vezes de uma disseminação clonal. Além disso, os genes de resistência podem se disseminar da instituição para a comunidade em geral e para a natureza por diversos veículos - profissionais de saúde, visitantes da instituição, esgoto hospitalar, ou do próprio paciente após a alta hospitalar – representando portanto um importante risco à saúde humana.

Os elementos de mobilização genética associados aos genes *bla*_{ESBL} identificados nas cepas deste estudo sugerem que possa haver a disseminação dessas estruturas da clínica para o ambiente e vice-versa. A presença de uma maioria de cepas contendo plasmídios de alto peso molecular e grupos Inc associados, segundo a literatura, à disseminação da resistência a antimicrobianos, também aponta para a alta capacidade de mobilização de genes *bla*_{ESBL} por transferência horizontal entre enterobactérias.

Este estudo relata também a presença de três genes de resistência pela primeira vez no Brasil, além da descrição de dois genes *bla*_{ESBL} novos, em cepas isoladas no ambiente hospitalar. Estes resultados podem demonstrar tanto a possibilidade de disseminação dos genes devido à globalização e portanto ao trânsito de pessoas entre os países, como a possibilidade do surgimento de novos genes devido a mutações favorecidas provavelmente pela pressão seletiva do uso de antimicrobianos nos serviços de assistência à saúde.

Os resultados deste estudo alertam para a disseminação da resistência a β -lactâmicos, além do ambiente hospitalar, nas ETEs da Grande São Paulo por genes codificadores de ESBL em bactérias da família *Enterobacteriaceae*. As amostras ambientais deste estudo representam apenas uma pequena parte dos produtos (esgoto tratado, lodo de esgoto) provenientes das estações de tratamento de esgoto da Grande São Paulo, porém os resultados podem servir de alerta para o lançamento e aplicação adequados e conscientes destes produtos, além de sinalizar para a necessidade da investigação da presença de bactérias resistentes no esgoto que será lançado no ambiente.

A resistência a antimicrobianos é um grave problema de Saúde Pública que atualmente envolve diversas áreas do conhecimento, uma vez que há disseminação de genes codificadores de resistência em amostras clínicas, ambientais e de alimentos. Essa preocupação vai além da presença de cepas resistentes no ambiente clínico ou na natureza, e depende de profissionais de diversos setores a proposta de soluções para a prevenção e o controle do problema.

A dispersão de bactérias resistentes no ambiente favorece a interação das mesmas com a microbiota local, criando novas possibilidades de evolução da resistência a antimicrobianos. Além disso, o contato de bactérias com resíduos químicos (metais pesados, antimicrobianos) lançados na natureza pelas indústrias também pode favorecer o surgimento de células resistentes. O uso da profilaxia com antimicrobianos, de adubação orgânica ou de lodo de esgoto na agricultura podem levar à contaminação dos alimentos tanto por antimicrobianos como bactérias resistentes. E finalmente, o uso profilático ou como estimuladores de crescimento dos antimicrobianos nas criações de animais leva à colonização do trato gastrointestinal dos mesmos por bactérias resistentes, ou ainda à contaminação da carne com antimicrobianos, podendo em ambos casos oferecer risco à saúde humana. Todos os fatores acima podem favorecer tanto o surgimento de novos genes de resistência como a disseminação dos mesmos para diversos ambientes, como ilustrado na Figura 1.

O desenvolvimento de novas drogas e propostas de eliminação de plasmídios do ambiente têm sido avaliados (CARATTOLI 2009; LIVERMORE 2012), mas há ainda uma longa distância até o controle da disseminação da resistência. O controle da venda de antimicrobianos no Brasil, bem como o estabelecimento de limites para o uso dos mesmos na agricultura e criações de animais, mostram que existe a preocupação das autoridades com a questão da resistência, porém outras medidas e planos de controle do uso dessas drogas ainda necessitam ser elaborados, como protocolos que visem a investigação da resistência e da presença de antimicrobianos nos alimentos e no esgoto lançado na natureza.

Sendo assim, a conscientização do uso racional de antimicrobianos na clínica, agricultura e pecuária, e o lançamento adequado do esgoto hospitalar, industrial e doméstico, ainda parecem ser o caminho mais razoável a ser seguido para prevenir a disseminação da resistência bacteriana.

6. CONCLUSÕES

- Foram detectados 13 genes *bla*_{ESBL} diferentes nas amostras clínicas e 3 nas ambientais, sendo um deles comum aos dois tipos de amostra;
- Três genes ainda não haviam sido relatados no Brasil, e dois genes codificavam novas enzimas β -lactamases;
- Os genes *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-8}, associados a elementos mobilizáveis, foram detectados pela primeira vez em amostras ambientais no Brasil;
- Integrons de classe 1 complexos associados a genes do grupo *bla*_{CTX-M-2} foram identificados pela primeira vez no Brasil;
- Plasmídios pertencentes a grupos de incompatibilidade envolvidos na disseminação de genes de resistência no mundo todo foram os mais frequentes neste estudo;
- A maioria das cepas deste estudo abrigavam plasmídios de alto peso molecular, possivelmente conjugativos;
- Genes *bla*_{ESBL} comumente encontrados em amostras clínicas foram detectados no esgoto, alertando para a possibilidade de atingirem outros corpos d'água ou o solo após seu lançamento e/ou reuso.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria Nº 2.616, de 12 de maio de 1998. Define as Diretrizes e Normas para a Prevenção e o Controle das Infecções Hospitalares [lei na Internet]. [acesso em 28 Jan 2012]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC Nº 44, de 28 de outubro de 2010. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências [lei na Internet]. [acesso em 29 Jan 2013]. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>.
3. American Society for Microbiology (ASM). Antibiotic Resistance: an ecological perspective on an old problem. Washington (DC): American Academy of Microbiology (US); 2009 Sep. 32p.
4. Ansari MI, Malik A. Genotoxicity of agricultural soils in the vicinity of industrial area. *Mutat Res*. 2009; 673:124-132.
5. Arpin C, Dubois V, Coulange L, André C, Fischer I, Noury P, Grobost F, Brochet JP, Jullin J, Dutilh B, Larribet G, Lagrange I, Quentin C. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in community and private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(11):3506-3514.
6. Arpin C, Dubois V, Maugein J, Jullin J, Dutilh B, Brochet JP, Larribet G, Fischer I, Quentin C. Clinical and molecular analysis of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteria in the community setting. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):5048-5054.
7. Arthur A, Nimmo E, Hettle S, Sherratt D. Transposition and transposition immunity of transposon Tn3 derivatives having different ends. *EMBO J*. 1984;3(8):1723-1729.
8. Babini GS, Livermore DM. Are SHV β -lactamases Universal in *Klebsiella pneumoniae*?. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 2230.
9. Bae IK, Lee YH, Jeong HJ, Hong SG, Lee SH, Jeong SH. A novel *bla*_{CTX-M-14} gene-harboring complex class 1 integron with an In4-like backbone structure from a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(3):340-342.
10. Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol*. 2008; 19:260-265.
11. Barguigua A, El Otmani F, Talmi M, Reguig A, Jamali L, Zerouali K, Timinouni M. Prevalence and genotypic analysis of plasmid-mediated β -lactamases among

- urinary *Klebsiella pneumoniae* isolates in Moroccan community. The Journal of Antibiotics. 2012; Epub ahead of print.
12. Barlow M, Reik RA, Jacobs SD, Medina M, Meyer MP, McGowan JE, Tenover FC. High Rate of Mobilization for *bla*_{CTX-M}S. Emerg Infect Dis. 2008;14(3):423-428.
 13. Bartón BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Genimics* 1995; 29(3):690-697.
 14. Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, Röhnisch T, Schweighart S, Wilhelm R. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection*. 1992;20(3):158-163.
 15. Billot-Klein D, Gutmann L, Collatz E. Nucleotide sequence of the SHV-5 beta-lactamase gene of a *Klebsiella pneumoniae* plasmid. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(12):2439-2441.
 16. Bonnet R, Sampaio JL, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Sirot J. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(7):1936-1942.
 17. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, Sirot J. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(8):2269-2275.
 18. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14:933-951.
 19. Brown KD, Kulis J, Thomson B, Chapman TH, Mawhinney DB. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sci Total Environ*. 2006; 366:772-783.
 20. Bush K, Jacoby GA. Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-spectrum and Inhibitor Resistant β -lactamases. Lahey Clinic [homepage na internet] c2003. [acesso em 28 Jan 2013]. Disponível em: <http://www.lahey.org/studies>.
 21. Bush K, Jacoby GA. An updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Mar;54(3):969-976.
 22. Caccamo M, Perilli M, Celenza G, Bonfiglio G, Tempera G, Amicosante G. Occurrence of extended spectrum beta-lactamases among isolates of Enterobacteriaceae from urinary tract infections in southern Italy. *Microb Drug Resist*. 2006;12(4):257-264.

23. Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*. 2006; 9:466-475.
24. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol*. 2012;3:110.
25. Carattoli A. Animal reservoirs for extended-spectrum β -lactamase producers. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14(s1):117-123.
26. Carattoli A. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(6):2227-2238.
27. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*. 2005; 63: 219-228.
28. Casellas JM, Goldberg M. Incidence of strains producing extended spectrum beta-lactamases in Argentina. *Infection*. 1989; 17:434-436.
29. Cergole-Novella MC, Guth BE, Castanheira M, Carmo MS, Pignatari AC. First description of *bla*_{CTX-M-14}- and *bla*_{CTX-M-15}-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *Microb Drug Resist*. 2010;16(3):177-184.
30. Chagas TP, Alves RM, Vallim DC, Seki LM, Campos LC, Asensi MD. Diversity of genotypes in CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in different hospitals in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2011; 15(5):420-425.
31. Chapman PA, Ellin M, Ashton R, Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. *Int J Food Microbiol*. 2001;68:11-20.
32. Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanés C. SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2001;45(10):2856-2861.
33. Chouchani C, Ben-Achour N, M'Charek A, Belhadj O. Cloning and sequencing of the class A beta-lactamase gene (*bla*_{TEM-15}) located on a chromosomal Tn801 transposon. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;58(4):459-463.
34. Clímaco EC, Minarini LA, da Costa Darini AL. CTX-M-producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years? *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68(2):186-189.
35. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI Publication M100-S22, Vol. 32, No. 3. Wayne, PA: CLSI; 2012.

36. Corkill JE, Cuevas LE, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. SHV-27, a novel cefotaxime hydrolyzing β -lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. J Antimicrob Chemother. 2001;47:463-465.
37. De Boeck H, Lunguya O, Muyembe JJ, Glupczynski Y, Jacobs J. Presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in waste waters, Kinshasa, the Democratic Republic of the Congo. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(11):3085-3088.
38. De Oliveira Garcia D, Doi Y, Szabo D, Adams-Haduch JM, Vaz TM, Leite D, Padoveze MC, Freire MP, Silveira FP, Paterson DL. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(5):1790-1793.
39. Dimude JU, Amyes SG. Molecular diversity associated with the dissemination of CTX-M-15 beta-lactamase gene in blood culture isolates of *Escherichia coli* from Edinburgh. Scand J Infect Dis. 2012; Epub ahead of print.
40. Diwan V, Chandran SP, Tamhankar AJ, Lundborg CS, Macaden R. Identification of extended-spectrum β -lactamase and quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from hospital wastewater from central India. J Antimicrob Chemother. 2012;67:857-859.
41. Dropa M. Caracterização genotípica de cepas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2006.
42. Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Mamizuka EM, Murakami T, Cassettari VC, Franco F, Guida SM, Balabakis AJ, Passadore LF, Santos SR, Matté GR, Matté MH. Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2009;51(4):203-209.
43. Eichenbaum Z, Livneh Z. UV light induces IS10 transposition in *Escherichia coli*. Genetics. 1998;149(3):1173-1181.
44. El Far F, Marino CGJ, Medeiros EAS. The organization of hospital infection control committees and their importance in Brazil. Braz J Infect Dis. 2001; 5(6):290-293.
45. Fernandes SA, Paterson DL, Ghilardi-Rodrigues AC, Adams-Haduch JM, Tavechio AT, Doi Y. CTX-M-2-producing *Salmonella* Typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. Microb Drug Resist. 2009;15(4):317-321.

46. Fevre C, Passet V, Weill FX, Grimont PA, Brisse S. Variants of the *Klebsiella pneumoniae* chromosomal OKP beta-lactamase are divided into two main groups, OKP-A and OLP-B. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(12):5149-5152.
47. Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microb Infect*. 2004;10(4):272-288.
48. Francia MV, Varsaki A, Garcillán-Barcia MP, Latorre A, Drainas C, De la Cruz F. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microb Rev*. 2004;28:79-100.
49. Frost L, Ippen-Ihler K, Skurray RA. Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol Rev*. 1994;58(2):162-210.
50. Garcillán-Barcia MP, Francia MV, De la Cruz F. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microb Rev*. 2009;33:657-687.
51. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73(4):354-360.
52. Garcia-Alvarez L, Dawson S, Cookson B, Hawkey P. Working across the veterinary and human health sectors. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67(1):i37-i49.
53. García-Fulgueiras V, Bado I, Mota MI, Robino L, Cordeiro NF, Varela A, Algorta G, Gutkind G, Ayala JA, Vignoli R. Extended-spectrum β -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(8):1725-1729.
54. Gniadkowski M. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14(s1):11-32.
55. Gutmann L, Ferré B, Goldstein FW, Rizk N, Pinto-Schuster E, Acar JF, Collatz E. SHV-5, a novel SHV-type beta-lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; 33:951-956.
56. Hammad AM, Ishida Y, Shimamoto T. Prevalence and molecular characterization of ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from traditional Egyptian Domiati cheese. *J Food Prot*. 2009;72(3):624-630.

57. Hammad AM, Shimamoto T. Asymptomatic intramammary infection with multidrug-resistant gram-negative bacteria in a research dairy farm: incidence and genetic basis of resistance. *J Vet Med Sci.* 2011;73(8):1089-1092.
58. Hammond DS, Harris T, Bell J, Turnidge J, Giffard PM. Selection of SHV extended-spectrum-beta-lactamase-dependent cefotaxime and ceftazidime resistance in *Klebsiella pneumoniae* requires a plasmid-borne *bla_{SHV}* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(2):441-445.
59. Harada S, Ishii Y, Saga T, Tateda K, Yamaguchi K. Chromosomally Encoded *bla_{CMY-2}* Located on a Novel SXT/R391-Related Integrating Conjugative Element in a *Proteus mirabilis* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(9):3545-3550.
60. Hartmann A, Locatelli A, Amoureux L, Depret G, Jolivet C, Gueneau E, Neuwirth C. Occurrence of CTX-M Producing *Escherichia coli* in Soils, Cattle, and Farm Environment in France (Burgundy Region). *Front Microbiol.* 2012;3:83.
61. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Therapy.* 2009; 64(S1):i3-i10.
62. Howard C, van Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard PM. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV beta-lactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(3):659-664.
63. Jemima SA, Verghese S. SHV-28, an extended-spectrum beta-lactamase produced by a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* in south India. *Indian J Med Microbiol.* 2009;27(1):51-54.
64. Jiang HX, Tang D, Liu YH, Zhang XH, Zeng ZL, Xu L, Hawkey PM. Prevalence and characteristics of β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(10):2350-2353.
65. Jouini A, Vinué L, Slama KB, Sáenz Y, Klibi N, Hammami S, Boudabous A, Torres C. Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(5):1137-1141.
66. Kim S, Kim J, Kang Y, Park Y, Lee B. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the genus *Shigella* in the Republic of Korea. *J Clin Microbiol.* 2004 Nov;42(11):5264-5269.
67. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection

- in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(8):2818-2824.
68. Kiiru J, Kariuki S, Goddeeris BM, Butaye P. Analysis of β -lactamase phenotypes and carriage of selected β -lactamase genes among *Escherichia coli* strains obtained from Kenyan patients during an 18-year period. *BMC Microbiol.* 2012;12:155.
 69. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;28:302-307.
 70. Knothe H; Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. 1983;11(6):315-317.
 71. Lachmayr KL, Kerkhof LJ, DiRienzo G, Cavanaugh CM, Ford TE. Quantifying nonspecific TEM β -lactamase (*bla*_{TEM}) genes in a wastewater stream. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(1):203-211.
 72. Lee CH, Bhagwat A, Heffron F. Identification of a transposon Tn3 sequence required for transposition immunity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80(22):6765-6769.
 73. Lewis JS 2nd, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Jorgensen JH. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(11):4015-4021.
 74. Lin TL, Tang SI, Fang CT, Hsueh PR, Chang SC, Wang JT. Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Klebsiella pneumoniae* strains in Taiwan: recharacterization of *shv*-27, *shv*-41, and *tem*-116. *Microb Drug Resist.* 2006;12(1):12-15.
 75. Livermore D. Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(s1):3-10.
 76. Livermore DM. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. *Korean J Intern Med.* 2012;27:128-142.
 77. Lopes AC, Veras DL, Lima AM, Melo Rde C, Ayala J. *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(2):163-167.
 78. Lord Soulsby of Swaffham Prior. The 2008 Garrod Lecture: Antimicrobial resistance – animals and the environment. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(2):229-233.

79. Mahrouki S, Belhadj O, Chihi H, Mohamed BM, Celenza G, Amicosante G, Perilli M. Chromosomal bla_{CTX-M-15} associated with ISEcp1 in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* isolated at the Military Hospital of Tunis, Tunisia. J Med Microbiol. 2012;61(Pt9):1286-1289.
80. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol. 2006;4(8):608-620.
81. Mendes C, Kiffer C, Segura A, Ribeiro J, Turner P. *Klebsiella pneumoniae* with multiple antimicrobial resistance. Braz J Infect Dis. 2004; 8(1):109-111.
82. Mendonça N, Ferreira E, Louro D; ARSIP Participants, Caniça M. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended- and broad-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. Int J Antimicrob Agents. 2009;34(1):29-37.
83. Mendonça N, Manageiro V, Bonnet R, Caniça M. Biochemical characterization of SHV-55, an extended-spectrum class A beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(5):1897-1898.
84. Minarini LAR, Camargo ILBC, Pitondo-Silva A, Darini ALC. Multilocus sequence typing of uropathogenic ESBL-producing *Escherichia coli* isolated in a Brazilian community. Curr Microbiol. 2007;55(6):524-529.
85. Minarini LAR, Poirel L, Trevisani NAC, Darini ALC, Nordmann P. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;65:202-206.
86. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa Nº 11, de 22 de maio de 2012. Publica o Subprograma de Monitoramento em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Pescado, Mel, Ovos e Avestruz para o exercício de 2012, referente ao Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal [lei na Internet]. [acesso em 30 Jan 2013]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>.
87. Moura A, Henriques I, Smalla K, Correia A. Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. Res Microbiol. 2010;161(1):58-66.
88. Mshana SE, Imirzalioglu C, Hossain H, Hain T, Domann E, Chakraborty T. Conjugative IncF1 plasmids carrying CTX-M-15 among *Escherichia coli* ESBL producing isolates at a University hospital in Germany. BMC Infect Dis. 2009; 9:97.

89. Mullany P. Introduction to the multi-author review on conjugative transposons. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59(12):2017-2022.
90. Mulvey MR, Boyd DA, Baker L, Mykytczuk O, Reis EM, Asensi MD, Rodrigues DP, Ng LK. Characterization of a *Salmonella enterica* serovar Agona strain harbouring a class 1 integron containing novel OXA-type beta-lactamase (OXA-53) and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase genes [*aac(6')*-I30]. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(2):354-359.
91. Novais A, Baquero F, Machado E, Cantón R, Peixe L, Coque TM. International spread and persistence of TEM-24 is caused by the confluence of highly penetrating *Enterobacteriaceae* clones and an IncA/C2 plasmid containing *Tn1696::Tn1* and *IS5075-Tn21*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(2):825-834.
92. Nüesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hächler H. Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(5):943-949.
93. Organização Mundial da Saúde (OMS). A Crescente Ameaça da Resistência Antimicrobiana – Opções de Ação. [homepage na internet] c2013. [acesso em 29 Jan 2013]. Disponível em: <http://www.who.int>.
94. Pan JC, Ye R, Meng DM, Zhang W, Wang HQ, Liu KZ. Molecular characteristics of class 1 and class 2 integrons and their relationships to antibiotic resistance in clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58:288-296.
95. Park YJ, Kim SY, Yu JK, Kim SI, Uh Y, Hong SG, Jongwook L, Kwak HS. Spread of *Serratia marcescens* coharboring *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{CTX-M}*, *armA*, and *bla_{OXA-1}* carried by conjugative IncL/M type plasmid in Korean hospitals. *Microb Drug Resist.* 2009;15(2):97-102.
96. Partridge SR, Hall RM. Complex Multiple Antibiotic and Mercury Resistance Region Derived from the r-det of NRI (R100). *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:4250-4255.
97. Partridge SR, Hall RM. Evolution of transposons containing *bla_{TEM}* genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(3):1267-1268.
98. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell R. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microb Rev.* 2009;33:757-784.
99. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:657-686.

100. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, Bonomo RA *et al.* Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:3554-3560.
101. Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(2):265-268.
102. Peirano G, Asensi MD, Pitondo-Silva A, Pitout JD. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Jul;17(7):1039-1043.
103. Perilli M, Segatore B, Mugnaioli C, Celenza G, Rossolini GM, Stefani S, Luzzaro F, Pini B, Amicosante G. Persistence of TEM-52/TEM-92 and SHV-12 extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Italy. *Microb Drug Resist.* 2011;17(4):521-524.
104. Picão RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(9):3908-3913.
105. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(s1):75-81.
106. Power P, Galleni M, Di Conza J, Ayala JA, Gutkind G. Description of In116, the first *bla*_{CTX-M-2}-containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(4):461-465.
107. Prado T, Pereira WC, Silva DM, Seki LM, Carvalho APDA, Asensi MD. Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett Appl Microbiol.* 2008;46:136-141.
108. Queiroz ML, Antunes P, Mourão J, Merquior VL, Machado E, Peixe LV. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases, antimicrobial resistance genes, and plasmid content in *Escherichia coli* isolates from different sources in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74(1):91-94.
109. Quiroga MP, Andres P, Petroni A, Soler Bistué AJ, Guerriero L, Vargas LJ, Zorreguieta A, Tokumoto M, Quiroga C, Tolmasky ME, Galas M, Centrón D. Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including *aac(6')-Ib-cr*, and a novel allele, *qnrB10*, associated with *ISCR1* in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Dec;51(12):4466-4470.

110. Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:602-604.
111. Reinthaler FF, Feierl G, Galler H, Haas D, Leitner E, Mascher F, Melkes A, Posch J, Winter I, Zarfel G, Marth E. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Res.* 2010;44(6):1981-1985.
112. Rodríguez-Baño J, Navarro MD. Extended-spectrum β -lactamases in ambulatory care: a clinical perspective. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(s1):104-110.
113. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 (S1): 33-41.
114. Schlüter A, Szczepanowski R, Pühler A, Top EM. Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiol Rev.* 2007;31:449-477.
115. Segatore B, Setacci D, Perilli M, Franchino L, Franceschini N, Agnifili A, Rossolini GM, Amicosante G. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of Enterobacteriaceae producing complex beta-lactamase patterns including extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;23(5):480-486.
116. Sennati S, Santella G, Di Conza J, Pallecchi L, Pino M, Ghiglione B, Rossolini GM, Radice M, Gutkind G. Changing Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamases in Argentina: Emergence of CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(11):6003-6005.
117. Shahid M, Sobia F, Singh A, Khan HM. Concurrent occurrence of *bla*_{ampC} families and *bla*_{CTX-M} genogroups and association with mobile genetic elements *ISEcp1*, *IS26*, *ISCR1*, and *sul1*-type class 1 integrons in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates originating from India. *J Clin Microbiol.* 2012;50(5):1779-1782.
118. Shannon K, Stapleton P, Xiang X, Johnson A, Beattie H, El Bakri F, Cookson B, French G. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing nosocomial outbreaks of infection in the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 1998;36(10):3105-3110.
119. Snyder L, Champness W. *Molecular Genetics of Bacteria.* 2nd ed. ASM Press; 1997. Genes and Genetic Elements; p.73-213.
120. Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy MC. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol.* 2012;3:119.
121. Stoebel DM, Dorman CJ. The effect of mobile element *IS10* on experimental regulatory evolution in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol.* 2010;27(9):2105-2112.

122. Timmery S, Modrie P, Minet O, Mahillon J. Plasmid capture by the *Bacillus thuringiensis* conjugative plasmid pXO16. J Bacteriol. 2009;191(7):2197-2205.
123. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century? Microbiol Mol Biol Rev. 2006;70(2):296-316.
124. Toleman MA, Walsh TR. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2011;35:912-935.
125. Tollentino FM, Polotto M, Nogueira ML, Lincopan N, Neves P, Mamizuka EM, Remeli GA, De Almeida MT, Rúbio FG, Nogueira MC. 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. Microb Drug Resist. 2011;17(1):7-16.
126. Tristram SG, Pitout MJ, Forward K, Campbell S, Nichols S, Davidson RJ. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing isolates of *Haemophilus parainfluenzae*. J Antimicrob Chemother. 2008;61(3):509-514.
127. Turner MS, Andersson P, Bell JM, Turnidge JD, Harris T, Giffard PM. Plasmid-borne *bla*_{SHV} genes in *Klebsiella pneumoniae* are associated with strong promoters. J Antimicrob Chemother. 2009;64:960-964.
128. Veras DL, Alves LC, Brayner FA, Guedes DR, Maciel MA, Rocha CR, de Souza Lopes AC. Prevalence of the *bla*_{SHV} gene in *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from hospital and community infections and from the microbiota of healthy individuals in Recife, Brazil. Curr Microbiol. 2011;62(5):1610-1616.
129. Vignoli R, Varela G, Mota MI, Cordeiro M, Power P, Ingold E, Gadea P, Sirok A, Schelotto F, Ayala JA, Gutkind G. Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum β -lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. J Clin Microbiol. 2005;43:2940-2943.
130. Vignoli R, Cordeiro N, Seija V, Schelotto F, Radice M, Ayala J, Power P, Gutkind G. Genetic environment of CTX-M-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalized patients in Uruguay. Rev Argent Microbiol. 2006;38(2):84-88.
131. Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG, Casellas JM. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. Clin Microbiol Infect. 2008;14:154-158.
132. Vinué L, Sáenz Y, Martínez S, Somalo S, Moreno MA, Torres C, Zarazaga M. Prevalence and diversity of extended-spectrum beta-lactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humans in Spain. Clin Microbiol Infect. 2009;15(10):954-957.

133. Warren RE, Ensor VM, O'Neill P, Butler V, Taylor J, Nye K, Harvey M, Livermore DM, Woodford N, Hawkey PM. Imported chicken meat as a potencial source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:504-508.
134. Xu H, Su Z, Wang S, Dai X, Chen J, Kong F, Li Y, Peng S, Shao Q, Lu L, Ezaki T. Four novel resistance integron gene-cassette occurrences in bacterial isolates from Zhenjiang, China. *Curr Microbiol.* 2009;59(2):113-117.
135. Yokoe DS, Classen D. Improving patient safety through infection control: a new healthcare imperative. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29(s1):s3-s11.
136. Zahrl D, Wagner A, Tscherner M, Koraimann G. GroEL plays a central role in stress-induced negative regulation of bacterial conjugation by promoting proteolytic degradation of the activator protein TraJ. *J Bacteriol.* 2007;189(16):5885-5894.
137. Zarnayová M, Siebor E, Péchinot A, Duez JM, Bujdáková H, Labia R, Neuwirth C. Survey of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases in a Slovak hospital: dominance of SHV-2a and characterization of TEM-132. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7):3066-3069.
138. Zavascki AP, Carvalhaes CG, da Silva GL, Tavares Soares SP, de Alcântara LR, Elias LS, Sandri AM, Gales AC. Outbreak of carbapenem-resistant *Providencia stuartii* in an intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2012;33(6):627-630.
139. Zou LK, Wang HN, Zeng B, Zhang AY, Li JN, Li XT, Tian GB, Wei K, Zhou YS, Xu CW, Yang ZR. Phenotypic and genotypic characterization of β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from swine. *Vet Microbiol.* 2011;149(1-2):139-46

Milena Dropa

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8217707344487224>

Última atualização do currículo em 26/01/2013

Possui graduação em Farmacia e Bioquímica pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (2000) e Mestrado Em Saúde Pública pela Faculdade de Saude Publica (2006). Atualmente é Técnica de Nível Superior Nível III e aluna de Doutorado da Universidade de São Paulo. Tem experiência nas áreas de Análises Clínicas e Pesquisa, com ênfase em Microbiologia e Biologia Molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: saúde pública, microbiologia, vigilância sanitária, infecção hospitalar e resistência bacteriana. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Milena Dropa
Nome em citações bibliográficas	DROPA, M.;Dropa, M.;Dropa, Milena
Sexo	Feminino

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. Avenida Dr. Arnaldo, 715 Laboratorio de Pratica de Saude Publica Cerqueira Cesar 01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617753 Ramal: 7753 Fax: (11) 30833501 URL da Homepage: http://www.fsp.usp.br
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

2009	Doutorado em andamento em Doutorado em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública. Título: Identificação e localização de genes de resistência a beta-lactâmicos, detectados em cepas clínicas e ambientais de Enterobacteriaceae., Orientador: Maria Helena Matté. Palavras-chave: saúde pública; Resistência bacteriana; beta-lactamases de espectro estendido. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública. Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública / Especialidade: Biologia Molecular. Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Resistência Bacteriana.
2004 - 2006	Mestrado em Mestrado Em Saúde Pública. Faculdade de Saude Publica. Título: Caracterização genotípica de cepas da família Enterobacteriaceae produtoras de β -lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um

Maria Helena Matte

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9695724992553294>

Última atualização do currículo em 10/01/2013

Maria Helena Matte (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Maria Helena Matte
Nome em citações bibliográficas	MATTE, M. H.;Matte, M. H.;Matté, M.H.;Matté, M. H.
Sexo	Feminino

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Prática de Saúde Pública. Avenida Doutor Arnaldo, 715 Cerqueira Cesar 01246904 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30667769 Fax: (11) 8833501 URL da Homepage: http://
-----------------------	---

Formação acadêmica/titulação

2004	Livre-docência. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Aplicação de métodos moleculares no estudo de organismos do gênero <i>Aeromonas</i> , Ano de obtenção: 2004. Palavras-chave: Saúde Pública; Vigilância Sanitária; Microbiologia; Biologia molecular; <i>Aeromonas</i> . Grande área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública / Especialidade: Vigilância Sanitária. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Biologia e Fisiologia dos Microorganismos. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Molecular e de Microorganismos. Setores de atividade: Cuidado À Saúde das Populações Humanas.
1996 - 1998	Pós-Doutorado. University of Maryland System, U.M.S., Estados Unidos. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Molecular e de Microorganismos.
1995 - 1996	Doutorado em Saúde Pública (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Ribotipagem de <i>Aeromonas hydrophila</i> A. caviae, A. sobria e A. jandaei potencialmente patogênicas, isoladas de amostras de água do reservatório de Urapiranga, São Paulo, Ano de obtenção: 1996. Orientador: Sandra Maria Ottati de Oliveira Nitrini.