



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

RAYANE GOMES DE QUEIROGA COSTA

Incidência de *Klebsiella* spp., resistotipagem e atividade antimicrobiana em isolados hospitalares

CAMPINA GRANDE – PB

2015

RAYANE GOMES DE QUEIROGA COSTA

Incidência de *Klebsiella* spp., resistotipagem e atividade antimicrobiana em isolados hospitalares

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Me. Zilka Nanes Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

CAMPINA GRANDE – PB

2015

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na 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 dissertação.

C837i Costa, Rayane Gomes de Queiroga.
Incidência de *Klebsiella* spp., resistotipagem e atividade antimicrobiana em isolados hospitalares [manuscrito] / Rayane Gomes de Queiroga Costa. - 2015.
63 p. : il. color.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.
"Orientação: Profa. Ma. Zilka Nanes Lima, Departamento de Farmácia".
"Co-Orientação: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, Departamento de Farmácia".
1. Resistência bacteriana. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Epidemiologia. 4. Fármacos. I. Título.

21. ed. CDD 615.1

RAYANE GOMES DE QUEIROGA COSTA

Incidência de *Klebsiella* spp., resistotipagem e atividade antimicrobiana em isolados hospitalares

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em 04 / 12 /2015.

Zilka Nanes Lima

Profa. Me. Zilka Nanes Lima / UEPB

Orientadora

Karlete Vania M. Vieira

Profa. Dra. Karlete Vania Mendes Vieira / UEPB

Examinadora

Heronides dos Santos Pereira

Prof. Dr. Heronides dos Santos Pereira / UEPB

Examinador

Dedico este trabalho ao meu avô Francisco (*in memoriam*), pelo exemplo de caráter e honestidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o autor da minha vida, a Ele dirijo minha gratidão por ter me dado serenidade e discernimento para conduzir essa trajetória acadêmica da melhor forma possível. Vem dEle tudo o que sou, o que tenho e o que espero.

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio incondicional. Mãe, quão imenso é o seu amor que me fez forte ao longo de toda essa jornada, guiando-me pelos caminhos da justiça e da fé. Pai, com tua presença foste sinônimo de segurança e amparo à cada obstáculo vencido. Meu eterno reconhecimento a vocês que são presentes de Deus, expressão do amor dEle por mim.

Ao meu irmão, meu maior amigo, por todas as palavras de incentivo ditas nos momentos de dificuldades.

À toda minha família, sinônimo de fortaleza edificada no Senhor, que foi base importante para esta conquista.

À minha orientadora, Profa. Zilka Nanes por acreditar na minha capacidade, ouvindo pacientemente as minhas considerações e partilhando comigo as suas ideias, conhecimentos e experiências. Como mestre, que entende do ofício de pesquisador, que tem paixão pelo conhecimento e que permanentemente acompanha os passos de seus aprendizes, ela conduziu de forma humana minha orientação. Quero demonstrar o meu reconhecimento e admiração pela sua competência profissional.

Ao meu co-orientador, Prof. Ricardo Olímpio, pelo olhar crítico e construtivo que engradeceu este trabalho.

À minha amiga-irmã, Danielly, que foi peça fundamental durante esse período, sempre se fazendo presente por palavras de encorajamento e afeto. Obrigada pela rica troca e cumplicidade.

À todos os colegas da turma Farmácia 2010.2, em especial à Amanda pela parceria e por todos os momentos de descontração e à Yargo por todo o companheirismo demonstrado através da disponibilidade em me ajudar sempre que necessário.

Aos amigos de perto e de longe, pelo amor e preocupação transmitidos por gestos sinceros de carinho.

Aos meus padrinhos, pelo acolhimento na fase final deste trabalho.

À minha prima Talita pela amizade e pelos preciosos conselhos que nas horas certas soube me oferecer. Os amigos de verdade se revelam naqueles momentos que não são propriamente felizes, nem de alegria. Nas situações complicadas da vida, aqueles que vemos por perto, que estão ao nosso lado, são realmente os nossos amigos.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia, Denise, Ilana, Layse e William, pelos conhecimentos repassados e pela incrível assistência oferecida. Vocês foram essenciais.

À Augusto, Silvana e Gabriela pela prontidão em me auxiliar durante o período das minhas análises.

Aos professores pela excelência da formação prestada e conhecimentos transmitidos.

Ao Centro de Hematologia e Laboratório de Análises Clínicas (HEMOCLIN) e ao Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular (LSVM), por ter concedido o material necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que mesmo não sendo mencionados aqui, contribuíram para concretização dessa vitória.

“Desejo que você não tenha medo da vida
tenha medo de não vivê-la.

Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem
acidentes.

Só é digno do pódio quem usa as derrotas para
alcançá-lo.

Só é digno da sabedoria quem usa as lágrimas para
irrigá-la.

Os frágeis usam a força; os fortes, a inteligência.
Seja um sonhador, mas una seus sonhos com
disciplina, pois sonhos sem disciplina produzem
pessoas frustradas.

Seja um debatedor de ideias. Lute pelo que você
ama.”

(Augusto Cury).

RESUMO

A utilização inadequada de antimicrobianos pode levar a um comprometimento da resposta clínica, elevando os custos com internação e acarretando o surgimento de bactérias multirresistentes. Buscando inferir à respeito desta disseminação microbiológica, objetivou-se neste estudo realizar um levantamento epidemiológico de culturas onde foram obtidos isolados pertencentes ao gênero *Klebsiella* e testar a atividade antimicrobiana de derivados *N*-acilidrazônicos, pela técnica da microdiluição frente à três estirpes bacterianas. A coleta de dados foi feita em um laboratório de análises clínicas que presta serviço a um hospital da cidade de Campina Grande-PB, durante o período de abril/2014 a agosto/2014 e novembro/2014 a março/2015. Para a determinação da ação antibacteriana seguiu-se a técnica de microdiluição e definição da concentração inibitória mínima (CIM), em uma cepa controle ATCC, outra produtora de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) e uma produtora de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC). Dentre as 170 culturas com crescimento bacteriano, 18 (10,6%) foram positivas para o gênero *Klebsiella* e destas 17 (94,5%) pertenciam à espécie *K. oxytoca*. O sexo mais acometido foi o feminino, com 14 (77,8%) casos e destes 12 (78,6%) eram oriundos de urocultura, quanto ao perfil de resistência, foram determinados 17 fenótipos diferentes, com maiores índices de diminuição da atividade para os antibióticos Cefalotina (55,6%), Cefoxitina (55,6%), Cefalexina (50,0%), Cloranfenicol (66,7%), Sulfazotrim (66,7%) e Tetraciclina (83,3%). As CIMs encontradas frente às três estirpes em questão, foram de 1.024µg/mL e o possível efeito bacteriostático pode ser conferido a molécula 10 frente a cepa produtora de ESBL e para as moléculas 5 e 9 testadas na cepa produtora de KPC. Portanto, estudos à respeito de micro-organismos patogênicos que colonizam o ambiente hospitalar são fundamentais, para que seja possível avaliar a incidência e traçar os mecanismos de resistência, a fim de minimizar a propagação e consequentemente as infecções. À vista disso, é de suma importância o surgimento de novas drogas, bem como o melhoramento das já existentes, desse modo mais pesquisas envolvendo os derivados *N*-acilidrazônicos fazem-se necessárias para garantia do arsenal farmacológico antimicrobiano.

PALAVRAS-CHAVE: Resistência Bacteriana, Antimicrobianos, Epidemiologia, Fármacos.

ABSTRACT

Improper use of antibiotics can lead to an impaired clinical response, raising the cost of hospitalization and resulting in the emergence of multi-resistant bacteria. Seeking to infer about this microbiological dissemination, this study aimed to carry out an epidemiological survey of cultures which were obtained isolates belonging to the genus *Klebsiella* and test the antimicrobial activity of N-acilidrazônicos derivatives, by microdilution technical front the three bacterial strains. Data collection was performed in a clinical laboratory that provides service to a hospital in the city of Campina Grande-PB, during the period April / 2014 to August / 2014 and November / 2014 to March / 2015. For the determination of the antibacterial action was followed by the microdilution technique and setting the minimum inhibitory concentration (MIC) in an ATCC control strains, one producing beta-lactamase extended spectrum (ESBL) and producing *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Of the 170 cultures with bacterial growth, 18 (10.6%) were positive for *Klebsiella* and these 17 (94.5%) belonged to the species *K. oxytoca*. The most affected was the female sex, with 14 (77.8%) cases and of these 12 (78.6%) were from urine culture, the resistance profile, were determined 17 different phenotypes with higher reduction ratios of activity for cephalothin antibiotics (55.6%) Cefoxitin (55.6%), cephalexin (50.0%), Chloramphenicol (66.7%), Sulfazotrim (66.7%) and tetracycline (83.3%). MICs found opposite the three strains in question were 1.024 μ g / mL and the possible bacteriostatic effect can be seen the molecule 10 against ESBL-producing strain and the molecules 5:09 tested in producing KPC strain. Therefore, studies about the pathogenic microorganisms that colonize the hospital environment are key, so that you can assess the impact and outline the mechanisms of resistance in order to minimize the spread and hence infections. In view of this, it is very important the development of new drugs as well as the improvement of existing ones, thereby further research involving the N-acilidrazônicos derivatives are necessary to guarantee the antimicrobial pharmacological arsenal.

KEYWORDS: Bacterial Resistance, Antimicrobials, Epidemiology, Drugs.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características dos derivados <i>N</i> -acilidrazônicos utilizados.....	16
TABELA 2 - Distribuição dos casos de acordo com o sítio de ocorrência da infecção	23
TABELA 3 - Distribuição dos casos de acordo com a faixa etária constatada	25
TABELA 4 - Fenótipos de resistência encontrados com base nos resultados dos antibiogramas.....	25
TABELA 5 - Resultados dos testes bioquímicos.....	28
TABELA 6 - Medida do diâmetro, em milímetros, dos halos de inibição de crescimento para o teste de ESBL.....	30
TABELA 7 - Medida do diâmetro, em milímetros, dos halos de inibição de crescimento para os outros antibióticos testados e para o polidisco de série urinária.....	31
TABELA 8 - Resultados da microdiluição para as moléculas testadas	34
TABELA 9 - Número de colônias obtidos através da diluição 1:1000 dos poços controle.....	37
TABELA 10 - Relação entre os números de colônias obtidos através da diluição 1:1000 para cada cepa testada.....	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Microplaca utilizada para o teste de microdiluição	18
FIGURA 2 - Relação entre os resultados de todas as culturas hospitalares analisadas .	20
FIGURA 3 - Distribuição das culturas com crescimento isolado e associado	20
FIGURA 4 - Variedade microbiológica encontrada nas culturas isoladas.....	21
FIGURA 5 - Distribuição percentual de culturas isoladas e associadas para o gênero <i>Klebsiella</i>	22
FIGURA 6 - Distribuição percentual das espécies bacterianas descritas.....	22
FIGURA 7 - Relação entre os gêneros averiguados	24
FIGURA 8 - Percentuais de resistência para os antibióticos testados	26
FIGURA 9 - Teste de ESBL e antibiograma da cepa número 2.....	29
FIGURA 10 - Teste de ESBL e antibiograma da cepa número 4.....	29
FIGURA 11 - Teste de ESBL e antibiograma da cepa número 5.....	30
FIGURA 12 - Visualização do crescimento microbiano após a coloração com TFTZ para a cepa produtora de ESBL	33
FIGURA 13 - Técnica do spread-plate para a estirpe produtora de ESBL.....	35
FIGURA 14 - Spread – plate com diluição de 1:1000 para a cepa produtora de KPC..	36
FIGURA 15 - Contagem das colônias em contador manual	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - American Type Culture Collection	LSVM - Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular
BHI - Brain Heart Infusion	MBL – Metalo-Beta-Lactamase
CIM – Concentração Inibitória Mínima	MH – Müller-Hinton
DMSO - Dimetilsulfóxido	MRSA - <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina-Resistente
DNA - Ácido Desoxirribonucleico	NAH - Subunidade <i>N</i> -acilhidrazona
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético	PBPs - Proteínas Ligadoras de Penicilinas
ESBL – Beta-Lactamase de Espectro Estendido	PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
FEN – Fenilalanina	PMEs - Proteínas de Membrana Externa
HEMOCLIN - Centro de Hematologia e Laboratório de Análises Clínicas	SIM - Sulfureto, Indol, Motilidade
IAL – Instituto Adolfo Lutz	TFTZ - Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio
IHs - Infecções Hospitalares	TSI - Tríplice Açúcar e Ferro
IMP-1 – Imipenemase	URE – Uréia
ITUs – Infecções do Trato Urinário	VM - Vermelho de Metila
KPC - <i>Klebsiella Pneumoniae</i> Carbapenemase	VP - Voges Proskauer
LIA – Lisina	VRSA - <i>Staphylococcus aureus</i> Vancomicina-Resistente

LISTA DE SÍMBOLOS

β - Beta
°C - Grau Celsius
cm – Centímetro
g - Grama
mL – Mililitro
nm –Nanômetro
µg – Grama
µL – Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3 REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS	4
3.2 β -LACTAMASES	5
3.2.1 AmpC	6
3.2.2 β -lactamase de espectro estendido (ESBL)	7
3.2.3 Carbapenemases	8
3.2.3.1 Carbapenemases classe B – metalo- β -lactamases (MBLs)	8
3.2.3.2 <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i> (KPC)	9
3.3 AGENTE ETIOLÓGICO	10
3.4 NOVOS FÁRMACOS E DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS	11
3.5 MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	12
3.6 DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) E CORANTE CLORETO DE 2,3,5 TRIFENILTETRAZÓLIO (TFTZ)	13
4 REFERENCIAL METODOLÓGICO	14
4.1 LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO	14
4.2 CEPAS BACTERIANAS	14
4.3 TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	15
4.3.1 Preparo da solução mãe, estoque e teste	16
4.3.2 Preparo do antibiótico controle	17
4.3.3 Preparo do inóculo padrão de McFarland e do inóculo teste	17
4.3.4 Disposição nas microplacas para avaliação da CIM	17
4.3.5 Preparo do corante cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TFTZ) e determinação da CIM	18
4.4 PLAQUEAMENTO DA CIM POR MEIO DA TÉCNICA DO SPREAD- PLATE	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1 LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO	20
5.2 TESTES CONFIRMATÓRIOS PARA AS CEPAS BACTERIANAS	28
5.3 MICRODILUIÇÃO EM CALDO E TÉCNICA DO SPREAD-PLATE	32
6 CONCLUSÃO	39

REFERÊNCIAS	40
--------------------------	----

1 INTRODUÇÃO

A associação entre assistência hospitalar e infecção constitui um grave problema de saúde em todo o mundo, implicando em gastos na ordem de 4,8 bilhões de dólares. No cenário clínico brasileiro, informações sobre esta temática são escassas e dados não estabelecidos, dificultam o conhecimento do tamanho do problema no país (BOGEA et al., 2014).

Duas forças opostas influenciam no estabelecimento de uma doença infecciosa: as defesas naturais do organismo e os fatores de virulência bacterianos. Baseado nesse contexto, pode-se concluir que ao ser diagnosticada uma enfermidade causada por micro organismo, isso implica dizer que o mesmo venceu a linha de defesa, multiplicando-se e instalando o processo patológico (VERONESI e FOCACCIA, 2005).

A presença de uma enzima que inativa o agente antimicrobiano; a presença de uma enzima alternativa para a enzima que é inibida pelo agente antimicrobiano; uma mutação no alvo do agente antimicrobiano, o que reduz a ligação do medicamento; a modificação pós-transcricional ou pós-tradução da meta do antibiótico, o que reduz a ligação deste; redução da absorção; o efluxo ativo; e produção excessiva do alvo, são exemplos da variedade de mecanismos pelos quais a resistência pode ser causada (FLUIT, VISSER e SCHMITZ, 2001).

Dentre os micro organismos responsáveis por esta alta taxa de letalidade estão o *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), *Staphylococcus aureus* vancomicina-resistente (VRSA), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, que são resistentes a múltiplas drogas (ROCHA et al., 2011). Entende-se como bactérias resistentes aquelas que apresentam resistência a uma ou mais classes de antibióticos (ALANIS, 2005).

Os patógenos oportunistas do gênero *Klebsiella* são responsáveis frequentemente por infecções em pacientes imunocomprometidos. Desde os anos 1980, eles se tornaram um dos principais hospedeiros para as betalactamases de espectro estendido (BABINI e LIVERMORE, 2000). Este mecanismo degrada os antimicrobianos beta-lactâmicos, que correspondem a uma classe amplamente empregada no tratamento de infecções graves. São exemplos desses fármacos as cefalosporinas de amplo espectro ceftazidima, cefotaxima, e cefepime. A *Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase* (KPC) constitui-se de outra maneira encontrada pelas bactérias para formar uma verdadeira barreira contra todos os agentes β -lactâmicos,

incluindo os carbapenêmicos, bem como outras classes de antimicrobianos que poderiam ser opções de tratamento (OLIVEIRA et al., 2011).

O uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro, contribui significativamente para o aparecimento da multirresistência. Esta manifestação se dá principalmente pelo desenvolvimento de traços genéticos responsáveis pelas interferências na ação dos fármacos, sendo posteriormente difundidos no ambiente via usuários, visitantes, profissionais de saúde ou por materiais contaminados (DUTRA et al., 2015).

Diante do contexto atual, há uma forte necessidade em se produzir novas substâncias que não só tenham bom espectro de atividade, mas que possuam novos mecanismos de ação, visto que, existem cepas resistentes a quase todos os agentes conhecidos e que estas se multiplicam bem mais rapidamente que os processos de patenteação das drogas. Um bom exemplo de novos candidatos à fármacos, são os derivados *N*-acilidrazônicos, os quais apresentam em sua estrutura vários pontos de ligação, que lhe conferem uma verdadeira variedade estrutural.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar um levantamento epidemiológico de culturas onde foram obtidos isolados pertencentes ao gênero *Klebsiella* e testar a atividade antimicrobiana de derivados *N*-acilidrazônicos, pela técnica da microdiluição frente à três estirpes bacterianas.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar as variáveis qualitativas e quantitativas;
- Determinar os fenótipos e o percentual de resistência com base nos resultados do antibiogramas;
- Realizar testes bioquímicos para comprovação das espécies referentes às três cepas utilizadas na microdiluição;
- Executar antibiograma para confirmação da marca de resistência presente nas estirpes pré-selecionadas;
- Utilizar a técnica do spread-plate para contagem das colônias oriundas das CIMs apuradas, a fim de determinar o efeito bacteriostático das mesmas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

Constituindo-se de objeto para inúmeras publicações, a resistência bacteriana aos antimicrobianos é preocupação mundial (AVORN e SOLOMON, 2000). O alto índice de infecções e a gama de fármacos utilizados para o tratamento das mesmas, conduzem a possíveis erros de prescrição que estão diretamente relacionados a incerteza diagnóstica e desconhecimento farmacológico (WANNMACHER, 2004). Micro-organismos capazes de multiplicar-se em presença de concentrações de antibióticos superiores as das doses utilizadas na terapêutica humana, são tidos como resistentes. Os mecanismos pelos quais as bactérias adquirem esta especificidade são fenômenos biológicos naturais que se seguiram à introdução dos agentes antimicrobianos na prática clínica e que vem se difundindo devido ao uso irracional destes agentes (ZIMERMAN, 2010).

Inúmeros aspectos têm sido associados com a emergência e disseminação de germes multirresistentes em hospitais e na comunidade. A transferência de pacientes hospitalizados para outras unidades de atendimento médico, bem como também o transporte de carga microbiana do ambiente hospitalar para a comunidade, feito por parentes de pacientes internados e até pela própria equipe de assistência à saúde, podem disseminar patógenos em populações distintas. Cepas previamente sensíveis podem sofrer mutação espontânea em reservatórios com alta quantidade de bactérias, ou podem adquirir resistência através de transferência de material genético. A submissão a antimicrobianos exerce pressão seletiva sobre essas populações e é fator categórico para o crescimento das taxas de resistência (GOLDMANN e HUSKINS, 1997; SHLAES et al., 1997).

Segundo Mosquito et al. (2011) a resistência a um determinado antibiótico pode ser dita como intrínseca “natural”, que ocorre devido a transmissão de características inatas, fenotípicas da bactéria, que se espalham de geração em geração. Já resistência adquirida ocorre em micro-organismos que anteriormente se mostravam sensíveis à determinados fármacos e que por alguma alteração estrutural ou bioquímica, passam a expressar oposição a antibioticoterapia.

Desenvolvendo adaptações moleculares, tais como mutações que passam a disseminar vertical ou horizontalmente, genes de resistência, os germes encontraram

formas de responder quando existe pressão exercida pelos antibióticos (FROST et al., 2005). Quando a bactéria se divide e todo o seu genoma é duplicado, dando origem a uma célula idêntica, diz-se que a disseminação gênica ocorreu por transmissão vertical, já a comunicação horizontal acontece quando bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes, trocam genes de resistência por transferência de DNA, seja por conjugação (transferência de material genético entre uma bactéria doadora e outra aceptora, por meio de um pilis sexual), transdução (incorporação acidental de DNA cromossômico ou plasmidial por um bacteriófago) ou transformação (introdução de DNA exógeno proveniente de outras células). Esta última forma de difusão gênica envolve vários elementos, como integrons, transposons, plasmídeos e sequências de inserção (THOMAS e NIELSEN, 2005).

Os mecanismos diferentes de resistência que podem estar sozinhos ou associados incluem: alteração do sítio alvo do antimicrobiano por meio das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs); modificação na permeabilidade da membrana, impedindo ou dificultando assim a penetração do fármaco na célula; hiperexpressão de bombas de efluxo ao medicamento e produção de enzimas chamadas β -lactamases, que degradam ou inativam o antibiótico (PATERSON et al., 2005).

3.2 β -LACTAMASES

As β -lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico, estrutura presente nas drogas utilizadas contra esse tipo de resistência bacteriana, impossibilitando assim sua atividade antimicrobiana. Este é o principal mecanismo de oposição das Gram-negativas ao grupo dos fármacos β -lactâmicos (BUSH, JACOBY e MEDEIROS, 1995; LIVERMORE, 1995).

A fim de promover a quebra na estrutura dos antibióticos, que contém grupos ésteres e amidas, as bactérias secretam enzimas chamadas hidrolases, que atuam na inativação dos mesmos antes que estes atinjam seus alvos (DZIDIC, SUSKOVIC, e KOS, 2008). A resistência ao antimicrobiano β -lactâmico depende de fatores como a quantidade de enzima produzida, a habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano em questão e da velocidade de penetração na membrana externa. Tratando-se das bactérias Gram-negativas, os β -lactâmicos devem atravessar o espaço periplasmático, entre a membrana citoplasmática e a membrana externa, para atingir seus receptores na membrana interna, porém o grande impasse está no fato de que as β -lactamases, neste grupo, acumulam-se exatamente nesta região (VERONESI, 1991).

Frente a grande diversidade de enzimas produzidas vários esquemas foram propostos para classificá-las. Os dois mais utilizados são o proposto por Ambler (1980), que classifica conforme a estrutura molecular, desta forma as serina- β -lactamases foram designadas classe A, as metalo- β -lactamases classe B, a classe C foi descrita posteriormente e as outras serina- β -lactamases que hidrolisam oxacilina, se encaixaram na classe D. E o modelo de Bush, Jacoby e Medeiros (1995), que classificam a enzima de acordo com a afinidade pelo substrato e por sua susceptibilidade aos inibidores de β -lactamases. O grupo 1 é composto das cefalosporinases não inibidas por ácido clavulânico e pertencentes à classe molecular C; o grupo 2 inclui penicilinas, cefalosporinas e β -lactamases de espectro estendido e que tem seu sítio ativo sensível aos inibidores, podendo ser das classes moleculares A ou D; o grupo 3 é o das metalo- β -lactamases que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos e que são inibidas por EDTA, pertencente à classe molecular B; e o grupo 4 é composto por penicilinas não inibidas pelo ácido clavulânico, pertencente ao grupo molecular D. O grupo 2 pode ser subdividido em 2b (derivados de TEM e SHV), 2be (ESBLs), 2br (afinidade diminuída com inibidores) e 2f (hidrolisam carbapenêmicos e são fracamente inibidas por ácido clavulânico, com serina no sítio ativo). Como exposto por Livermore (1995), três grupos destas β -lactamases apresentam relevância clínica: as tipo AmpC, as ESBL e as que hidrolisam os carbapenêmicos.

3.2.1 AmpC

Estas enzimas pertencem ao grupo 1 de Bush ou classe C de Ambler, não são inibidas por inibidores de β -lactamase como o ácido clavulânico e têm modo de expressão cromossômico-induzível (BUSH e JACOBY, 2010). Como dito por Rossi e Andreazzi (2005), as β -lactamases do tipo AmpC hidrolisam penicilinas, cefalosporinas de 1ª geração, oximino- β -lactâmicos e também as cefamicinas (cefexitina). São, contudo, sensíveis a cefepime e carbapenêmicos.

As AmpCs cromossômicas encontram-se codificadas no cromossoma bacteriano de uma ampla variedade de bactérias, como por exemplo: *Aeromonas* spp., *Morganella morganii*, *Providência* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp. e *Serratia* spp. Quando expostas aos antimicrobianos do tipo β -lactâmicos, podem ocorrer mutações genéticas espontâneas que levam a uma produção

constitutiva ou hiperprodução destas enzimas em quantidade suficiente para que ocorra hidrólise destes antibióticos (SADER, 2000).

Assim sendo, a produção de AmpCs do tipo constitutiva pode ser desencadeada durante a antibioticoterapia, havendo a possibilidade de adquirir novos mecanismos de resistência, exceto aos carbapenêmicos. As AmpCs mediadas por plasmídeos podem ser encontradas nas espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp. e *Proteus mirabilis* (ACAR et al., 1998).

3.2.2 β -lactamase de espectro estendido (ESBL)

Como dito por Thomson (2010); Dierikx et al. (2012); Tafur, Torres e Villegas (2008) as ESBLs conferem resistência às penicilinas, às cefalosporinas de 1^a geração (cefalotina), aos oximino- β -lactâmicos, os quais incluem as oximino-cefalosporinas (cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, e cefepime) e ao aztreonam (monobactâmico). No entanto, são incapazes de hidrolisar as cefamicinas (cefexitina) e os carbapenêmicos, e são inibidas pelos inibidores das β -lactamases, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam. O fato de serem codificadas por elementos genéticos móveis, como os plasmídeos, os quais proporcionam uma incrível capacidade de disseminação entre bactérias, confere muitas vezes multirresistência aos antibacterianos.

Mutações em genes cromossômicos (TEM-1, TEM-2 e SHV-1), proporcionaram a expressão de um espectro estendido nas enzimas da família SHV e TEM, que possuíam inicialmente espectro restrito. Outras famílias de ESBL, tais como CTX-M e OXA, não se originaram da mesma forma. Estes mecanismos de evolução, gradativamente aumentam a atividade destas cefalosporinases até a expressão de resistências clinicamente significativas (PATERSON et al., 2001). Atualmente, o número de ESBLs caracterizadas já passa de 300 (LAHEY CLINICS, 2012), segundo pesquisas realizadas em mais de trinta países do mundo inteiro, denotando assim, a ampla distribuição das mesmas (GNIADKOWSKI, 2008).

Esse tipo de β -lactamase ocorre predominantemente em *Klebsiella* spp. e em menor grau em *Escherichia coli*, mas pode ser encontrada em inúmeros patógenos clinicamente importantes. Com base nisto, pode-se prever que todas as espécies pertencentes ao gênero *Klebsiella* carregam um gene similar ao SHV-1 cromossomal e

que algumas estirpes podem exibir múltiplas ESBLs (BRADFORD, 2001; TENOVER, 2006).

3.2.3 Carbapenemases

Na classificação funcional as carbapenemases se encontram nos grupos 2f e 3, já na classificação molecular estas enzimas foram divididas em quatro classes (A, B, C e D), tomando como base de organização a sua estrutura primária. As classes A e B podem ser consideradas carbapenemases já que possuem a capacidade, mesmo que reduzida, de catalisar a hidrólise de carbapenêmicos. No entanto, a resistência observada nas classes C e D (oxacilinases) pode estar ligada a outros fatores, como a alteração da permeabilidade da membrana (RASMUSSEN et al., 1996).

Em meados dos anos 80 enzimas que hidrolisavam carbapenêmicos foram descritas em enterobactérias, porém estas não eram inibidas pelo EDTA. Subsequentemente verificou-se que estas utilizavam serina em seu centro ativo e podiam ser inativadas por inibidores de β -lactamase como o tazobactam e ácido clavulânico. Até os anos 90 todas as carbapenemases eram espécie específicas, cromossomais, com características bem definidas. Com a descrição da imipenemase IMP-1, plasmidial, em *Pseudomonas aeruginosa* e KPC-1 em *Klebsiella pneumoniae*, a disseminação das carbapenemases sofreu alterações, ou seja, o que antes era tido como um problema de disseminação clonal passou a ser um problema global de disseminação interespecíes (QUEENAN e BUSH, 2007). Elas se expandiram rapidamente nos Estados Unidos, países europeus e América do Sul, incluindo o Brasil. Além disso, foi verificado que o mecanismo de resistência da KPC foi implicado em surtos causados por outros membros da família das enterobactérias. Essa enzima é codificada por sequências relacionadas à transposons e identificadas em plasmídeos conjugativos com alto poder de disseminação (MOLAND et al., 2003).

3.2.3.1 Carbapenemases classe B – metalo- β -lactamases (MBLs)

Geneticamente, são classificadas como classe B de Ambler e denominadas de IMP-1 e VIM-1. Foram identificadas pela primeira vez em *Pseudomonas aeruginosa* e hidrolisam penicilinas, cefalosporinas, oxacefamicinas e carbapenêmicos. Sua atividade é Zinco dependente e são inibidas pelo EDTA (POIREL et al., 2003).

No cenário brasileiro a primeira bactéria produtora de MBL foi descrita em 2005 e esta ocorreu em uma estirpe de *K. pneumoniae* e a bactéria apresentava simultaneamente a produção de ESBL. A detecção deste tipo de carbapenemase na espécie mencionada parece ocorrer esporadicamente, tendo sido reportada em países da Europa, da Ásia, da América do Sul e da Austrália (LINCOPAN et al., 2005). No entanto em estudo realizado por Meyer e Picoli (2011) dentre as 44 cepas que apresentaram produção de enzimas, duas expressaram MBL, uma associada com KPC e outra com KPC e ESBL.

Para que sejam ativadas necessitam de ao menos íon zinco por molécula e seu mecanismo de ação pode não ser único e pode variar conforme os diferentes substratos e a fonte enzimática. Já foram identificadas em todo o mundo e podem ser produzidas por ação plasmidial ou cromossomal. Sua estrutura é formada por moléculas responsáveis pelo enorme potencial de expressão e disseminação das resistências bacterianas. Estes genes são capturados por integrons de classe 1, 2 e 3, os quais se ligam a enzimas (SHIBATA et al., 2003).

3.2.3.2 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)

No ano de 1996 em um hospital participante do programa ICARE (Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology) da Carolina do Norte, Estados Unidos, foi identificada em um isolado de *Klebsiella pneumoniae*, uma nova carbapenemase com total resistência ao imipenem e ao meropenem. A amostra foi então denominada KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) (HOOTON et al., 1996). No Brasil, Pavez, Mamizuka e Lincopan (2009) confirmaram a presença de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 em isolados na cidade de São Paulo, por meio de um estudo regional de vigilância sanitária de amostras do período de 2003 a 2008. No entanto apenas em 2009 houve a primeira notificação da presença dessas enzimas em nosso país. Estas foram detectadas em três amostras de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva, onde caracterizou-se a presença dos genes blaKPC-2 e blaCTX-M-2 (MONTEIRO et al., 2009).

O gene bla contido nesta bactéria foi provavelmente clonado de *Escherichia coli* e conferiu resistência aos carbapenêmicos, cefalosporinas e aztreonam, seu plasmídeo pode muitas vezes carrear resistência a outros antibióticos como fluoroquinolonas e

aminoglicosídeos, tornando seu tratamento um desafio para o clínico (HIRSCH e TAM, 2010). A KPC é uma enzima de difícil detecção, uma vez que muitas vezes a concentração inibitória mínima para carbapenêmicos não se apresentam altamente resistentes, motivo pela qual devem ser realizados testes fenotípicos adicionais para a sua detecção, como o teste de Hodge modificado, teste de inibição por ácido borônico e confirmação por PCR (ANDERSON et al., 2007). O valor preditivo positivo mostrado pelo ertapenem também tem sido discutido, porém é um teste com elevada sensibilidade porém de baixa especificidade (DOYLE et al., 2012).

Além da ocorrência em *Klebsiella pneumoniae*, a KPC pode ser reportada em outras Enterobactérias, como *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* spp. e também em bastonetes não fermentadores de glicose como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (CUZON et al., 2008). No Brasil, as primeiras detecções se deram em 2006, de pacientes hospitalizados em Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo (PEIRANO et al., 2009).

Torna-se imprescindível a identificação de micro organismos produtores de KPC, devido ao fato destes poderem determinar infecções graves e por inativarem os carbapenêmicos, que são terapia de escolha para muitas infecções nosocomiais. É necessária a identificação dos indivíduos portadores da bactéria, a fim de permitir o controle da disseminação desses agentes. Uma ferramenta fenotípica ideal para identificação ainda não foi descrita, visto que as que estão disponíveis não diferenciam os mecanismos de resistência (ALMEIDA et al., 2012).

3.3 AGENTE ETIOLÓGICO

O gênero *Klebsiella* foi descoberto em 1885, e recebeu esta designação em homenagem a Edwin Klebs, microbiologista alemão. Inicialmente este grupo de bactérias foi classificado com base em suas características patogênicas e sua origem. Seguidamente baseou-se na utilização do substrato e atividades das enzimas e por último os estudos de biologia molecular permitiram a identificação de novas espécies e a reclassificação das já existentes, alterando a taxonomia deste gênero. O sequenciamento do ácido desoxirribonucléico (DNA) permitiu a identificação de cinco espécies: *K. oxytoca*; *K. planticola*; *K. terrigena*, *K. mobilis* e *K. pneumoniae*. Esta última é subclassificada em três subespécies: *Klebsiella pneumoniae subspécie*

pneumoniae, *Klebsiella pneumoniae* subspécie *ozaenae* e *Klebsiella pneumoniae* subspécie *rhinoscleromatis* (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

As infecções causadas por *Klebsiella* spp. tendem a acometer em maior número as pessoas imunodeprimidas, sendo responsável por alta taxa de mortalidade. Dentre as patologias mais corriqueiras, estão: pneumonia, infecções do trato urinário e de feridas, bacteremia, rinite crônica atrófica, artrites, enterites, meningites em crianças e sepse (MADISON et al., 1994).

Sendo parte da flora intestinal normal, sua patogenicidade pode ser atribuída à produção de enterotoxina estável ao calor; à habilidade de metabolizar a lactose; à presença de cápsula ou lipopolissacarídeo; à presença de adesinas com ou sem fímbrias que favorece sua adesão às mucosas, às células epiteliais do trato urogenital, respiratório e intestinal para produzir o processo infeccioso e proteger a bactéria dos fatores bactericidas do soro, acompanhado pela inibição da ativação dos componentes do complemento. Podem sobreviver por muito tempo na pele e em ambientes secos, como superfícies hospitalares, além de adquirir plasmídeos conjugativos com certa facilidade, os quais podem carregar também genes para outros tipos de resistência, como para aminoglicosídeos. É intrinsecamente resistente a ampicilina, devido à presença de beta-lactamase SHV-1, podendo produzir enzimas plasmidiais como AmpC (normalmente construtiva em diversas espécies), metalo-beta-lactamases (MBL) e carbapenemases (KPC), além de poder expressar resistência devido à perda de porinas (ROSENBLUETH et al., 2004).

3.4 NOVOS FÁRMACOS E DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS

Com custos na ordem de US\$ 400 a \$800 milhões por agente aprovado, a pesquisa farmacêutica esbarra em uma considerável barreira para o desenvolvimento de novos antibióticos, embora a necessidade destes seja primordial (LEUNG et al., 2011). Além disso, as indústrias, como qualquer órgão capitalista, almejam o retorno financeiro investido ao longo de todo o processo de desenvolvimento de novas moléculas, tornando portanto, os antibióticos economicamente menos atraentes quando comparados a outras classes de fármacos, como por exemplo, as mudanças ocorridas no padrão de doenças diagnosticadas na população, que direcionaram a descoberta de novos fármacos, para o tratamento de doenças crônicas, como a hipercolesterolemia, hipertensão, transtornos de humor e artrite (SMOLINSKI, HAMBURG e

LEDERBERG, 2003). O investimento na busca de novos antibióticos fica mais complicado, pois a sua descoberta pode levar cerca de 7-10 anos e o desenvolvimento de resistência pode levar 7-8 anos (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010).

Estudo realizado em 2004 mostrou que dos 506 medicamentos em desenvolvimento por quinze grandes empresas farmacêuticas e sete grandes empresas de biotecnologia, apenas seis eram antibióticos, ou seja, apenas 1% do total (SPELLBERG et al., 2004). Como afirmado por Aquino (2008) neste mesmo ano, oito das quinze principais empresas farmacêuticas pararam de aplicar capital na descoberta e desenvolvimentos de antibióticos e outras duas diminuíram suas pesquisas neste campo.

O fato de apresentar atividade em diferentes alvos terapêuticos, torna a subunidade *N*-acilhidrazona (NAH) uma estrutura privilegiada, que possui diferentes pontos de possível diversidade estrutural, sendo estes fundamentais para o desenvolvimento de candidatos à novos fármacos (DUARTE, BARREIRO e FRAGA, 2007).

Estudos com esta subunidade vêm apresentando diversas atividades, tais como ação antiviral, antiparasitária, anticonvulsivante, antimicrobiana, analgésica e anti-inflamatória e antiproliferativa de células tumorais. Os relatos narram atividade antimicrobiana de hidrazonas contra uma ampla variedade de bactérias e fungos. Segundo Rollas, Gulerman e Erdeniz (2002), esses compostos mostraram ação antibacteriana equivalente à da ceftriaxona frente a *Staphylococcus aureus*. Acilidrazonas de ácidos quinolinocarboxílicos foram sintetizadas por Metwally et al. (2006) e exibiram atividades antibacteriana e antifúngica significativas contra *Escherichia coli* e *Candida albicans*, embora nenhuma atividade frente ao *S. aureus*.

3.5 MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

A metodologia da microdiluição em caldo se baseia na relação entre a proporção de crescimento do micro-organismo suspenso no meio líquido e a concentração da substância ensaiada, ou seja, a densidade da turbidez induzida pelo crescimento bacteriano frente à um elemento testado. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência (PINTO, KANEKO e OHARA, 2003).

O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos. Sua desvantagem é a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos. Como controle positivo, utiliza-se

o caldo com o quimioterápico padrão com a suspensão padronizada de microrganismo em teste, e como controle negativo o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana. A padronização do inóculo de acordo com a escala McFarland a 0,5% nos permitiu melhor reprodutibilidade e validação dos testes de sensibilidade, pois suspensões bacterianas abaixo ou acima das proporções estabelecidas pela escala citada podem produzir leituras errôneas a respeito do poder inibitório, reportando um resultado não condizente com o esperado (OSTROSKY et al., 2008).

3.6 DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) E CORANTE CLORETO DE 2,3,5 TRIFENILTETRAZÓLIO (TFTZ)

Dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto anfipático, com um domínio altamente polar e dois grupos apolares, tornando-se solúvel tanto em meio aquoso quanto orgânico. Embora conhecido desde o século XIX, suas propriedades biológicas foram inicialmente descritas na década de 60 e, desde então, tem sido usado com diversas finalidades clínicas e laboratoriais, especialmente como agente crioprotetor no congelamento de células tronco para uso em transplantes, como veículo de drogas terapêuticas e, particularmente, como solvente em estudos biológicos (GALMEAS et al., 1995).

Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TFTZ) é bastante utilizado para contagem de colônias de microrganismos em meios de cultura sólido e também para visualização da atividade microbiana em testes de microdiluição. Este corante é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido por micro organismos por ação enzimática, originando assim, um composto chamado formazano que é mantido dentro de grânulos nas células, as quais assumem coloração vermelha, enquanto que a ausência desse fenômeno denota inatividade ou morte celular bacteriana (BELOTI et al., 1999).

4 REFERENCIAL METODOLÓGICO

4.1 LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO

A coleta de dados prosseguiu-se com o levantamento de todas as culturas microbiológicas, oriundas do âmbito hospitalar, realizadas no Centro de Hematologia e Laboratório de Análises Clínicas – HEMOCLIN, durante o período de abril/2014 a março/2015. Para tanto, tomara-se mão dos resultados dos antibiogramas arquivados pelo laboratório, bem como foi efetuado o preenchimento de um instrumento estruturado que contempla as variáveis de interesse da pesquisa, tais como: a incidência do gênero em questão; as espécies encontradas; a associação com o crescimento de outros micro organismos; os sítios-alvo da infecção; a faixa etária e o sexo acometidos e os padrões de sensibilidade à antimicrobianos, sendo este último dado também utilizado para a determinação dos fenótipos de resistência. Os resultados foram expostos por percentual simples e apresentados por meio de tabelas e gráficos do programa Microsoft Office Excel 2013.

4.2 CEPAS BACTERIANAS

Para o estudo foram utilizadas três cepas bacterianas (aleatoriamente enumeradas nos experimentos como 2, 4 e 5) pertencentes ao gênero *Klebsiella*, sendo uma *Klebsiella rhinoscleromatis* (ATCC), derivada CDC 06/IAL 06/02 – lote 0366 e duas *Klebsiella pneumoniae* de origem hospitalar, sendo uma produtora de ESBL e outra produtora de KPC. Para a confirmação das espécies em questão foram utilizados os seguintes meios de cultura: Tríplice Açúcar e Ferro (TSI); Sulfureto, Indol, Motilidade (SIM); Lisina (LIA); Uréia (URE); Fenilalanina (FEN); Vermelho de Metila (VM) e Voges Proskauer (VP), sendo os resultados obtidos conferidos com as Tabelas 1 e 2 para testes bioquímicos segundo Koneman et al. (2008). Foi feito o teste de ESBL segundo o documento M100-S15 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (CLSI, 2005), para a garantia da presença da marca de resistência e a execução deste, baseou-se na técnica de disco-aproximação, utilizando discos de Atm (aztreonam - 30 µg), Ctx (cefotaxima - 30 µg), Caz (ceftazidima - 30 µg) e Cpm (cefepime - 30 µg), que foram colocados a uma distância de 20 mm do disco de Amc (amoxicilina/ácido clavulânico - 30 µg), bem como um disco de Cfo (cefexitina - 30 µg) foi posto a mesma distância do disco de cefepime, para avaliação da produção de AmpC. Segundo o

EUCAST (2014), todos os isolados com halo de inibição menor ou igual aos pontos de corte: aztreonam e cefepime (21mm), cefotaxima (17mm), ceftazidima (19mm), amoxicilina/ácido clavulânico (19mm), para pelo menos um dos antimicrobianos utilizados, foram considerados como prováveis produtores de ESBL. Outros discos também foram testados, tais como Ert (ertapenem - 10µg); Ipm (imipenem - 10µg); Lvx levofloxacino - 05µg); Mpm (meropenem - 10µg); Ppt (piperacilina+tazobactam - 110µg); Sba (sulbactam+ampicilina - 20µg); Sut (sulfazotrim - 25µg); Tob (tobramicina - 10µg) e polidisco para série urinária, Amc (amoxicilina/ácido clavulânico - 30µg); Ami (amicacina - 30µg); Amp (ampicilina - 10µg); Cfl (cefalotina - 30µg); Cfz (cefazolina - 30µg); Cip (ciprofloxacino - 05µg); Cpm (cefepime - 30µg); Cro (ceftriaxona - 30µg); Gen (gentamicina - 10µg); Nal (ácido nalidíxico - 30µg); Nit (nitrofurantoina - 300µg); Nor (norfloxacino - 10µg); Ofx (ofloxacino - 05µg); Sut (sulfazotrim - 25µg) e Tet (tetraciclina - 30µg). A leitura dos testes foi feita através da medida dos halos de inibição do crescimento e estes também foram classificados de acordo com o documento EUCAST (2014).

4.3 TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

No estudo foram utilizados 5 protótipos moleculares (Tabela 1) em forma de pó, todos derivados *N*-acilidrazônicos e gentilmente cedidos pelo Professor Dr. Ricardo Olímpio de Moura. Estas moléculas foram desenvolvidas no Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular (LSVM) da UEPB e estão até o presente momento em processo de patenteação. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das mesmas, foi avaliada através do método de microdiluição em caldo de acordo com os padrões recomendados pelo documento M7A6 do CLSI (CLSI, 2003).

Tabela 1 - Características dos derivados *N*-acilidrazônicos utilizados

Composto	Nomenclatura IUPAC	Aldeído	Aparência e Cor	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Log P
JR - 03	(Z) -2-ciano-N'-(2,6-diclorobenzilideno) aceto-hidrazida	2,6-diclorobenzaldeído	Pó bege escuro	C ₁₀ H ₇ C ₁₂ N ₃ O	256,09	2,78
JR - 04	(E) -2-ciano-N'-(4-(metilsulfonil) benzilideno) acetohidrazida	4-metilsulfonil benzaldeído	Pó roseado	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	265,05	0,37
JR - 05	(E) -2-ciano-N'-(2-nitrobenzilideno) aceto-hidrazida	2-nitrobenzaldeído	Pó caramelo	C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₃	232,2	0,5
JR - 09	(E) -N-benzilideno-2-ciano aceto-hidrazida	benzaldeído	Pó marrom	C ₁₀ H ₉ N ₃ O	187,2	1,67
JR - 10	(E) -2-ciano-N'-(3,4,5-trimetoxibenzilideno) acetohidrazida	3,4,5-trimetoxibenzaldeído	Pó rosa claro	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₄	277,28	1,29

(Fonte: Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular - LSM)

4.3.1 Preparo da solução mãe, estoque e teste

Para a solução mãe foram adicionados 0,0104 g da molécula em um tubo estéril contendo 2 mL de DMSO a 10% e feita a homogeneização. Sequencialmente, 2 mL de água destilada foram adicionados a este mesmo tubo, obtendo portanto, a solução estoque que foi devidamente congelada em temperatura de 8°C. Para o preparo da solução teste, foi feito inicialmente o degelo da estoque e retirados 0,4 mL da mesma, a seguir completou-se para 2 ml o valor retirado com 1,6 mL de caldo Müller-Hinton (MH).

Cálculos:

- Solução mãe:

0,0104 g + 2 mL de DMSO 10% = diluição na concentração de 5.120 µg/mL

- Solução estoque:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$5.120 \cdot V_1 = 2.560 \cdot 4\text{mL}$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

- Solução teste:
 $C_1V_1 = C_2V_2$
 $2.560 \cdot V_1 = 512 \cdot 2 \text{ mL}$
 $V_1 = 0,4 \text{ mL}$

4.3.2 Preparo do antibiótico controle

O antibiótico de escolha foi a ceftriaxona, seguindo para o seu preparo os mesmos procedimentos utilizados para as moléculas, ou seja, uma solução mãe, outra estoque e finalmente uma teste. Para a solução mãe foram adicionados em 5 mL de DMSO a 10% e 0,05g do antimicrobiano em tubo estéril, obtendo assim a concentração de 10.000 $\mu\text{g/mL}$. Em outro tubo colocou-se 4 mL de água destilada, retirou-se 820 μL da mesma e outros 820 μL da solução mãe foram incluídos, obtendo-se assim a solução estoque numa concentração de 2.048 $\mu\text{g/mL}$. Por fim, para o alcance da solução teste, 1,5 mL da solução estoque foram retirados e acrescidos 1,5 mL de água destilada, atingindo assim a concentração de 1.024 $\mu\text{g/mL}$.

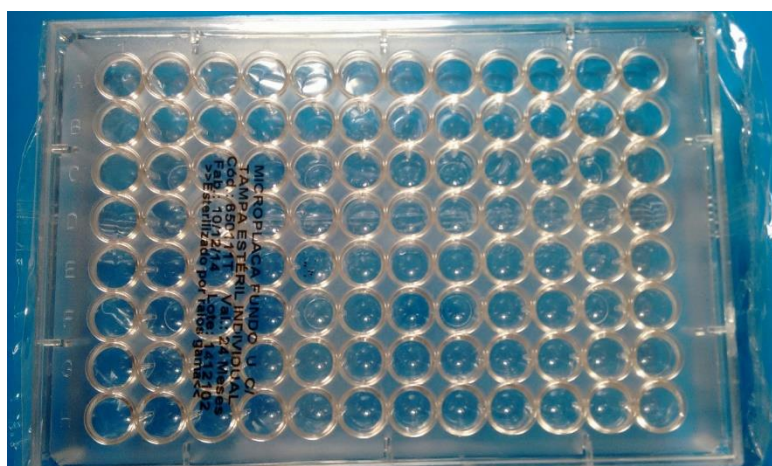
4.3.3 Preparo do inóculo padrão de McFarland e do inóculo teste

As bactérias foram inicialmente semeadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) ágar e incubadas a $37^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 horas, sequencialmente realizou-se o preparo de uma solução padrão McFarland a 0,5% em tubos contendo solução salina estéril a 0,9%. A densidade da turbidez foi verificada em espectrofotômetro com fonte de luz de 1 cm, cubeta apropriada e utilizando comprimento de onda de 625 nm. As absorbâncias podiam variar entre 0,080 - 0,100. Para o preparo do inóculo teste foram adicionados 400 μL do inóculo padrão a 3,6 mL de MH.

4.3.4 Disposição nas microplacas para avaliação da CIM

Cada placa de microdiluição possui 96 poços, distribuídos em 12 colunas enumeradas de 1 a 12 e 8 linhas marcadas com as letras de A a H (Figura 1).

Figura 1 - Microplaca utilizada para o teste de microdiluição



(Fonte: Dados da pesquisa)

Em cada microplaca foram testados em uma mesma cepa, dois derivados em triplicata, ou seja, em cada uma as linhas A, B e C foram destinadas para uma molécula, bem como as linhas D, E e F para outro protótipo molecular, a linha G foi utilizada para adição do antibiótico controle, a H para o controle microbiológico e a coluna 12 para o controle da esterilidade do meio de cultura. A sequência de pipetagem para os testes, está descrita a seguir:

1°- Colocou-se 100 μ L do meio de cultura Müller Hinton caldo em todos os poços, com exceção dos sete primeiros da primeira coluna;

2°- Adicionou-se 100 μ L da solução teste da molécula aos seis primeiros poços e outros 100 μ L aos respectivos poços vizinhos. A partir deste segundo poço eram retirados 100 μ L e acrescentados ao terceiro poço e assim por diante, sendo feito descarte dos últimos 100 μ L no penúltimo poço;

3°- Os poços da linha G seguiram o mesmo método, modificando apenas a solução teste utilizada, que para estes foi a do antibiótico controle, a ceftriaxona;

4°- 10 μ L do inóculo teste foram adicionados a todos poços;

5°- Por fim, as microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C \pm 1°C por 24 horas.

A quantidade de crescimento nos poços contendo a diluição teste da molécula foi comparada com a quantidade de crescimento nos poços de controle de crescimento (sem antibiótico) usada em cada conjunto de testes.

4.3.5 Preparo do corante cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TFTZ) e determinação da CIM

O corante TFTZ, é fornecido na forma de pó e portanto necessita ser solubilizado, o cálculo para a preparação das 6 mL necessárias, segue exposto:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$99,0\% \cdot V_1 = 0,5\% \cdot 6 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,03$$

Após as 24 horas de incubação foram adicionados 20 μL do corante a todos os poços das placas e estas retornaram à estufa por mais três horas. A determinação da CIM, baseou-se na mudança da coloração do poço, visto que, o TFTZ é incolor e quando ocorre atividade microbiana ele assume uma cor avermelhada. Definiu-se a CIM como sendo a menor concentração onde foi possível detectar visualmente a ausência do crescimento bacteriano (MABONA et al., 2013).

4.4 PLAQUEAMENTO DA CIM POR MEIO DA TÉCNICA DO SPREAD-PLATE

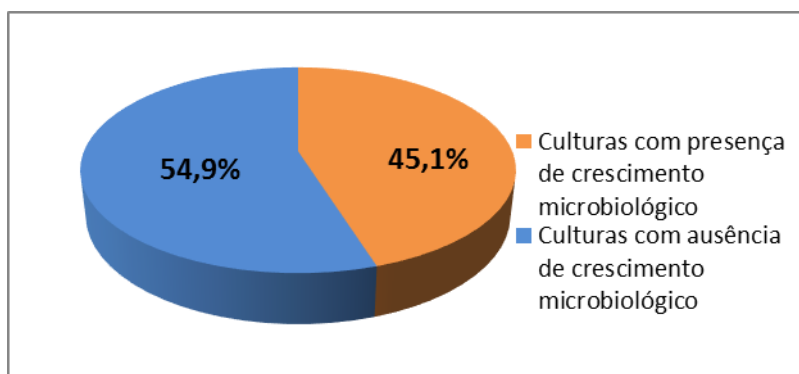
A confirmação da ação bacteriostática foi feita a partir do plaqueamento do conteúdo dos poços, utilizando para isto a técnica do spread-plate. Dois métodos foram utilizados, um primeiro tomando 10 μL do poço em que se constatou a CIM e realizando o semeio em placa contendo meio de cultura ágar BHI, espalhado com a ajuda da alça de Drigalsky, e um segundo por meio de diluições seriadas dos poços nos quais verificou-se as CIMs e dos poços com a concentração imediatamente menor. Para estas diluições, 1 mL de água destilada e 1 μL do crescimento foram colocados em tubos estéreis, realizando homogeneização. Continuamente ,1 μL desta diluição foi utilizado para o semeio previamente citado. Estes procedimentos foram repetidos para as quinze CIM's determinadas, bem como para as outras quinze concentrações inferiores à elas e para um poço controle de cada cepa. As placas foram incubadas a $37^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 horas e a leitura foi feita em contador de colônias manual.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO

Buscando elucidar o cenário atual das infecções hospitalares (IHs), foram coletados os dados de 377 culturas desta origem, apresentando em 170 destas (Figura 2), crescimento microbiológico. Segundo Moura et al. (2007), apesar da legislação vigente, os índices de infecções nosocomiais continuam altos, 15,5%, o que corresponde a 1,18 episódios de infecção por paciente.

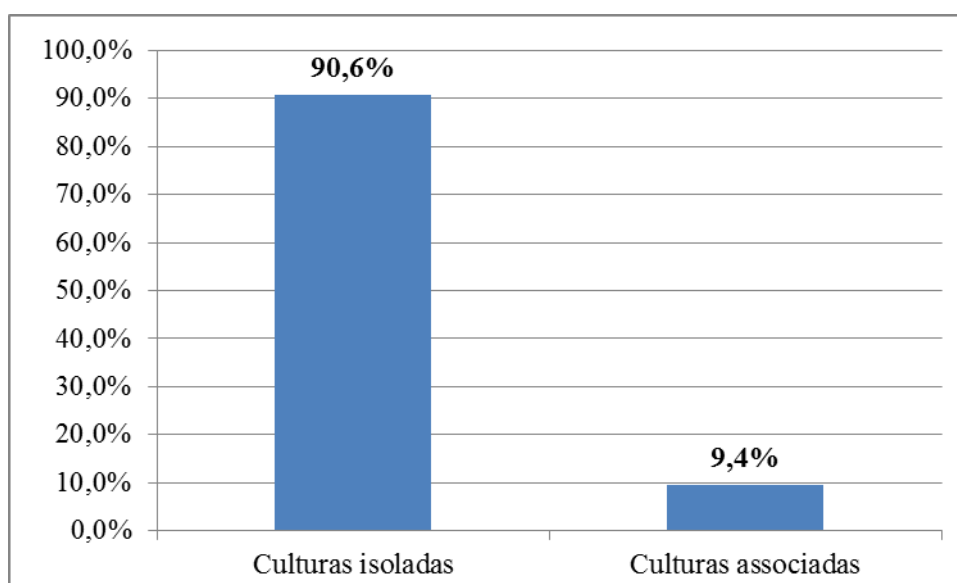
Figura 2 - Relação entre os resultados de todas as culturas hospitalares analisadas



(Fonte: Arquivo do Centro de Hematologia e Laboratório de Análises Clínicas – HEMOCLIN)

Das 170 culturas com positividade microbiana, 154 destas apresentaram crescimento bacteriano isolado, enquanto que em 16 verificou-se associação entre patógenos (Figura 3).

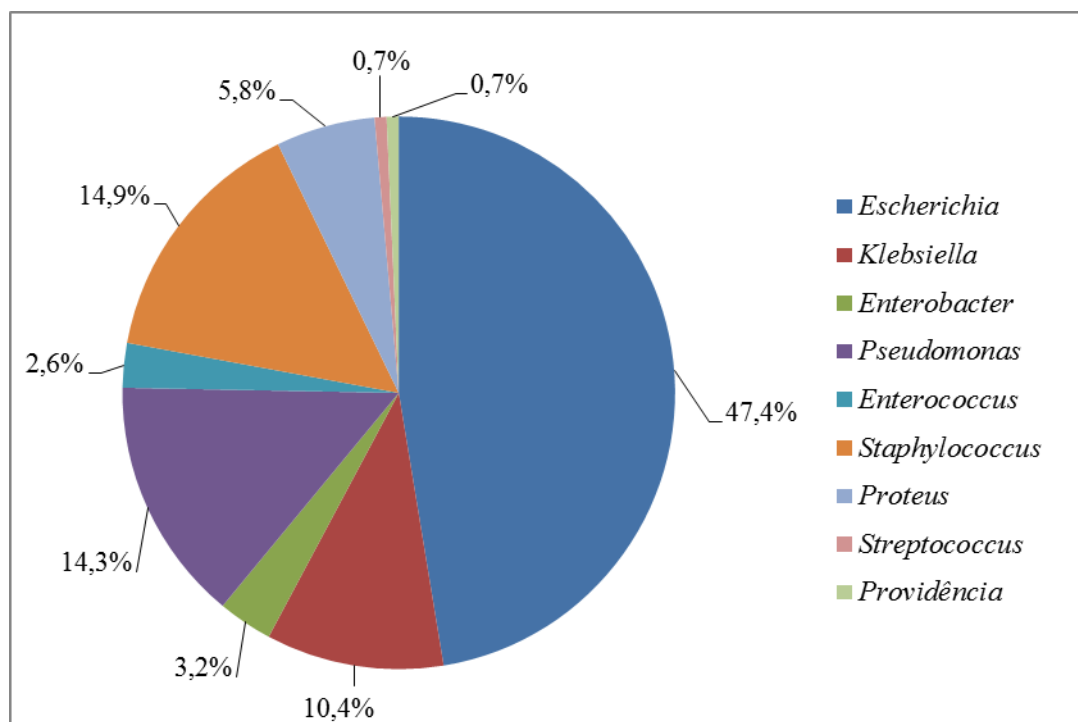
Figura 3 - Distribuição das culturas com crescimento isolado e associado



(Fonte: Arquivo do Centro de Hematologia e Laboratório de Análises Clínicas – HEMOCLIN)

Nas 154 culturas puras, observou-se o crescimento dos seguintes gêneros microbianos: *Enterobacter*; *Enterococcus*; *Escherichia*; *Klebsiella*; *Proteus*; *Providência*; *Pseudomonas*; *Staphylococcus* e *Streptococcus* (Figura 4).

Figura 4 - Variedade microbiológica encontrada nas culturas isoladas

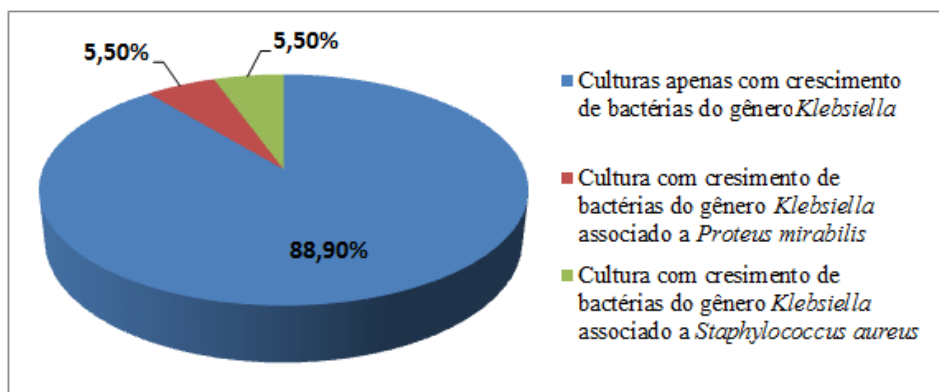


(Fonte: Arquivo do Centro de Hematologia e Laboratório de Análises Clínicas – HEMOCLIN)

Segundo Andrade, Leopoldo e Haas (2006) os gêneros dos patógenos mais frequentemente constatados como causadores de infecção em instituições hospitalares, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, são: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Enterobacter*. O alto percentual observado para o gênero *Escherichia*, condiz com estudo retrospectivo realizado por Silva et al. (2014) em que das 1.173 culturas positivas para Gram-negativos, 57% apresentaram crescimento deste gênero. Segundo Koneman et al. (2001), este é o tipo bacteriano mais incidente em infecções no mundo inteiro. Como visto na Figura 4 o gênero *Klebsiella* foi apenas o quarto mais expresso, contradizendo o verificado por Carvalho (2014), que relata a presença equivalente dos dois patógenos, *Escherichia* e *Klebsiella*, cada um representando 33% dos resultados das culturas analisadas.

Das 170 culturas positivas, 18 (10,6%) apresentaram crescimento de bactérias do gênero *Klebsiella* e dentre estas 2 exibiram associação com outros micro organismos (Figura 5).

Figura 5 - Distribuição percentual de culturas isoladas e associadas para o gênero *Klebsiella*



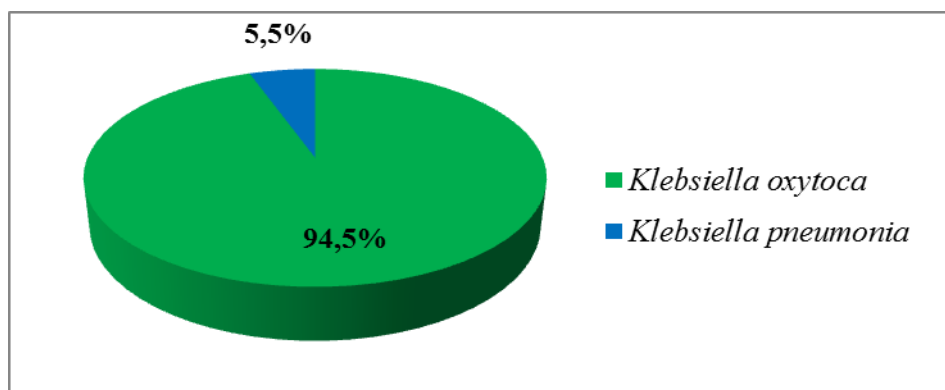
(Fonte: Arquivo do Centro de Hematologia e Laboratório de Análises Clínicas – HEMOCLIN)

A espécie bacteriana *Staphylococcus aureus* é bastante comum e é também a mais virulenta do seu gênero. A disseminação pode ser endógena, quando há presença deste patógeno colonizando indivíduos saudáveis e pode ser exógena, dando-se por contato direto ou através de fômites, podendo desta forma associar-se a outros patógenos previamente instalados (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2014).

Já a associação com os representantes do gênero *Proteus* spp., se dá pelo fato de ambos produzirem as proteínas de membrana externa (PMEs) que têm em comum suas estruturas e funções, associando facilmente a proliferação destes patógenos (PALUSIAK, 2015).

Conforme a Figura 6, dentre as culturas com positividade para o gênero em estudo, uma espécie demonstrou predomínio em relação à segunda também descrita.

Figura 6 - Distribuição percentual das espécies bacterianas descritas



(Fonte: Arquivo do Centro de Hematologia e Laboratório de Análises Clínicas – HEMOCLIN)

O percentual elevado para a espécie *K. oxytoca*, discorda do afirmado por Wollheim (2009), que diz que a *K. pneumoniae* é bem mais frequente em isolados hospitalares, se comparados com os resultados encontrados para a *K. oxytoca*.

Resultados discordantes dos nossos também são reportados por Oliveira et al. (2009) onde dos 90 micro organismos selecionados, 64 (71,1%) foram identificados como *Klebsiella pneumoniae* e apenas 4 (4,4%) como *Klebsiella oxytoca*, e por Dienstmann et al. (2010) em que das 30 cepas analisadas, 21 (70%) eram da espécie *pneumoniae*, 1 (3,33%) da espécie *oxytoca*. Em análise realizada por Watson et al. (2005), observou-se que os surtos associados aos cuidados de saúde causados por *K. oxytoca*, foram mais frequentemente vinculados com a contaminação dos reservatórios ambientais, tais como desinfetantes, frascos de múltiplas doses, sacos de fluido, umidificadores e dispositivos de ventilação. Um estudo realizado por Lowe e colaboradores (2012), sugere que os sumidouros de lavagem das mãos de um hospital em Toronto – Canadá, podem ter servido de reservatório para este micro-organismo, explicando para tanto a duração de quatro anos de um surto deste patógeno, no hospital referido pelos autores.

Com relação ao sítio de ocorrência da infecção, a Tabela 2 mostra que o maior número de patógenos foi encontrado em culturas de urina.

Tabela 2 - Distribuição dos casos de acordo com o sítio de ocorrência da infecção

Sítio de ocorrência	Valor absoluto	Valor relativo
Uroculturas	12	66,6%
Secreção de ferida cirúrgica	2	11,0%
Secreção do tubo-oro-traqueal (TOT)	1	5,6%
Secreção nasal	1	5,6%
Secreção axilar	1	5,6%
Secreção anal	1	5,6%

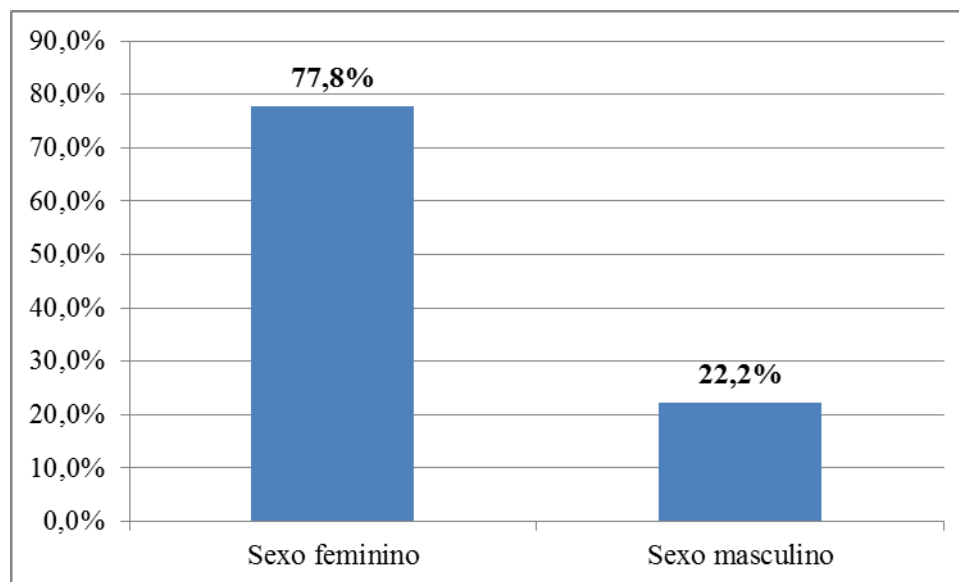
(Fonte: Arquivo do Centro de Hematologia e Laboratório de Análises Clínicas – HEMOCLIN)

Como dito por Esmerino, Gonçalves e Schelesky (2003), as infecções urinárias, correspondem a 35-45% de todas as infecções adquiridas no âmbito hospitalar. Em sua grande parte, estas infecções são causadas por bactérias, principalmente as Gram-negativas, podendo ocasionalmente estarem envolvidos fungos e vírus (ORTIZ e MAIA, 1999). A alta incidência de uroculturas positivas verificada no estudo corrobora com os resultados de Amadeu et al. (2009), nos quais das 133 amostras analisadas, 64 foram positivas (48,1%) para infecção do trato urinário. As bactérias pertencentes ao gênero *Klebsiella*, são patógenos muito mais relacionados a infecções nosocomiais, causando infecções como ITUs; da corrente sanguínea; do trato respiratório baixo; intra-

abdominais; trato biliar; meningite neonatal e infecção de ferida operatória (BORGES et al., 2014).

De acordo com a Figura 7 o sexo mais acometido foi o feminino, com 14 (77,8%) casos e destes 12 (78,6%) eram de urocultura.

Figura 7 - Relação entre os gêneros averiguados



(Fonte: arquivo do centro de hematologia e laboratório de análises clínicas – HEMOCLIN)

Semelhanças aos resultados encontrados na pesquisa foram reportadas por Santos et al. (2015), em que das 481 uroculturas analisadas, pode-se observar uma maior incidência em pacientes do sexo feminino (88,44%) e por Oliveira (2010) que encontrou 82% de positividade para o sexo feminino em 390 culturas processadas e por Silva et al. (2007), que constataram um valor de 85,7% de culturas positivas para mulheres, dentre 98 culturas avaliadas.

Sendo mais frequentes no sexo feminino, com aumentos provavelmente relacionados à intensidade de atividade sexual, e a outros fatores como a menopausa. A susceptibilidade da mulher às ITUs, deve-se à uretra curta e a sua maior proximidade com o ânus e o vestíbulo vaginal, enquanto que, para o homem o maior comprimento uretral, maior fluxo urinário e o fator antibacteriano prostático, servem como protetores para esses eventos (HEILBERG e SCHOR, 2003).

A Tabela 3 elucida os grupos etários verificados, dos quais a maior distribuição ocorreu entre 16 a 45 e >60 anos.

Tabela 3 - Distribuição dos casos de acordo com a faixa etária constatada

Faixa etária (anos)	Valor absoluto	Valor relativo
0 – 15	1	5,6%
16 – 45	9	50,0%
46 – 60	2	11,1%
>60	6	33,3%
TOTAL	18	100%

(Fonte: Arquivo do Centro de Hematologia e Laboratório de Análises Clínicas – HEMOCLIN)

Os resultados apresentados são apoiados pelo estudo realizado por Châmbro Filho (2013), onde 57,2% da culturas analisadas, foram oriundas de pacientes com idade entre 15 e 55 anos. Com relação ao segundo grupo etário mais acometido, Hooton (2012) e Izaias et al. (2014) afirmam que devido aos elevados períodos de hospitalização, à baixa tolerância aos procedimentos e a utilização demorada de dispositivos invasivos, aos quais são expostos, torna pessoas idosas vulneráveis às IHS.

Buscando analisar a resistência bacteriana às drogas, montou-se os fenótipos das 18 culturas com crescimento de micro organismos do gênero *Klebsiella* (Tabela 4).

Tabela 4 - Fenótipos de resistência encontrados com base nos resultados dos antibiogramas

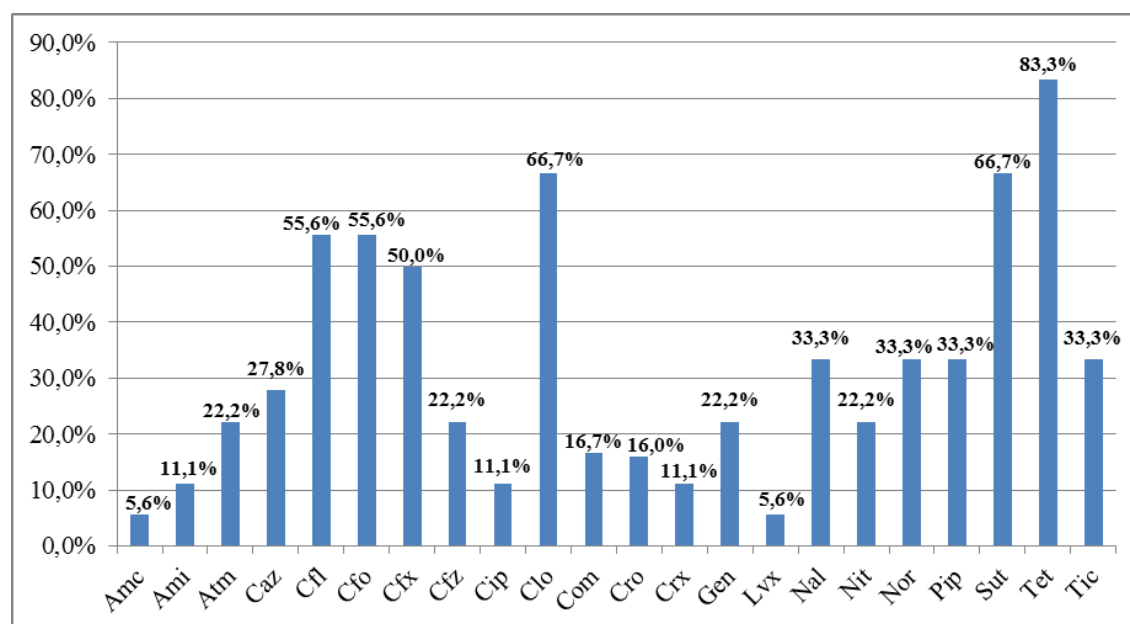
Amostra	Fenótipo	Nº de antimicrobianos
55190	Sut	1
40722	Tet	1
55191	CfoCfxClo	3
36874 e 48517	CloSutTet	3
40800	CflNitSutTet	4
42143	NalPipSutTet	4
51701	CazCflCfoCfxCloTet	6
40632	CflCfoCloNorSutTic	6
49069/143	CflCipCloGenNorTet	6
54188	CloGenNalPipSutTet	6
49070	AtmCflCfoCfxCfzCloSutTetTic	9
52595	CflCfoCfxCloNalNitPipSutTetTic	10
49069/145	CflCfoCfxCfzCipCloCrxNorSutTetTic	11
39192	AmiAtmCazCflCfoCfxCipCpmCloNorSutTetTic	13
43835	AmcAmiCazCflCfoCfxCloCroCrxGenLvxCroNalPipTet	14
52938	AtmCazCflCfoCfxCipCpmCroGenNalNitNorPipSutTet	15
40630	AtmCazCflCfoCfxCipCloCpmCroNalNitNorPipSutTetTic	16

(Fonte: Arquivo do Centro de Hematologia e Laboratório de Análises Clínicas – HEMOCLIN)

Legenda: Amc – amoxicilina + ácido clavulânico; Ami – amicacina; Atm – aztreonam; Caz – ceftazidima; Cfl – cefalotina; Cfo – cefoxitina; Cfx – cefalexina; Cfz – cefazolina; Cip – Ciprofloxacino; Clo – cloranfenicol; Cpm – cefepime; Cro – ceftriaxona; Crx – cefuroxima; Gen – gentamicina; Lvx – levofloxacino; Nal – ácido nalidíxico; Nit – nitrofurantoína; Nor – norfloxacino; Pip – ácido pipemídico; Sut – sulfazotrim; Tet – tetraciclina; Tic – ticarcilina + ácido clavulânico.

Como visto na Tabela 4, a repetição de fenótipos por paciente foi considerada pequena, correspondendo a 11,1%, enquanto que os distintos representaram 88,9% dos 18 fenótipos analisados. Desta forma pode-se praticamente descartar a possibilidade de contaminação entre pacientes, podendo supor que as cepas tenham sido disseminadas por intermédio de outros veículos. Segundo pesquisa realizada por Fenalte e Gelatti (2012) em amostras coletadas de 106 jalecos usados pela equipe de assistência à saúde, 19,8% continham micro organismos patogênicos. Estes autores ainda afirmam que os jalecos usados pelos profissionais podem ser uma fonte de transmissão cruzada dentro das unidades hospitalares, assim como, o perigo eminente oferecido pelas mãos e materiais contaminados. Os percentuais de resistência estão elencados na Figura 8.

Figura 8 - Percentuais de resistência para os antibióticos testados



(Fonte: Arquivo do Centro de Hematologia e Laboratório de Análises Clínicas – HEMOCLIN)

Legenda: Amc – amoxicilina + ácido clavulânico; Ami – amicacina; Atm – aztreonam; Caz – ceftazidima; Cfl – cefalotina; Cfo – cefoxitina; Cfx – cefalexina; Cfz – cefazolina; Cip – Ciprofloxacino; Clo – cloranfenicol; Cpm – cefepime; Cro – ceftriaxona; Crx – cefuroxima; Gen – gentamicina; Lvx – levofloxacino; Nal – ácido nalidíxico; Nit – nitrofurantoína; Nor – norfloxacino; Pip – ácido pipemídico; Sut – sulfazotrim; Tet – tetraciclina; Tic – ticarcilina + ácido clavulânico.

O estudo epidemiológico de bactérias patogênicas e o estabelecimento do seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos são aspectos de relevância, pois podem ser

significativamente diferentes por estarem associados a pressões seletivas locais (TRABULSI e ALTERTHUN, 2008).

Dentre os resultados percentuais obtidos, os antibióticos que apresentaram valores de resistência acima de 50% foram: Cefalotina (55,6%), Cefoxitina (55,6%), Cefalexina (50,0%), Cloranfenicol (66,7%), Sulfazotrim (66,7%) e Tetraciclina (83,3%).

Os altos valores encontrados para as cefalosporinas de 1ª geração e 2ª geração, já eram esperados, visto que trata-se de uma classe de antimicrobianos já bem conhecida e muito utilizada em infecções, possivelmente de maneira indiscriminada e aleatória (POLETO e REIS, 2005). Um bom exemplo é a análise realizada por Dias, Coelho e Dorigon (2015), das 100 amostras com crescimento de *Klebsiella* spp., 100% apresentaram resistência para cefalotina.

A elevada resistência microbiana ao sulfazotrim também foi descrita em estudo realizado por Blatt e Miranda (2005), que encontraram um índice de 41,8% de resistência dentre as 6 culturas com crescimento de *Klebsiella* spp. analisadas. A baixa sensibilidade ao sulfametoxazol+trimetoprima também foi observada por Souza (2014), em que das 39 culturas com crescimento do mesmo gênero, 60,4% apresentaram resistência a este antibiótico.

Os menores percentuais foram observados para amoxicilina + ácido clavulânico e levofloxacino, correspondendo cada um à 5,6% dos perfis de resistência encontrados. Segundo Jancel e Dudas (2002), para uma boa resposta terapêutica frente à cepas resistentes, deve-se utilizar a amoxicilina associada ao ácido clavulânico, devido ao fato das boas repostas apresentadas à terapêutica deste antibiótico. Como dito por Rieger et al. (2009), as fluoroquinolonas tem excelente atividade contra Gram-negativos clinicamente importantes, outras Enterobacteriaceae e *S saprophyticus*.

Diante do exposto torna-se imprescindível o uso consciente do arsenal terapêutico hoje em dia disponível, da mesma maneira que, as políticas de saúde pública e o seguimento de protocolos sejam aprimorados e exigidos, a fim de limitar o uso de antibióticos de amplo espectro, minimizando as pressões que levam a resistência bacteriana (PROJAN, 2003).

5.2 TESTES CONFIRMATÓRIOS PARA AS CEPAS BACTERIANAS

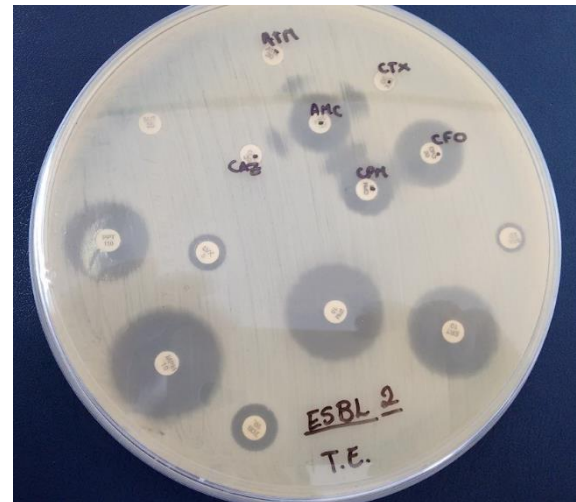
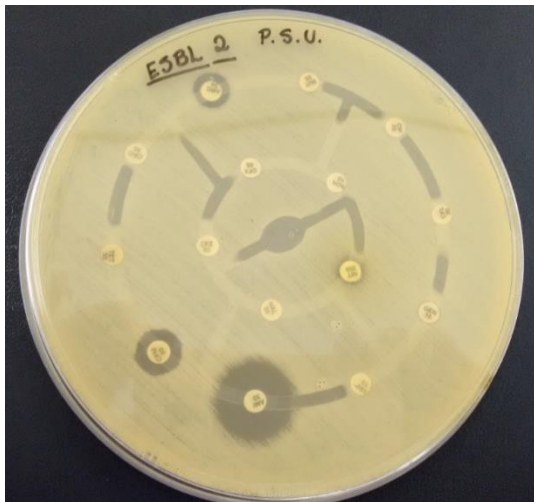
Com relação aos testes bioquímicos os resultados estão contidos na Tabela 5 e foram conferidos com base nas Tabelas 1 e 2 de Koneman et al. (2008). Constatou-se portanto, que as cepas de número 2 e 4 pertencem a subespécie *pneumoniae* e que a cepa de número 5 remete a subespécie *rhinoscleromatis*, confirmando nesta última os dados expressos pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ), para seu lote.

Tabela 5 - Resultados dos testes bioquímicos

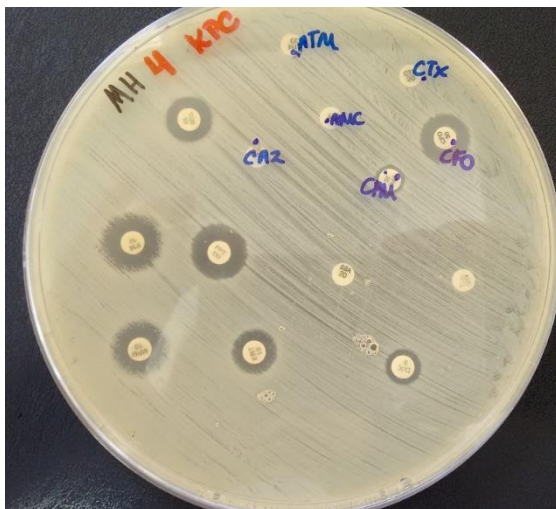
Testes bioquímicos realizados	N° da cepa correspondente		
	2	4	5
Glicose (ácido)	+	+	+
Glicose (CO ₂)	+	+	-
Lactose	+	+	-
Sacarose	-	-	-
Produção de H ₂ S	-	-	-
Motilidade	-	-	-
Indol	-	-	-
Hidrólise da uréia	+	+	-
Fenilalanina	-	-	-
Lisina descarboxilase	+	+	-
Lisina desaminase	-	-	-
Vermelho de metila	-	-	+
Voges Proskauer	+	+	-

(Fonte: Dados da pesquisa)

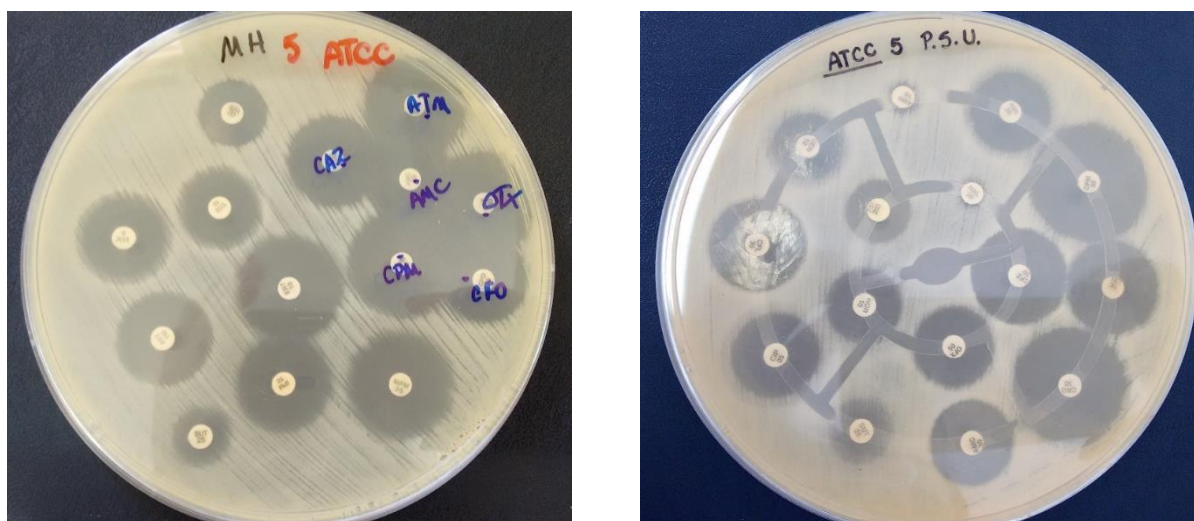
Com relação ao teste de ESBL (Figuras 9, 10 e 11), confirmou-se a presença da marca de resistência na cepa número 2 que foi dita como resistente aos cinco antibióticos β -lactâmicos testados. A amostra também expressou a zona irregular de inibição (ghost-zone), que é característica desse mecanismo de resistência, entre o disco composto e os discos das drogas β -lactâmicas. A descrição das medidas dos halos de inibição de crescimento e da interpretação para as três estirpes testadas, está reportada na Tabela 6.

Figura 9 - Teste de ESBL e antibiograma da cepa número 2

(Fonte: Dados da pesquisa)

Figura 10 - Teste de ESBL e antibiograma da cepa número 4

(Fonte: Dados da pesquisa)

Figura 11 - Teste de ESBL e antibiograma da cepa número 5

(Fonte: Dados da pesquisa)

Tabela 6 - Medida do diâmetro, em milímetros, dos halos de inibição de crescimento para o teste de ESBL

Sigla dos antibióticos testados	N° da cepa correspondente		N° da cepa correspondente		N° da cepa correspondente	
	2	Interpretação	4	Interpretação	5	Interpretação
Amc 60µg	18 mm	R	AH	R	28 mm	S
Atm 30µg	AH	R	AH	R	29 mm	S
Caz 30µg	AH	R	AH	R	27 mm	S
Cfo 30µg	21 mm	S	13 mm	R	24 mm	S
Cpm 30µg	15 mm	R	07 mm	R	31 mm	S
Ctx 30µg	AH	R	AH	R	28 mm	S

(Fonte: Dados da pesquisa)

Legenda: Amc – amoxicilina + ácido clavulânico; Atm – aztreonam; Caz – ceftazidima; Cfo – cefoxitina; Cpm – cefepime; Ctx – cefotaxima; AH – ausência de halo.

A Tabela 7 demonstra o resultado do antibiograma para os outros discos de antibióticos testados.

Tabela 7 - Medida do diâmetro, em milímetros, dos halos de inibição de crescimento para os outros antibióticos testados e para o polidisco de série urinária

Sigla dos antibióticos testados	N° da cepa correspondente		N° da cepa correspondente		N° da cepa correspondente	
	2	Interpretação	4	Interpretação	5	Interpretação
Ami 30µg	21 mm	S	19 mm	S	23 mm	S
Amc 30µg	11 mm	R	AH	R	22 mm	S
Amp 10µg	AH	R	AH	R	7 mm	R
Cfl 30µg	AH	R	AH	R	24 mm	S
Cfz 30µg	AH	R	AH	R	27 mm	S
Cip 05µg	AH	R	AH	R	22 mm	S
Cpm 30µg	12 mm	R	12 mm	R	34 mm	S
Cro 30µg	AH	S	AH	R	31 mm	S
Ert 10µg	26 mm	S	10 mm	R	30 mm	S
Gen 10µg	AH	S	17 mm	S	19 mm	S
Ipm 10µg	27 mm	S	13 mm	R	26 mm	S
Lvx 05µg	10 mm	R	09 mm	R	21 mm	I
Mpm 10µg	28 mm	S	11 mm	R	11 mm	R
Nal 30µg	AH	NA	AH	NA	07 mm	NA
Nit 300µg	07 mm	S	07 mm	S	07 mm	S
Nor 10µg	AH	R	AH	R	21 mm	I
Ofx 05µg	AH	R	AH	R	21 mm	I
Ppt 110µg	21 mm	S	14 mm	R	24 mm	S
Sba 20µg	07 mm	R	AH	R	19 mm	S
Sut 25µg	AH	R	AH	R	14 mm	I
Tet 30µg	AH	-	17 mm	-	26 mm	-
Tob 10µg	12 mm	R	12 mm	R	22 mm	S

(Fonte: Dados da pesquisa)

Legenda: Ami – amicacina; Amc – amoxicilina + ácido clavulânico; Amp – ampicilina; Cfl – cefalotina; Cfz – cefazolina; Cip – Ciprofloxacino; Cpm – cefepime; Cro – ceftriaxona; Ert - ertapenem; Gen – gentamicina; Ipm – imipenem; Lvx – levofloxacino; Mpm – meropenem; Nal – ácido nalidíxico; Nit – nitrofurantoína; Nor – norfloxacino; Ofx – ofloxacino; Ppt – piperacilina + tazobactam; Sba – sulbactam + ampicilina; Sut – sulfazotrim; Tet – tetraciclina; Tob – tobramicina; AH – ausência de halo; R – resistente; S – sensível; I – intermediário; (-) – teste de susceptibilidade não recomendado.

Como visto a cepa produtora de ESBL apresentou sensibilidade aos carbapenêmicos e ao aminoglicosídeo, amicacina, confirmando o exposto por Schwaber et al. (2004), que afirma que cepas produtoras deste tipo de beta-lactamase são sensíveis a carbapenêmicos e que a amicacina também apresenta boa atividade, mas seu uso é restrito devido a toxicidade. Segundo Villegas et al. (2008), além da associação com

outras β -lactamases, as ESBL também combinam-se a genes de resistência ao ciprofloxacino, gentamicina, piperacilina+tazobactam e outras combinações com inibidores. No entanto, a cepa utilizada no estudo só apresentou resistência ao ciprofloxacino, permanecendo sensível aos outros antibióticos mencionados.

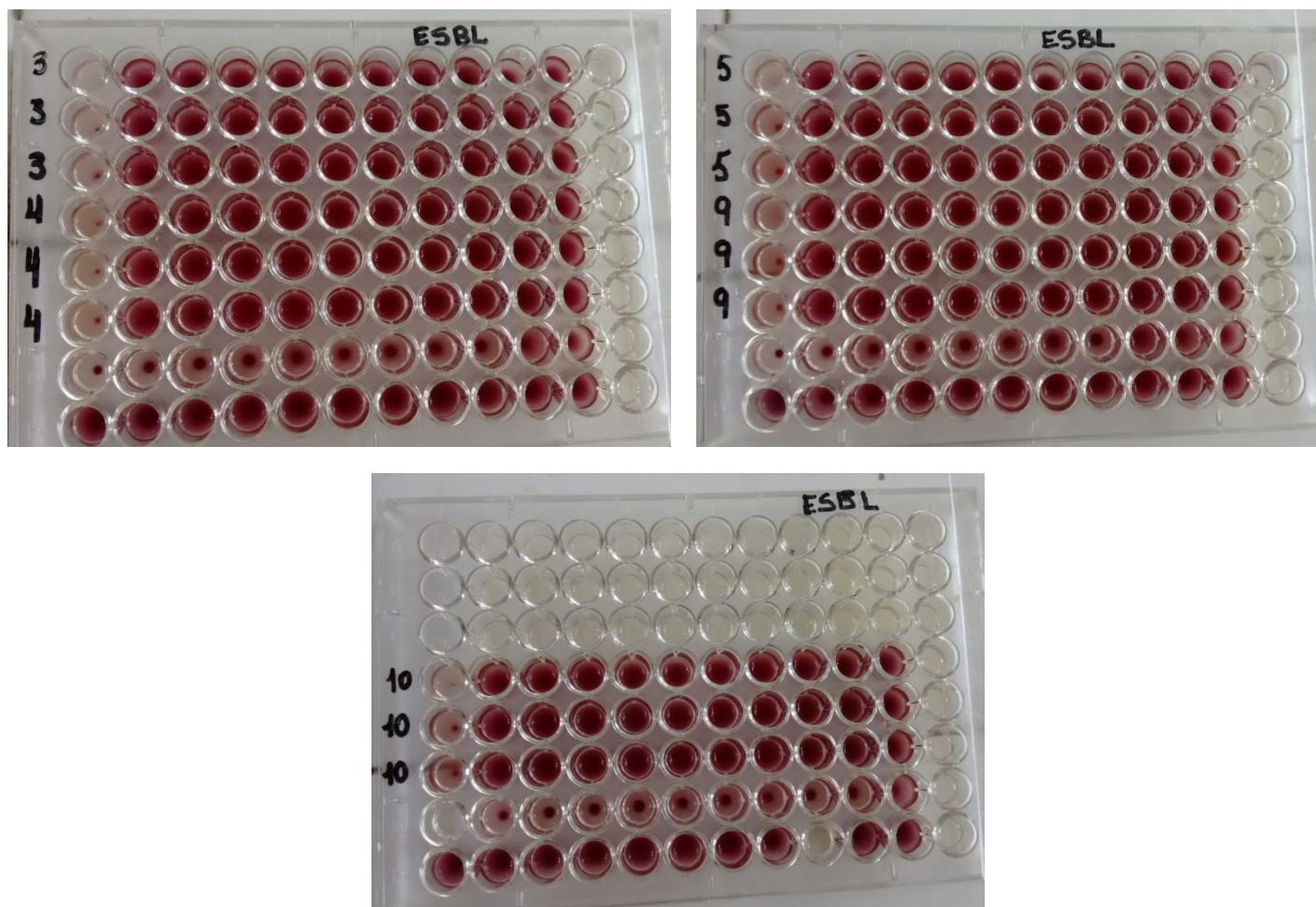
Como dito por Dienstmann et al. (2010), para a comprovação da produção de KPC são necessário testes mais aprofundados tais como: focalização isoeétrica, E-test e teste de Hodge modificado, pode-se ainda pesquisar o gene bla KPC por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Existem também sistemas de automação, no entanto, estes podem não identificar com precisão os isolados positivos. Como a cepa número 4 já havia sido previamente identificada como produtora de carbapenemase, adotou-se para simples certificação desse mecanismo o teste de disco-difusão, que é um método considerado fácil para a detecção da resistência a carbapenêmicos pelos produtores de KPC e há evidências que este seria um método confiável para confirmação de resistência a carbapenêmicos, especialmente meropenem em *Klebsiella pneumoniae* (TENOVER et al., 2006).

Como mecanismo de resistência ao imipenem, geralmente o gênero *Klebsiella* spp., recorre à alteração de porinas, esse recurso também pode conferir baixos níveis de resistência ao meropenem, e também pode recorrer a outros métodos, como as bombas de efluxo. Já para o ertapenem, os principais mecanismos de resistência são baseados na produção de carbapenemases e na perda de proteínas da membrana externa (ZANOL, PICOLI e MORSCH, 2010).

5.3 MICRODILUIÇÃO EM CALDO E TÉCNICA DO SPREAD-PLATE

A seguir está ilustrada a Figura 12, que exemplifica a bateria de testes de microdiluição realizada com as soluções teste dos protótipos moleculares e sequencialmente a Tabela 8 contempla todos os resultados obtidos.

Figura 12 - Visualização do crescimento microbiano após a coloração com TFTZ para a cepa produtora de ESBL



(Fonte: Dados da pesquisa)

Tabela 8 - Resultados da microdiluição para as moléculas testadas

Cepa Droga	ESBL	KPC	ATCC
3	> 1.024 µg/mL*	> 1.024 µg/mL*	1.024 µg/mL
4	> 1.024 µg/mL*	> 1.024 µg/mL*	1.024 µg/mL
5	> 1.024 µg/mL*	> 1.024 µg/mL*	1.024 µg/mL
9	> 1.024 µg/mL*	> 1.024 µg/mL*	1.024 µg/mL
10	> 1.024 µg/mL*	> 1.024 µg/mL*	1.024 µg/mL

(Fonte: Dados da pesquisa)

Legenda: *- diz-se maior que 1.024 porque apresentou, ainda que pouco, algum crescimento bacteriano.

Como demonstrado, para cada molécula, a concentração com menor intensidade de coloração, quando comparada ao poço seguinte, foi a 1.024 µg/mL, assim sendo, constatou-se que os cinco derivados *N*-acilidrazônicos testados apresentaram fraco potencial antibacteriano para o gênero em estudo, baseando-se para isto no exposto por Ríos e Recio (2005), onde a presença de atividade é mais caracterizada quando as CIMs giram em torno de valores menores que 100 µg/mL e Ayres et al. (2008), em que faixas de atividades entre 500-1000 µg/mL, são ditas como ineficazes.

Segundo a regra proposta por Lipinski, para que um composto expresse boa solubilidade e permeabilidade em sistemas biológicos, ele deve apresentar $\log P \leq 5$, peso molecular ≤ 500 g/mol, grupos aceptores de Hidrogênio ≤ 10 e grupos doadores de Hidrogênio ≤ 5 .

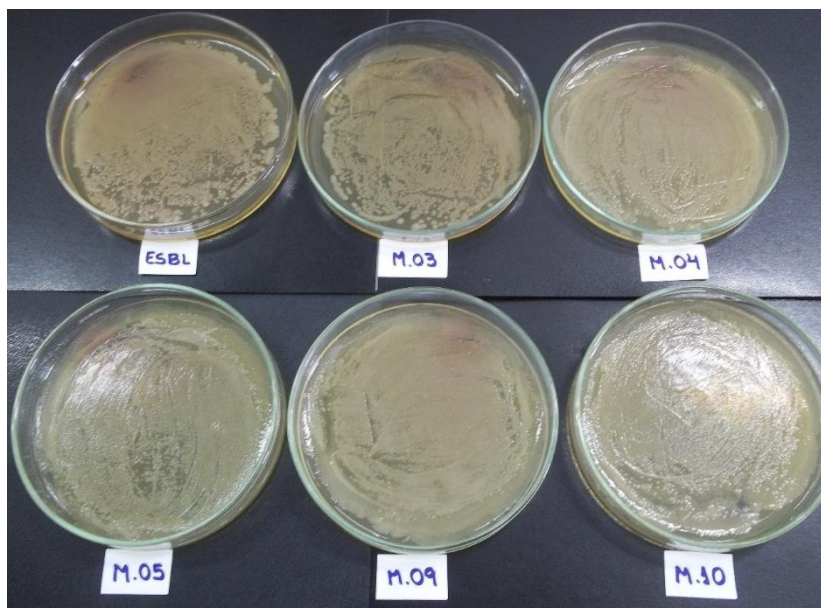
O resultado discreto para atividade antimicrobiana pode ser correlacionado com análise feita por Santos (2013), que apesar de ter constatado um menor valor da CIM (400 µg/mL) para os derivados *N*-acilidrazônicos, se comparado com os deste trabalho, também evidenciou problemas com a solubilidade dos compostos. Ao confrontar os valores de $\log P$ teóricos dos compostos testados, analisamos que outros protótipos acilidrazônicos com $\log P$ (2,44) também obedecendo a regra de Lipinski, apresentaram ação antibacteriana superior, explicando para tanto a combinação de grupos com a porção acilidrazônica (OLIVEIRA et al., 2010).

Diante disto podemos pressupor que a baixa atividade antimicrobiana está possivelmente relacionada a problemas com a baixa solubilidade dos compostos, bem como o desempenho insuficiente dos aldeídos utilizados frente ao gênero *Klebsiella*. Devido à escassez de estudos para avaliação da atividade antibacteriana destes

derivados, no gênero em questão, a discussão dos nossos resultados com outras pesquisas tornou-se difícil, impossibilitando portanto, o estabelecimento de concordância ou não com outros achados contidos na literatura.

O crescimento bacteriano observado após o plaqueamento, com pipetagem de 10 μL , direto dos poços onde constatou-se as CIMs, está exemplificado pela Figura 13.

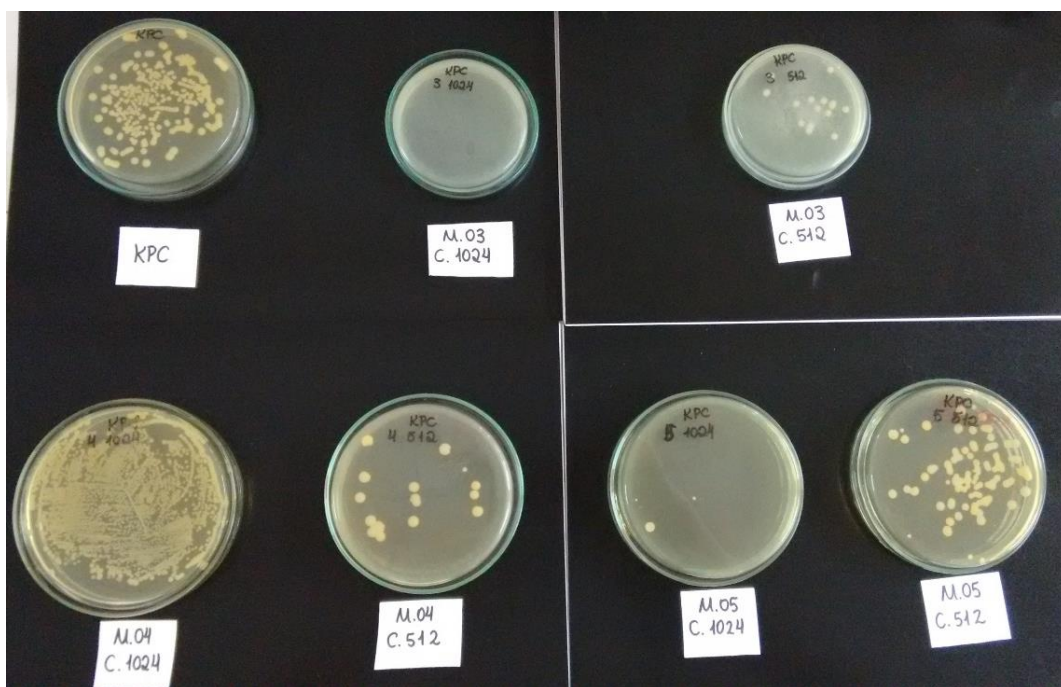
Figura 13 - Técnica do spread-plate para a estirpe produtora de ESBL



(Fonte: Dados da pesquisa)

A incapacidade de realização da contagem das colônias, em praticamente todas as placas, nos conduziu a repetir o plaqueamento (Figura 14), usando uma diluição de 1:1000 do conteúdo do poço em solução de salina estéril à 0,9%.

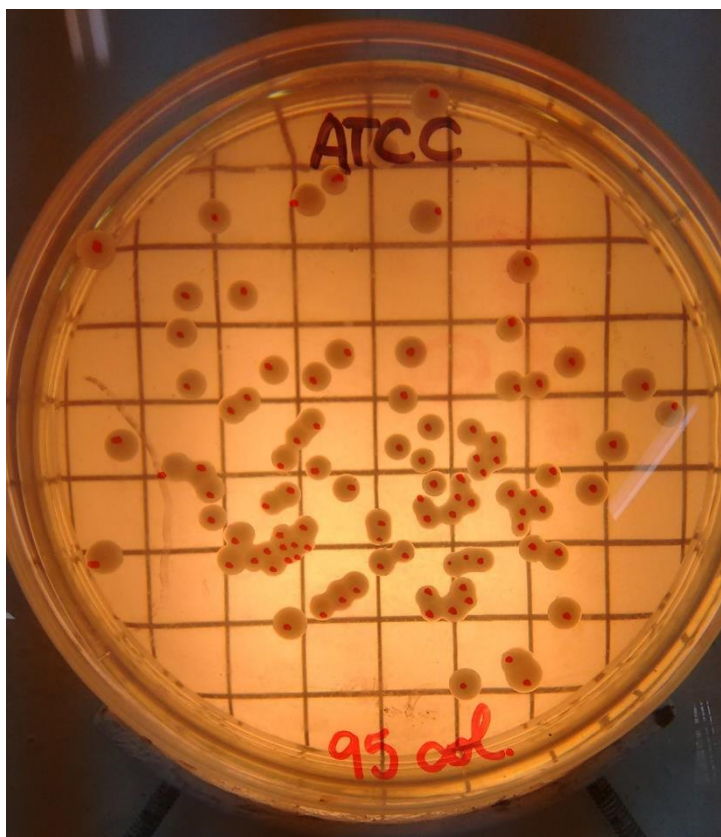
Figura 14 - Spread – plate com diluição de 1:1000 para a cepa produtora de KPC



(Fonte: Dados da pesquisa)

A contagem das colônias isoladas foi feita em contador manual conforme ilustrado no exemplo da Figura 15.

Figura 15 - Contagem das colônias em contador manual



(Fonte: Dados da pesquisa)

Os resultados obtidos através desta contagem estão elencados nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Número de colônias obtidos através da diluição 1:1000 dos poços controle

Cepa referente	Nº de col/µL	Nº de col/mL
ESBL	220. 800	220. 800.00
KPC	93. 840	93. 840. 000
ATCC	21. 850	21. 850. 000

(Fonte: Dados da pesquisa)

Tabela 10 - Relação entre os números de colônias obtidos através da diluição 1:1000 para cada cepa testada

Estipes Derivados	ESBL			KPC			ATCC		
	CIM µg/mL	Nº de col/µL	Nº de col/mL	CIM µg/mL	Nº de col/µL	Nº de col/mL	CIM µg/mL	Nº de col/µL	Nº de col/mL
3	1.024	-	-	1.024	-	-	1.024	-	-
	512	2,3x10 ²	2,3x10 ⁵	512	3,68x10 ³	3,68x10 ⁶	512	2,3x10 ²	2,3x10 ⁵
4	1.024	-	-	1.024	-	-	1.024	-	-
	512	2,3x10 ³	2,3x10 ⁶	512	4,14x10 ³	4,14x10 ⁶	512	-	-
5	1.024	-	-	1.024	4,6x10 ²	4,6x10 ⁵	1.024	-	-
	512	7,544x10 ⁴	7,544x10 ⁷	512	2,3x10 ⁴	233x10 ⁷	512	2,3x10 ²	2,3x10 ⁵
9	1.024	1,15x10 ³	1,15x10 ⁶	1.024	2,3x10 ²	2,3x10 ⁵	1.024	-	-
	512	4,6x10 ²	4,6x10 ⁵	512	1,84x10 ³	1,840x10 ⁶	512	-	-
10	1.024	2,3x10 ²	2,3x10 ⁵	1.024	4,6x10 ²	4,6x10 ⁵	1.024	2,3x10 ²	2,3x10 ⁵
	512	7,13x10 ³	7,13x10 ⁶	512	2,3x10 ²	2,3x10 ⁵	512	-	-

(Fonte: Dados da pesquisa)

Legenda: (-) – ausência de crescimento na placa

Como visto nas Tabelas 9 e 10 a contagem de colônias dos poços com as moléculas teste, diminuiu consideravelmente quando confrontada com o resultado encontrado para os poços controle. O efeito bacteriostático pode ser sugerido para a molécula 10 frente a cepa produtora de ESBL, onde o crescimento microbiano na concentração de 1.024 µg/mL, foi em torno de 96,8% menor quando comparado ao obtido na concentração imediatamente menor, bem como também, para as moléculas 5 e 9 testadas na cepa produtora de KPC, que apresentaram 98,0% e 87,5% respectivamente, de diminuição da carga bacteriana na concentração de 1.024 µg/mL, se confrontada a concentração 512 µg/mL. A ausência de crescimento nas placas para as moléculas 3, 4 e 5 testadas na cepa ESBL positiva, assim como os protótipos 3 e 4, na cepa KPC positiva e igualmente para todos os derivados avaliados na cepa controle ATCC, pode ser justificada pelo número bastante reduzido do inóculo utilizado na diluição de 1:1000. Este argumento também pode ser usado para explicar o ocorrido para as moléculas 9 e 10, nos testes com as estirpes produtoras de ESBL e KPC, nesta ordem, em que a concentração menor, 512 µg/mL, inibiu mais o crescimento do que a concentração imediatamente maior.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo, torna-se evidente a necessidade de se conhecer o perfil de sensibilidade dos agentes etiológicos aos antimicrobianos, para que os possíveis mecanismos de resistência sejam determinados e tornem-se do conhecimento dos profissionais de saúde. Buscando através disto traçar estratégias terapêuticas que atuem de forma eficaz e específica frente às infecções hospitalares. Para tanto fazem-se fundamentais os estudos de vigilância epidemiológica e o seguimento da Política de Antimicrobianos que contribui significativamente para a diminuição dos índices de IH. É imprescindível a implantação do PCA (Programa de Controle de Antimicrobianos), que tem por objetivo reduzir o surgimento de novos mecanismos de resistência bacterianos, visto que diminui a pressão seletiva.

A emergência da resistência bacteriana nos hospitais, ressalta a importância de investimentos nas pesquisas para o aprimoramento do atual arsenal medicamentoso e para a descoberta de novos fármacos. O efeito bacteriostático apresentado pelos derivados *N*-acilidrazônicos em questão, sugere que mais ensaios sejam realizados para que se possa estabelecer uma associação destes protótipos com antibióticos de uso clínico, a fim de analisar prováveis efeitos moduladores, como por exemplo, a diminuição da concentração inibitória mínima de drogas tidas como ineficazes a micro organismos multirresistentes.

REFERÊNCIAS

- ACAR, J.; LIMAYE, A.P.; MEDEIROS, A.A. Rapid Emergence of Resistance to Cefepime during Treatment [with Reply]. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, n. 6, p. 1484-1486, 1998. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/4460427?seq=1#page_scan_tab_contents>. Acesso em 23 mai. 2015.
- ALANIS, A.J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 697-705, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216651>>. Acesso em: 25 abr. 2015.
- ALMEIDA, L.P.; CARVALHO, F.P.; MARQUES, A.G.; PEREIRA, A.S.; BORTOLETO, R.P.; MARTINO, M.D.V. Desempenho do disco de ertapenem como preditor da produção de Klebsiella pneumoniae carbapenemase por bacilos Gram-negativos isolados de culturas em um hospital municipal de São Paulo. **Revista Einstein**, v. 10, n. 4, p. 439-441, 2012.
- AMADEU, A.R.O.R.M.; SUCUPIRA, J.S.; JESUS, R.M.M.; ROCHA, M.L.P. Infecções do Trato Urinário: análise da frequência e do perfil de sensibilidade da Escherichia coli como agente causador dessas infecções. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 41, n. 4, p. 275-277, 2009.
- AMBLER, R.P. The Structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/289/1036/321.short>>. Acesso em 25 mai. 2015.
- ANDERSON, K.F.; LONSWAY, D.R.; RASHEED, J.K.; BIDDLE, J.; JENSEN, B.; MCDUGAL, L.K.; CAREY, R.B.; THOMPSON, A.; STOCKER, S.; LIMBAGO, B.; PATEL, J.B. Evaluation of Methods To Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2723-2725, 2007.
- ANDRADE, D.; LEOPOLDO, V.C.; HAAS, V.J. Ocorrência de Bactérias Multirresistentes em um Centro de Terapia Intensiva de Hospital Brasileiro de Emergências. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 27-33, 2006.
- AQUINO, D.S. Por que o uso racional de medicamentos deve ser uma prioridade? **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. Sup, p. 733-736, 2008. <<http://www.scielo.org/pdf/csc/v13s0/a23v13s0.pdf>>. Acesso em 20 mai. 2015.
- AVORN, J.; SOLOMON, D.H. Cultural and economic factors that (mis) shape antibiotic use: the nonpharmacologic basis of therapeutics. **Annals of Internal Medicine**, v. 133, n. 2, p. 128-135, 2000. Disponível em: <<http://annals.org/article.aspx?articleid=713680>>. Acesso em 17 mai. 2015.
- AYRES, M.C.C.; BRANDÃO, M.S.; VIEIRA JÚNIOR, G.M.; MENOR, J.C.A.S.; SILVA, H.B.; SOARES, M.J.S.; CHAVES, M.H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.
- BABINI, G.S.; LIVERMORE, D.M. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 2, p. 183-189, 2000.

BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; FREITAS, J.C.; NERO, L.A.; SOUZA, J.A.; SANTANA, E.H.W.; FRANCO, B.D.G.M. Frequency of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 2, p. 137-140, 1999.

BLATT, J.M.; MIRANDA, M.C. Perfil dos microrganismos causadores de infecções do trato urinário em pacientes internados. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 7, n. 4, p. 10-4, 2005.

BORGES, A.A.; MAGALHÃES, L.G.; JABUR, A.P.L.; CARDOSO, A.M. Infecção Urinária em Gestantes Atendidas em um Laboratório Clínico de Goiânia-Go entre 2012 e 2013. **Revista Estudos**, v. 41, n. 3, p. 637-650, 2014.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC162717/>>. Acesso em 13 mai. 2015.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/54/3/969.short>>. Acesso em 01 jun. 2015.

BRADFORD, P.A. Extended spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.

CARVALHO, A.S. **Avaliação da resistência das bactérias identificadas na urocultura de crianças no Hospital Universitário Lauro Wanderley**, 2014. Disponível em: <<http://rei.biblioteca.ufpb.br:8080/jspui/bitstream/123456789/596/1/ASC22072014.pdf>>. Acesso em 03 jun. 2015.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute/ NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard-Sixth Edition M7-A6, v. 23, n. 2, Wayne, PA. USA, 2003.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute/ NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Fifteenth Informational Supplement M100-S15, v. 25, n. 1, Wayne, PA. USA, 2005.

CHAMBÔ FILHO, A.; CAMARGO, A.S.; BARBOSA, F.A.; LOPES, T.F.; MOTTA, Y.R. Estudo do perfil de resistência antimicrobiana das infecções urinárias em mulheres atendidas em hospital terciário. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 11, n. 2, p. 102-107, 2013.

CUZON, G.; NAAS, T.; DEMACHY, M.C.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 796–797, 2008. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/52/2/796.short>>. Acesso em 02 jun. 2015.

DIAS, I.O.V.; COELHO, A.M.; DORIGON, I. Infecção do trato urinário em pacientes ambulatoriais: prevalência e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em estudo realizado de 2009 a 2012. **Saúde (Santa Maria)**, v. 41, n. 1, p. 219-228, 2015. Disponível em: <<http://cascavel.cpd.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/revistasaude/article/view/15455/pdf>>. Acesso em 02 jun. 2015.

DIERIKX, C.M.; DUIJKEREN, E.; SCHOORMANS, A.H.W.; ESSEN-ZANDBERGEN, A.; VELDMAN, K.; KANT, A.; HUIJSDENS, X.W.; ZWALUW, K.; WAGENAAR, J.A.; MEVIUS, D.J. Occurrence and characteristics of extended-spectrum- β -lactamase and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 6, p. 1368-1374, 2012.

DIENSTMANN, R.; PICOLI, S.U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23-7, 2010.

DOYLE, D.; PEIRANO, G.; LASCOLS, C.; LLOYD, T.; CHURCH, D.L.; PITOUT, J.D.D. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877-80, 2012.

DUARTE, C.D.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 1108-1119, 2007.

DUTRA, G.G.; COSTA, M.P.; BOSENBECKER, E.O.; LIMA, L.M.; SIQUEIRA, H.C.H.; CECAGNO, D. Nosocomial infection control: role of the nurse. **Journal of Research Fundamental Care Online**, v. 7, n. 1, p. 2159-2168, 2015.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 11-21, 2008. Disponível em: <http://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=34842>. Acesso em 03 jun. 2015.

ESMERINO, L.A.; GONÇALVES, L.G.; SCHELESKY, M.E. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas *Escherichia coli* isoladas de infecções urinárias comunitárias. **Revista Biologia e Saúde**, v. 9, n. 1, p. 31-39, 2003.

EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Breakpoint Tables for Interpretation of Mics and Zone Diameters**, Version 4.0, 2014.

FENALTE, M.P.; GELATTI, L.C. Contaminação de jalecos usados pela equipe de enfermagem. **Revista Fasem Ciências**, v. 1, n. 1, p. 44-49, 2012.

FLUIT, A.C.; VISSER, M.R.; SCHMITZ, F.J. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 836-871, 2001.

FROST, L.S.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A.O.; TOUSSAINT, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 722-732, 2005.

GALMEAS, A.; BESALDUCH, J.; BARGAY, J.; MATAMOROS, N.; MOREY, M.; NOVO, A.; SAMPOL, A. A Simplified Method for Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells with-80dGC Mechanical Freezer with Dimethyl Sulfoxide as the Sole Cryoprotectant. **Leukemia & Lymphoma**, v. 17, n. 1-2, p. 181-184, 1995. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428199509051720>>. Acesso em 12 mai. 2015.

GNIADKOWSKI, M. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 1, p. 11-32, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2007.01854.x/full>>. Acesso em 27 mai. 2015.

GOLDMANN, D.A.; HUSKINS, W.C. Control of nosocomial antimicrobial-resistant bacteria: a strategic priority for hospitals worldwide. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 1, p.139-145, 1997. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/content/24/Supplement_1/S139.short>. Acesso em 06 jun. 2015.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Revista Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HEILBERG, I.P.; SCHOR, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário - ITU. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 109-116, 2003.

HIRSCH, E.B.; TAM, V.H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. 1119-25, 2010.

HOOTON, T.M.; SCHOLLES, D.; HUGHEIS, J.; WINTER, C.; ROBERTS, P.L.; STAPLETON, A.E; STERGACHIS, A.; STAMM, W.E. A Prospective Study of Risk Factors for Symptomatic Urinary Tract Infection In Young Women. **New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 7, p. 468-474, 1996.

HOOTON, T.M. Uncomplicated urinary tract infection. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 11, p. 1028-1037, 2012.

IZAIAS, É.M.; DELLAROZA, M.S.G.; ROSSANEIS, M.A.; BELEI, R.A. Cost and characterization of hospital infection among the elderly. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 8, p. 3395-3402, 2014.

JANCEL, T.; DUDAS, V. Management of uncomplicated urinary tract infections. **Western Journal of Medicine**, v. 176, n. 1, p. 51-55, 2002.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWEL JÚNIOR, V.R.; SOMMER, H.M. **Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido**. Enterobacteriaceae. 5. ed. Rio de Janeiro: MDSI, 2001.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W.M.; SCHERECKENBERGER, P.C.; WINN JÚNIOR, W. C.; PROCOP, G. W.; WOODS, G.L. **Diagnóstico Microbiológico**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LAHEY CLINICS. **β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes**. Disponível em: <<http://www.lahey.org/studies/>>. Acesso em 26 mai. 2015.

LEUNG, E.; WEIL, D.E.; RAVIGLIONE, M.; NAKATANI, H. The WHO policy package to combat antimicrobial resistance. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 89, n. 5, p. 390-392, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0042-96862011000500016>. Acesso em 04 jun. 2015.

LINCOPAN, N.; MCCULLOCH, J.A.; REINERT, C.; CASSETTARI, V.C.; GALES, A.C.; MAMIZUKA, E.M. First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 516-519, 2005.

LIPINSKI, C.A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 44, n. 1, p. 235-249, 2000.

LIVERMORE, D.M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.

LOWE, C.; WILLEY, B.; O'SHAUGHNESSY, A.; LEE, W.; LUM, M.; PIKE, K.; LAROCQUE, C.; DEDIER, H.; DALES, L.; MOORE, C.; MCGEER, A. Outbreak of Extended-Spectrum β -Lactamase-producing *Klebsiella oxytoca* Infections Associated with Contaminated Handwashing Sinks. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 8, p. 1242-1247, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3414015/>>. Acesso em 25 mai. 2015.

MABONA, U.; SHIKANGA, E.; MARSTON, A.; VUUREN, S.V. Antimicrobial activity of southern African medicinal plants with dermatological relevance: From an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of a bioactive compound. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 45-55, 2013.

MADISON, B.; OFEK, I.; CLEGG, S.; ABRAHAM, S.N. Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* influence sugar-binding specificities of their FimH adhesins. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 843-848, 1994. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/62/3/843.short>>. Acesso em 18 mai. 2015.

METWALLY, K.A.; ABDELAZIZ, L.M.; LASHINE, E.S.M.; HUSSEINY, M.I.; BADAWY, R.H. Hydrazones of 2-aryl-quinoline-4-carboxylic acid hydrazides: synthesis and preliminary evaluation as antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 24, p. 8675-8682, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089606006833>>. Acesso em 05 jun. 2015.

MEYER, G.; PICOLI, S.U. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**, v. 47, n.1 p. 25-31, 2011.

MOLAND, E.S.; HANSON, N.D.; BLACK, J.A.; LOCKHART, T.J.; HOSSAIN, A.; JOHNSON, J.A.; GOERING, R.V.; THOMSON, K.S. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 711-714, 2003.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A.F.; ASENSI, M.D.; PEIRANO, G.; GALES, A.C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333-334, 2009. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/53/1/333.short>>. Acesso em 22 mai. 2015.

MOSQUITO, S.; RUIZ, J.; BAUER, J.L.; OCHOA, T.J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli*-associated diarrhea. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 28, n. 4, p. 648-656, 2011.

MOURA, M.E.B; CAMPELO, S.M.A; BRITO, F.C.P; BATISTA, O.M.A.; ARAÚJO, T.M.E.; OLIVEIRA, A.D.S. Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 60, n. 4, p. 416-421, 2007.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiología médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

OLIVEIRA, C.F.; FORNO, N.L.F.D.; ALVES, I.A.; HORTA, J.A.; RIEGER, A.; ALVES, S.H. Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de β -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 556-560, 2009.

OLIVEIRA, J.F.; LACERDA, M.V.G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J.L.B.; TAUIL, P.L.; RIBEIRO, C.T.D. Review Malaria in Brazil: an overview. **Journal Malaria**, v. 9, n. 115, p. 1-15, 2010.

OLIVEIRA, M.J.C.P. **Estudo de resistência da bactéria Escherichia Coli a antibióticos em infecções urinárias na população da Região Autónoma da Madeira**. 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) Universidade da Madeira. Funchal, 2010.

OLIVEIRA, C. B. S.; DANTAS, V. C. R.; MOTTA NETO, R.; AZEVEDO, R. M.; MELO, M. C. N. Frequência e perfil de resistência de *Klebsiella* spp. em um hospital universitário de Natal/RN durante 10 anos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 6, p. 589-94, 2011.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

ORTIZ, V.; MAIA, R.S. Como diagnosticar e tratar infecções do trato urinário. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 56, p. 149-155, 1999.

PALUSIAK, A. The antigens contributing to the serological cross-reactions of Proteus antisera with *Klebsiella* representatives. **Molecular Immunology**, v. 64, n. 1, p. 228-234, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589014003289>>. Acesso em 02 jun. 2015.

PATERSON, D.L.; KO, W.C.; GOTTBORG, A.V.; CASELLAS, J.M.; MULAZIMOGLU, L.; KLUGMAN, K.P.; BONOMO, R.A.; RICE, L.B.; MCCORMACK, J.G.; YU, V.L. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2206-2212, 2001.

PATERSON, D.L.; ROSSI, F.; BAQUERO, F.; HSUEH, P.R.; WOODS, G.L.; SATISHCHANDRAN, V.; SNYDER, T.A.; HARVEY, C.M.; TEPLER, H.; DINUBILE, M.J.; CHOW, J.W. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 965-973, 2005.

- PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E.M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704688/>>. Acesso em 08 jun. 2015.
- PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; PASSOS, V. L.V.; PINTO, M.C.F.G.; GUERRA, L.R.; ASENSI, M.D. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 265–268, 2009.
- PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.
- PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.
- POIREL, L.; HÉRITIER, C.; PODGLAJEN, I.; SOUGAKOFF, W.; GUTMANN, L.; NORDMANN, P. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV β -lactamase that compromises the efficacy of imipenem. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 755-758, 2003. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/47/2/755.short>>. Acesso em 22 mai. 2015.
- POLETO, K.Q.; REIS, C. Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na Cidade de Goiânia, GO. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 416-420, 2005.
- PROJAN, S.J. Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 427-430, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527403001097>>. Acesso em 29 mai. 2015.
- QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.
- RASMUSSEN, B.; BUSH, K.; KEENEY, D.; YANG, Y.; HARE, R.; O’GARA, C.; MEDEIROS, A.A. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 9, p. 2080-2086, 1996. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/40/9/2080.short>>. Acesso em 22 mai. 2015.
- RIEGER, A.; FERRUGEM, F.; HORTA, G.; OLIVEIRA, C.D.; CARNEIRO, M.; HORTA, J.A. Prevalência de patógenos bacterianos e susceptibilidade aos antimicrobianos em infecções do trato urinário de amostras ambulatoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 41, n. 2, p. 87-89, 2009.
- RÍOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 80-84, 2005.
- ROCHA, D.P.; PINTO, G.F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C.A.; GUERRA, W. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Revista Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 111-118, 2011.
- ROLLAS, S.; GULERMAN, N.; ERDENIZ, H. Synthesis and antimicrobial activity of some new hydrazones of 4-fluorobenzoic acid hydrazide and 3-acetyl-2, 5-disubstituted-

1, 3, 4-oxadiazolines. **II Farmaco**, v. 57, n. 2, p. 171-174, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014827X01011922>>. Acesso em 01 jun. 2015.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ, L.; SILVA, J.; ROMERO, E.M. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 27-35, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202004702349>>. Acesso em 12 mai. 2015.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. **Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma**. Ed. Atheneu. São Paulo, 2005.

SADER, H.S. Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 91-99, 2000.

SANTOS, J.C.S. **Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica preliminar de derivados n-acilidrazônicos**. 2013. Disponível em: <<http://dspace.bc.uepb.edu.br:8080/jspui/bitstream/123456789/2822/1/PDF%20-%20Jander%20Cain%20da%20Silva%20Santos.pdf>>. Acesso em 03 jun. 2015.

SANTOS, A.V.; SILVA, A.A.O.; SOUSA, A.F.L.; CARVALHO, M.M.; CARVALHO, L.R.B.; MOURA, M.E. Perfil epidemiológico da sepse em um hospital de urgência. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 1, n. 1, p. 19-30, 2015.

SCHWABER, M.J.; RANEY, P.M.; RASHEED, J.K.; BIDDLE, J.W.; WILLIAMS, P.; MCGOWAN JÚNIOR, J.E.; TENOVER, F.C. Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum β -lactamases in non-*Escherichia coli* and non-*Klebsiella* spp. of Enterobacteriaceae. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 1, p. 294-298, 2004.

SHIBATA, N.; DOI, Y.; YAMANE, K.; YAGI, T.; KUROKAWA, H.; SHIBAYAMA, K.; KATO, H.; ARAKAWA, Y. PCR Typing of Genetic Determinants for Metallo- β -Lactamases and Integrases Carried by Gram-Negative Bacteria Isolated in Japan, with Focus on the Class 3 Integron. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5407-5413, 2003.

SHLAES D.M.; GERDING D.N.; JOHN J.F.; CRAIG W.A.; BORNSTEIN D.L.; DUNCAN, R.A.; ECKMAN, M.R.; FARRER, W.E.; GREENE, W.H.; LORIAN, V.; LEVV, S.; MCGOWAN JÚNIOR, J.E.; PAUL, S.M.; RUSKIN, J.; TENOVER, F.C.; WATANAKUNAKORN, C. Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. 3, p.584-599, 1997. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/content/25/3/584.short>>. Acesso em 06 jun. 2015.

SILVA, J.C.O.; FARIAS, T.F.F.; SANTOS, A.L.; FRANÇOLIN, A.C.; SVIDZINSKI, T.I.E. Infecções urinárias de origem bacteriana diagnosticadas em Umuarama-Pr. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 1, p. 59-61, 2007.

SILVA, J.C.; SOARES, M.M.S.R.; GONÇALVES, S.A. SILVA, J. C. Estudo retrospectivo de bactérias gram-negativas isoladas a partir de uroculturas e

determinação de seu perfil de resistência. **News Lab.**, v. 122, p. 82-90, 2014. Disponível em: <http://www.newslab.com.br/newslab/revista_digital/122/artigo-4.pdf>. Acesso em 13 mai. 2015.

SMOLINSKI, M.S.; HAMBURG, M.A.; LEDERBERG, J. **Microbial threats to health: emergence, detection, and response**. 2. ed. Washington: DC, 2003.

SOUZA, L.F. **Prevalência de infecção do trato urinário em pacientes atendidos no Hospital Universitário Alcides Carneiro no período de janeiro à junho de 2013**, 2014. Disponível em: <<http://dspace.bc.uepb.edu.br:8080/jspui/bitstream/123456789/4271/1/PDF%20-%20Luciano%20Francisco%20de%20Souza.pdf>>. Acesso em 01 jun. 2015.

SPELLBERG, B.; POWERS, J.H.; BRASS, E.P.; MILLER, L.G.; EDWARDS JÚNIOR, J.E. Trends in Antimicrobial Drug Development: Implications for the Future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1279-1286, 2004. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/content/38/9/1279.short>>. Acesso em 15 abr. 2015.

TAFUR, J.D.; TORRES, J.A.; VILLEGAS, M.V. Mecanismos de resistência a los antibióticos en bacterias Gram negativas. **Revista Infectio**, v. 12, n. 3, p. 227-232, 2008.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. 3-10, 2006.

TENOVER, F. C.; KALSI, R. K.; WILLIAMS, P. P.; CAREY, R.B.; STOCKER, S.; LONSWAY, D.; RASHEED, K.J.; BIDDLE, J.W.; MCGOWAN JÚNIOR, J.E.; HANNA, B. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1209–1213, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3291231/>>. Acesso em 03 jun. 2015.

THOMAS, C.M.; NIELSEN, K.M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 711-721, 2005.

THOMSON, K.S. Extended-Spectrum- β -Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1019-1025, 2010.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUN, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu. 2008.

VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

VILLEGAS, M. V.; KATTAN, J.N.; QUINTEROS, M.G.; CASELLAS, J.M. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. s1, p. 154-158, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2007.01869.x/full>>. Acesso em 22 mai. 2015.

WATSON, J.T.; JONES, R.C.; SISTON, A.M.; FERNANDEZ, J.R.; MARTIN, K.; BECK, E.; SOKALSKI, S.; JENSEN, B.J.; ARDUINO, M.J.; SRINIVASAN, A.; GERBER, S.L. Outbreak of catheter-associated *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter cloacae* bloodstream infections in an oncology chemotherapy center. **Archives of**

Internal Medicine, v. 165, n. 22, p. 2639-2643, 2005. Disponível em: <<http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=766802>>. Acesso em 01 jun. 2015.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida. **Uso racional de medicamentos**, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004. Disponível em: <http://www.extensao.cederj.edu.br/material_didatico/sau2203/pdfs/aula05_LC.pdf>. Acesso em 12 mai. 2015.

WOLLHEIM, C. **Epidemiologia molecular de Escherichia coli e Klebsiella spp produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado**. 2009. 153 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade de Caxias do Sul. Instituto de Biotecnologia. Programa da PósGraduação em Biotecnologia. Caixias do Sul, 2009.

ZANOL, F.M.; PICOLI, S.U.; MORSCH, F. Detecção fenotípica de metalo β lactamase em isolados clínicos de Pseudomonas aeruginosa de hospitais de Caxias do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**, v. 46, n. 4, p. 309-14, 2010.

ZIMERMAN, R.A. Uso Indiscriminado de Antimicrobianos e resistência microbiana. **Uso racional de medicamentos: Temas selecionados. Ministério da saúde**, n. 3, 2010. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/uso_racional_medicamentos_temas_selecionados.pdf>. Acesso em 23 mai. 2015.