

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À
HEMATOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES DE RESISTÊNCIA ÀS β -
LACTAMASES EM ISOLADOS DE *CHRYSEOBACTERIUM INDOLOGENES***

ELLEN ALBUQUERQUE DE FREITAS

MANAUS

2017

ELLEN ALBUQUERQUE DE FREITAS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES DE RESISTÊNCIA ÀS β -
LACTAMASES EM ISOLADOS DE *CHRYSEOBACTERIUM INDOLOGENES***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, em convênio com a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas para obtenção do grau de Mestre em Hematologia

Orientadora: Dra. Cristina Motta Ferreira

Co-orientador: Dr. William Antunes Ferreira

MANAUS

2017

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária da Fundação Hemoam: **Ana Cristina Chagas Sena CRB-11/348**

F514c Freitas, Ellen Albuquerque.

Caracterização molecular de genes de resistência às β -lactamases em isolados de *Chryseobacterium indologenes*. Manaus: UEA/FHEMOAM 2017.

78 p. Ilust.

Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas em Hematologia) – Universidade do Estado do Amazonas e Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Escola de Ciências da Saúde (ESA).

Orientadora: Prof^a. Dra. Cristina Motta Ferreira

Co-orientador: William Antunes Ferreira

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 04/2017

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO (A) ALUNO (A) AO TÍTULO DE MESTRE (A)

TURMA 03/2015

No dia vinte e cinco do mês de maio de 2017, as 14h30 realizou-se a Sessão Pública da Defesa de Dissertação: **“Caracterização molecular de genes de resistência às β -lactamases em isolados de *Chryseobacterium indologenes*”**. Apresentada por **Ellen Albuquerque de Freitas**, para obtenção do título de mestra; Área de Concentração: Onco-Hematologia.

A banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

Prof. (a) Dr. (a) Cristina Motta Ferreira (Presidente)
Prof. (a) Dr. (a) Gemilson Soares Pontes (Membro)
Prof. (a) Dr. (a) José Pereira de Moura Neto (Membro)

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. (a) Dr. (a) Cristina Motta Ferreira	Conceito: <u> 4 </u>
Prof. (a) Dr. (a) Gemilson Soares Pontes	Conceito: <u> A </u>
Prof. (a) Dr. (a) José Pereira de Moura Neto	Conceito: <u> # </u>

A Dissertação foi considerada:

Aprovada

Não Aprovada

Manaus, 25 de maio de 2017.

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca e pela aluna:

Prof. (a) Dr. (a) Cristina Motta Ferreira (Presidente) Cristina Motta Ferreira
Prof. (a) Dr. (a) Gemilson Soares Pontes (Membro) Gemilson Soares Pontes
Prof. (a) Dr. (a) José Pereira de Moura Neto (Membro) José Pereira de Moura Neto
Aluno (a) Ellen Albuquerque de Freitas
Ellen Albuquerque de Freitas

DEDICATÓRIA

Dedico a realização deste sonho aos meus pais, Carlos Antonio Viriato de Freitas e Maily Albuquerque de Freitas, meus maiores incentivadores, razão de eu acreditar em mim mesma e a força que me sustenta nos momentos mais difíceis, minha irmã, Emily Albuquerque de Freitas, e à minha avó, Edithe Viriato de Freitas que, apesar de não saber ler ou escrever, tinha uma sabedoria sem fim. E faz uma falta enorme na nossa família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade de realizar o sonho, que era esta pós-graduação *Strictu sensu*, por escutar minhas orações e me proporcionar uma orientadora que de fato me guiou durante o processo da elaboração e desenvolvimento da pesquisa, e pela força que me garantiu para concluir esta etapa.

Agradeço também aos meus pais e minha irmã, meus tesouros e maiores orgulhos dessa vida, por todo apoio e por sempre acreditarem em meu potencial. Obrigada por me incentivarem a realizar este mestrado e por compreenderem meus períodos de ausência e mau-humor, por estarem ao meu lado nestas e em todas as outras conquistas da minha vida. Obrigada por serem a melhor família para mim!

À minha orientadora, por ter aceitado o desafio de me orientar, mesmo com tantos motivos para não o ter feito. Por ter me ensinado o passo a passo da microbiologia e apostado em mim para desenvolver essa pesquisa. Por ter me permitido ver que, com disposição e estudo, podemos ir longe. Por ter sido uma mãe na pesquisa científica. E ao meu co-orientador, por também ter sido fonte de apoio e conhecimento científico nos momentos em que mais precisei.

Ao Thiago Barbosa, por ter sido um grande companheiro, principalmente no início desse processo, quando eu não entendia nada. Por ter me ajudado, junto com a Dra. Cristina, a crescer e entender melhor as etapas desse processo. À Lucyane Mendes, Dayane Andrade, Andreza Pascoal, pela alegria e companheirismo que me mostraram em nossa convivência.

Aos amigos que estiveram ao meu lado nos momentos em que mais precisei: Cleber Oliveira Junior, Andressa Rodrigues Ribeiro, Lorena Barros da Silveira, Alyssandra Aiumy Mallmann, Lívia Cristina Lucena, Sarah Carvalho, André Ribeiro, Paula Freitas, Salabá Belém, Ana Elis Guimarães e Julia Mônica Benevides, além do meu namorado, Ricardo Bacuri, pelo imensurável apoio na fase final dessa trajetória.

Ao Laboratório de Genômica, Fundação Hemoam, Fundação Alfredo da Matta, Fiocruz pelo apoio com estrutura física. Ao Dr. Felipe Naveca pelo suporte no sequenciamento e análise dos dados. À Dra. Cíntia Mara de Oliveira, pelo auxílio na análise da árvore filogenética. Aos membros da equipe do Laboratório de Genômica que sempre nos deram suporte. À Universidade do Estado do Amazonas por ter me auxiliado na minha formação desde a graduação. Tem sido 8 anos e meio de muitas conquistas e muito orgulho em fazer parte desta instituição.

EPÍGRAFE

*“Eu me importo pelo fato de você ser você,
Me importo até o último momento de sua vida
E faremos tudo que estiver ao nosso alcance
Não somente para ajudá-lo a morrer em paz
Mas também para você viver até o dia de sua morte.”*
(Dame Cicely Saunders)

RESUMO

Chryseobacterium indologenes é uma bactéria ubíqua que tem sido frequentemente relacionada a vários tipos de infecções, apresentando perfil multirresistente, independente da amostra clínica da qual é isolada, diminuindo as opções terapêuticas. Este estudo teve por objetivo caracterizar molecularmente os genes de resistência das β -lactamases em isolados de *Chryseobacterium indologenes*. Tratou-se de um estudo descritivo, no qual foram estudadas duas espécies multirresistentes de *Chryseobacterium indologenes*, provenientes da hemocultura de duas pacientes internadas, do sexo feminino, com idade superior a 60 anos. Foram extraídos o DNA cromossomal e plasmidial e realizadas reações da polimerase em cadeia (PCR) para detecção dos genes de resistência das ESBLs (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{AmpC}, *bla*_{CTX-M} grupos 1, 2, 8 e 9), carbapenemases (*bla*_{GES}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMI}, *bla*_{OXA} e *bla*_{OXA-48} like) e metalo- β -lactamases, (*bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{IND-like} e *bla*_{IND-2}). Os produtos da PCR foram sequenciados e posteriormente analisados no programa de software *Geneious*. Foi detectado o gene *bla*_{IND-like}, com similaridade aos alelos IND-3 e 8. Em relação ao alelo IND-3, o mesmo apresentou mutação na posição 119 (ALA→SER). A árvore filogenética evidenciou que o isolado BGN 23 apresentou 100% de similaridade em relação ao ancestral comum e 12% de diferença de similaridade em relação ao grupo descendente mais próximo, enquanto que o isolado P 133 apresentou apenas 9% de diferença em relação ao seu grupo descendente mais próximo. Já em relação ao ancestral comum, o isolado P 133 encontra-se bastante distante, indicando possivelmente que o mesmo apresenta mais diferenças genéticas em relação ao mesmo. Este estudo detectou uma mutação, na posição 119, do alelo IND-3, ainda não descrita na literatura, o que pode significar possíveis mudanças no perfil de suscetibilidade da bactéria. O alelo IND-8 apresentou 100% de similaridade com os já descritos e inseridos no banco de dados público Genbank. Em relação a filogenia, pode-se observar que o *C. indologenes* apresenta-se como uma nova linhagem inserida junto a linhagem com perfil asiático e europeu, apresentando características genéticas em relação a seu ancestral comum. Estudos moleculares sobre mecanismos de resistência bacterianos de espécies multirresistentes devem ser continuados, pois auxiliarão em pesquisas futuras para o descobrimento de novas drogas, novos mecanismos de resistência genéticos e/ou intrínsecos, ou até mesmo a identificação de novos alvos moleculares bacterianos, a fim de que se possa restaurar a utilidade da antibioticoterapia ou introduzir uma nova antibioticoterapia necessária para tratar as doenças infecciosas ocasionadas pelos mesmos e evitar a disseminação de clones patogênicos.

Palavras-chave: ESBL; carbapenemases; *Chryseobacterium indologenes*: multirresistência, mutação.

ABSTRACT

Chryseobacterium indologenes is a ubiquitous bacterium related to several types of infections, presenting a multiresistant profile, independent of the isolate clinical sample, reducing the therapeutic options. The aim of this study was to characterize molecularly the resistance genes of β -lactamases in isolates of *Chryseobacterium indologenes*. This was a descriptive study, in which two multiresistant species of *Chryseobacterium indologenes* were studied, from the blood culture of two female hospitalized patients, aged over 60 years. Chromosomal and plasmid DNA were extracted and polymerase chain reactions (PCR) were performed to detect ESBL resistance genes (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{AmpC}, *bla*_{CTX-M} groups 1, 2, 8 and 9), carbapenemases (*bla*_{GES}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMI}, *bla*_{OXA} and *bla*_{OXA-48} like) and metallo- β -lactamases, (*bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{IND-like} and *bla*_{IND-2}). The PCR products were sequenced and later analyzed in the Geneious software program. The *bla*_{IND-like} gene was detected with similarity to the IND-3 and 8 alleles. In relation to the IND-3 allele, it had a mutation at position 119 (ALA \rightarrow SER). The phylogenetic tree showed that the BGN 23 isolate presented 100% similarity in relation to the common ancestor and 12% similarity difference in relation to the nearest descendant group, whereas the isolate P133 presented only a 9% difference in relation to its group. As for the common ancestor, the isolate P133 is quite distant, possibly indicating that it has more genetic differences in relation to it. This study detected a mutation at position 119 of the IND-3 allele, not yet described in the literature, which may mean possible changes in the susceptibility profile of the bacterium. The IND-8 allele showed 100% similarity to those already described and inserted in the public Genbank database. In relation to phylogeny, it can be observed that *C. indologenes* presents as a new lineage inserted along the lineage with Asian and European profile, presenting genetic characteristics in relation to its common ancestor. Molecular studies on bacterial resistance mechanisms of multiresistant species should be continued, as they will aid in future research for the discovery of new drugs, new genetic and/or intrinsic resistance mechanisms, or even the identification of new bacterial molecular targets, in order that the usefulness of the antibiotic therapy can be restored or the introduction of a new antibiotic therapy necessary to treat the infectious diseases caused by them and to avoid the spread of pathogenic clones.

Palavras-chave: ESBL; carbapenemases; *Chryseobacterium indologenes*; multiresistance, mutation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil de sensibilidade e resistência dos 02 isolados de *C. indologenes*, obtidos através do Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana.

Tabela 2. Matriz de distâncias do gene IND. Isolado 01 e isolado 02 frente às sequências de referência dos demais genes IND.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas.

Figura 2. Biofilme bacteriano aumentado 12.000x.

Figura 3. Mecanismo químico de ação dos β -lactâmicos.

Figura 4. Fluxograma de procedimentos da pesquisa.

Figura 5. Gel de agarose a 1,5% com ausência de ampliações do gene *bla*_{OXA}.

Figura 6. Gel de agarose a 1,5% com ausência de ampliações do gene *bla*_{CTX-M-grupo-1}.

Figura 7. Gel de agarose a 1,5% com ampliações do gene *bla*_{IND-like}.

Figura 8. Análise comparativa do isolado 2 **IND-8** com a sequência de referência GU186044 e outras.

Figura 9. Análise comparativa do isolado 1 **IND-3** com a sequência de referência AF219131 e outras.

Figura 10. Análise da árvore filogenética dos isolados de *C. indologenes* em relação às sequências das enzimas tipo IND obtidas no banco de dados do GenBank.
Imagem: William Antunes Ferreira

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Características dos processos infecciosos causados por *C. indologenes* entre 2017 a 2013.

Quadro 2. Características dos processos infecciosos causados por *C. indologenes* entre 2012 a 1996.

Quadro 3. Principais classes de antibióticos utilizados na rotina clínica e mecanismos de ação antibiótica.

Quadro 4. Classificação dos antimicrobianos β -lactâmicos de acordo com as classes e subclasses.

Quadro 5. Classificação das β -lactamases de espectro estendido de acordo com Bush, Jacoby e Medeiros e classificação molecular de Ambler.

Quadro 6. Classificação das enzimas SHV de acordo com as características moleculares e funcionais.

Quadro 7. Classificação das carbapenemases.

Quadro 8. Perfil de sensibilidade e resistência de diferentes isolados de *C. indologenes*.

Quadro 9. Iniciadores a serem utilizados para as reações de polimerase em cadeia das β -lactamases de espectro estendido.

Quadro 10. Mix e ciclagens para as reações de polimerase em cadeia dos genes de interesse.

LISTA DE ABREVIATURAS

AVE – Acidente Vascular Encefálico

B – Branco

bla – β -*lactamase*

bp – Pares de base

C (-) – Controle negativo

C (+) – Controle positivo

CLP – Cateter de Longa Permanência

CLSI – *Clinical and Laboratory Standard Institute*

CPC – Cultura de ponta de cateter

DM – Diabetes mellitus

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

ESBL – β -*lactamase* de espectro estendido

EDTA - Ácido etilenodiamino tetracético

EUA – Estados Unidos da América

FC – Fibrose cística

FIOCRUZ Amazônia – Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane

FHEMOAM – Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

I1^{DNAc} – Isolado 1 DNA cromossômico

I1^{DNAp} – Isolado 1 DNA plasmidial

I2^{DNAc} – Isolado 2 DNA cromossômico

I2^{DNAp} – Isolado 2 DNA plasmidial

ICS – Infecção da Corrente Sanguínea

IRC – Insuficiência Renal Crônica

ITU – Infecção do Trato Urinário

KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LB – Lavado Broncoalveolar

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LMA - Leucemia Mieloide Aguda

LMC - Leucemia Mieloide Crônica

LNH – Linfoma Não-Hodgkin

LPS – Lipopolissacarídeo
MβL – Metalo-β-lactamase
ME – Membrana externa
MIC – Concentração inibitória mínima
NDM – New-Delhi metalo-β-lactamase
PAV – Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica
PBP – Proteína ligadora de penicilina
PCR – Reação da polimerase em cadeia
PEG - Polietilenoglicol
PNM – Pneumonia
PTI - Púrpura trombocitopênica idiopática;
RNA – Ácido ribonucleico
SCOPE – Vigilância de Controle de Patógenos de Importância Epidemiológica
SNC – Sistema Nervoso Central
TMO – Transplante de Medula Óssea
TSCU – Transplante de células-tronco do cordão umbilical
TSA – Teste de suscetibilidade antimicrobiana
Zn⁺ - Zinco

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
REFERENCIAL TEÓRICO	15
1. PAREDE CELULAR DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS	15
2. CARACTERÍSTICAS DA BACTÉRIA ESTUDADA	16
3. FATORES DE VIRULÊNCIA BACTERIANOS	20
3.1 BIOFILME	20
4. ANTIBIÓTICOS	22
4.1 ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS	22
5. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA	26
5.1 INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA (β -LACTAMASES)	26
5.1.1. Classificação das β -Lactamases	27
5.1.2 β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBL)	28
5.1.3 Epidemiologia das ESBLs	34
5.1.4 Importância clínica das ESBLs	36
5.2 PLASMÍDEOS	37
5.3 RESISTÊNCIA DO <i>C. INDOLOGENES</i> AOS ANTIMICROBIANOS	38
6. DOENÇAS INFECCIOSAS BACTERIANAS E SAÚDE	39
7. OBJETIVOS	42
7.1 GERAL	42
11.2 ESPECÍFICOS	42
8. MATERIAIS E MÉTODOS	43
8.1 DELINEAMENTO	43
8.1.2 Identificação	43
8.2 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO	43
8.3 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR) DOS GENES ESBLs	44
8.4 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	47
8.5 CEPA DE CONTROLE DE QUALIDADE	47
8.6 ANÁLISE DAS SEQUENCIAS	47
9. RESULTADOS	48
9.1 TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA (TSA)	48
9.2 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)	49
9.2.1 Detecção do gene bla _{IND-like}	50
10. DISCUSSÃO	55

CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS	71

INTRODUÇÃO

Pertencente à família *Flavobacteriaceae*, o gênero *Chryseobacterium* congrega, entre outras, as espécies *Chryseobacterium meningosepticum* (*C. meningosepticum*), *Chryseobacterium gleum* (*C. gleum*), *Chryseobacterium odoratum* (*C. odoratum*), *Chryseobacterium multivorum* (*C. multivorum*), *Chryseobacterium breve* (*C. breve*) e *C. indologenes* (*C. indologenes*). Composto por bacilos gram-negativos imóveis, não-fermentadores, oxidase positivo, catalase positivo e indol positivo, formadores de colônias cuja pigmentação pode variar entre amarelo brilhante e laranja, sua espécie mais patogênica é *C. meningosepticum*, porém, a mais isolada de amostras clínicas é a espécie *C. indologenes* (JOOSTE e HUGO, 1999; KIRBY et al., 2004; BHUYAR et al., 2012).

Descrita pela primeira vez por Yabuuchi e col. em 1983, sob sua prévia denominação (*Flavobacterium indologenes*), a espécie *C. indologenes* foi relacionada a infecções causadas em humanos pela primeira vez por Hsueh e col. (1996), que relataram 12 casos de bacteremia em humanos acometidos por patologias variadas, em Taiwan. Os isolados estudados por Hsueh apresentaram resistência a diferentes classes de antimicrobianos, como os β -lactâmicos, monobactâmicos, carbapenêmicos, macrolídeos e glicopeptídeos.

Os beta-lactâmicos são uma classe de antibióticos compostos por um anel β -lactâmico, e sua ação se dá através da inibição da enzima transpeptidase, que atua na formação regular da parede celular bacteriana. Como mecanismo de defesa aos antibióticos, algumas bactérias produzem enzimas, chamadas β -lactamases, que tem a capacidade de hidrolisar o anel β -lactâmico (GUIMARÃES, MUMESSO e PUPO, 2010).

As β -lactamases podem ser diferenciadas em β -lactamases clássicas e β -lactamases de espectro estendido (ESBL), sendo as últimas relacionadas à resistência antimicrobiana a várias classes de antibióticos, como β -lactâmicos e monobactâmicos. Sua transferência entre as bactérias ocorre principalmente através de plasmídeos, elementos genéticos móveis que podem se disseminar entre espécies bacterianas. Isso as torna uma preocupação no contexto da saúde pública global, devido ao potencial de ocasionarem surtos de bactérias multirresistentes (CARASSO et al. 2016; MILLION-WEAVER e CAMPS, 2014).

As enzimas β -lactamases podem ter origem cromossômica ou plasmidial, e são classificadas em classes de acordo com sua estrutura primária, características funcionais e bioquímicas. Existem relatos na literatura que abordam a relação entre a produção de β -lactamases com zinco em seu sítio ativo e serina em seu sítio ativo por algumas espécies de *C. indologenes* e a resistência aos β -lactâmicos (BELLAIS et al., 2000; MATSUMOTO et al., 2012; LIAKOPOULOS, MEVIUS e CECCARELLI, 2016).

REFERENCIAL TEÓRICO

1. PAREDE CELULAR DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

A parede celular das bactérias Gram-negativas é constituída por uma membrana externa (ME) e uma camada fina de peptidoglicano, localizando-se entre elas um espaço aquoso, denominado espaço periplasmático (MAY e SILHAVY, 2016).

A ME da parede celular bacteriana atua como uma barreira protetora a ambientes ou substâncias tóxicas, como antimicrobianos, absorção de nutrientes e eliminação de resíduos tóxicos. Composta em sua porção mais externa por lipopolissacarídeos (LPS), essa camada é formada pelo antígeno O, que age no auxílio da evasão bacteriana do sistema imunológico e sobrevivência bacteriana dentro das células hospedeiras, e lipídeo A, atuando como a endotoxina das bactérias Gram-negativas. A porção interna da ME é constituída por fosfolipídios, e através destas estruturas complexas a ME realiza suas funções, além de ser a estrutura sobre a qual as bactérias interagem com o organismo do hospedeiro ou meio ambiente. A ME também possui porinas, canais aquosos transmembrana que auxiliam na permeabilidade celular e passagem de antimicrobianos para o interior da célula (MAY et al., 2015; MALDONADO, SÁ-CORREIA e VALVANO, 2016; MAY e SILHAVY, 2016; ZHOU e ZHAO, 2016; LEE, 2017).

O espaço periplasmático, por sua vez, possui enzimas como as β -lactamases, além de transportadores e proteínas reguladoras. O peptidoglicano que também pertence à parede celular das bactérias Gram-negativas, é uma camada formada por dois tipos de polissacarídeos, o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina, fina, porém rígida, que mantém a forma da célula e atua no transporte e geração de gradientes eletroquímicos (LIVERMORE, 1995; FLORES-KIM e DARWIN, 2014; JACQUIER, 2015; LYU e ZHAO, 2015).

As proteínas transmembrana são proteínas não-porinas que abrangem a membrana externa e, de acordo com Fairman e col. (2011), podem funcionar como porinas, transportadores, enzimas e receptores (STRANDBERG e ULRICH, 2015).

A estrutura da parede celular das bactérias Gram-negativas pode ser observada na Figura 1.

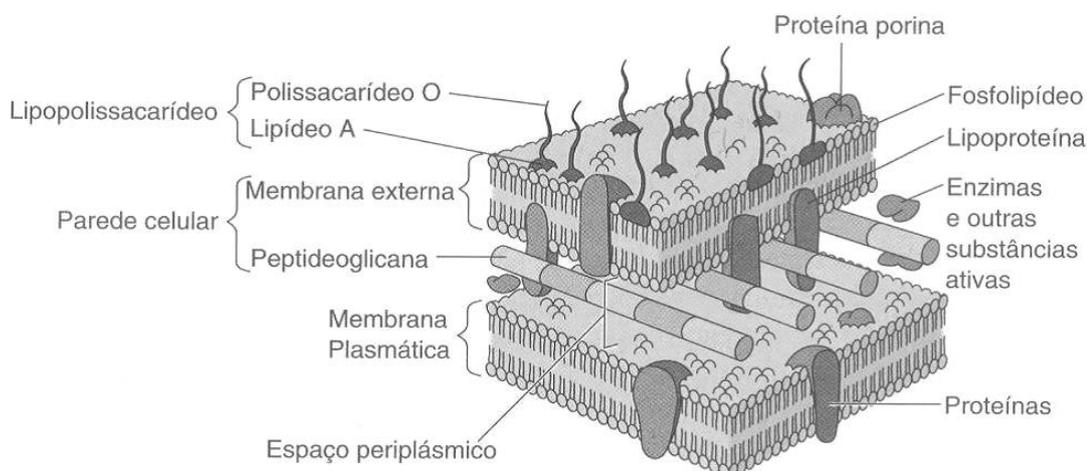


Figura 1. Estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas (Fonte: KOSTECKI, 2013).

2. CARACTERÍSTICAS DA BACTÉRIA ESTUDADA

Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Chryseobacterium*, destacam-se como causa de processos infecciosos em humanos *C. meningosepticum*, *C. multivorum*, *C. breve*, *Chryseobacterium gleum* (*C. gleum*), *Chryseobacterium odoratum* (*C. odoratum*) e *C. indologenes* (*C. indologenes*) (OZCAN et al., 2013).

Descrita na literatura pela primeira vez como membro do gênero *Chryseobacterium* por Vandamme e col. (1994), *C. indologenes* é um bacilo aeróbico, não móvel, catalase, oxidase, e indol positivo, não fermentador, que sobrevive à cloração dos sistemas de água. Em relação ao aspecto morfológico das colônias, as mesmas apresentam-se como colônias circulares, convexas e de pigmento amarelo brilhante a laranja. Apesar do *C. indologenes* ser raramente isolado de amostras biológicas oriundas de processos infecciosos em humanos, a primeira identificação dessa bactéria, proveniente de processo infeccioso em humanos, ocorreu em 1993, proveniente de aspirado traqueal de um paciente com pneumonia associada à ventilação mecânica. O processo de patogenicidade da *C. indologenes* ainda não foi plenamente esclarecido, mas sabe-se que a formação de biofilme e produção de proteases são fatores de virulência importantes (DOUVOYIANNIS et al., 2010; CALDERÓN et al., 2011; BHUYAR et al., 2012; AFSHAR, NOBAKHT e LEW, 2013; MUTCALI et al., 2013; SEEMA et al., 2013; OMAR et al., 2014; CHANG et al., 2015).

O *C. indologenes* pode ser encontrado em vários ambientes, especialmente solo, água e plantas. No âmbito hospitalar, foram isolados de pias, bancadas, e dispositivos médicos que utilizam água, tais como umidificadores, tubos de aspiração,

ventiladores, sistemas de água e superfícies úmidas (AFSHAR, NOBAKHT e LEW, 2013; SEEMA et al., 2013; OMAR et al., 2014; TEKE et al., 2014).

Existem relatos de infecções relacionadas a *C. indologenes* em cinco continentes do planeta, sendo o continente asiático o país com maior número de casos. Encontram-se relatos e pesquisas realizadas na Índia, Qatar, China, Japão, Arábia Saudita, Turquia e Taiwan, sendo o último o país com maior número de artigos com amostras estudadas, como os de Chen e col. (2012), abordando 117 casos e Hsueh et al. (1997), pesquisando 96 casos. Percebe-se, de acordo com os artigos presentes na literatura, que o continente asiático representa o maior (ASSAD, AL-AYED e QURESHI, 2013; HENDAUS e ZAHRALDIN, 2013; DENG et al., 2015; ATICI et al., 2016; SRINIVASAN et al., 2016; IMATAKI e UEMURA, 2017).

No continente Europeu, foram relatados casos na Espanha, Itália, Portugal, França, Grécia e Bélgica (CHRISTAKIS et al., 2005; NULLENS et al., 2001; REYNAUD et al., 2007; CUNHA et al., 2014; ESPOSITO et al., 2015; PEÑASCO et al., 2016).

No continente africano, pesquisas relacionadas ao *C. indologenes* foram desenvolvidas no Senegal, por Omar e col. (2014), Arábia Saudita por Assad e col. (2013) e Burkina Faso por Zeba e col. (2009). Estudos realizados por Monteen e col. (2013), Carrillo-Esper e col. (2015), e Ferreira, Brandão e Lobo (2012) e Souza e col. (2012), abordaram infecções por *C. indologenes* no continente Americano. Na Oceania, Saleem e col. (2016) e McKew (2014) conduziram estudos relacionados a bactéria de interesse.

Apresentamos nos quadros 1 e 2 características dos processos infecciosos causados por *C. indologenes* de acordo com algumas publicações encontradas na literatura.

Ano	Autores	País	Casos	Idade	Amostra	Origem	Infecção	Doença Associada
2017	Imataki e Uemura	Japão	1	64 anos	Aspirado traqueal	Hospitalar	PNM	TMO
2016	Baruah et al.	Índia	1	22 anos	Hemocultura	Comunidade	Bacteremia	Ausente
2016	Peñasco et al.	Espanha	1	63 anos	LB	Hospitalar	PAV	PCR por asfixia alimentar
2016	Srinivasan et al.	Índia	1	11 anos	Abcesso	Comunidade	Tecidos moles	Ausente
2016	Ayak et al.	Turquia	6	3 meses a 8 anos	Hemocultura; CPC; Escarro	Hospitalar (5) Comunidade (1)	Bacteremia; ICS causada por CLP; PNM; Meningite	Doenças congênitas; FC; Síndrome nefrótica; PTI
2016	Atici et al.	Turquia	1	3 meses	Aspirado traqueal	Hospitalar	PAV	Meningomielocele e hérnia diafragmática congênita
2015	Esposito et al.	Itália	1	51 anos	Hemocultura	Comunidade	Bacteremia transitória	Ausente
2015	Carrillo-Esper et al.	México	1	59 anos	Hemocultura	Hospitalar	ICS	LHN (TMO)
2014	Teke et al.	Turquia	1	3 meses	Hemocultura	Hospitalar	Sepse	Cardiopatia congênita
2014	Shahul et al.	Índia	1	42 anos	Escarro	Hospitalar	PNM	LNH
2014	Omar et al.	Senegal	1	42 anos	Urina	Hospitalar	Sepse	LMC
2014	McKew	Austrália	1	53 anos	Urina/Hemocultura	Comunidade	Sepse	Ausente
2014	Feizyoglu et al	Turquia	1	8 anos	Aspirado traqueal	Comunidade	PNM	Envenenamento
2014	Cunha et al.	Portugal	1	60 anos	Urina/Hemocultura	Comunidade	ICS; ITU	Ausente
2014	Olbrich et al.	Espanha	1	11 meses	LCR	Comunidade	SNC	Ausente
2013	Kodama et al.	Japão	1	3 anos	Cateter	Hospitalar	Bacteremia (CLP)	LMA (TSCU)
2013	Deepa et al.	Índia	1	45 anos	Líquido ascético	Comunidade	Peritonite	Doença hepática
2013	Monteen et al.	EUA	1	66 anos	LB	Hospitalar	PAV	Politrauma
2013	Ozcan et al.	Turquia	1	6 meses	LCR	Hospitalar	Meningite (infecção por cateter ventrículo peritoneal)	Hidrocefalia congênita
2013	Hendaus Zahraldin ^e	Qatar	1	8 dias	LCR	Materna	Meningite	Ausente
2013	Assad, Al-Ayed e Qureshi	Arábia Saudita	12	64 anos (média)	Urina; Escarro; Pus; Fluidos corporais	Hospitalar	Trato Respiratório; Tecidos moles; ITU	DM; IRC; DPOC; Malignidades
2013	Yasmin et al.	EUA	1	32 anos	Aspirado traqueal	Hospitalar	PAV	Neoplasia de mama

Quadro 1. Características dos processos infecciosos causados por *C. Indologenes* entre 2017 a 2013. Legenda: CLP: Cateter de Longa Permanência; CPC: Cultura de ponta de cateter; DPOC: Doença Pulmonar obstrutiva Crônica; EUA: Estados Unidos da América; FC: Fibrose cística; ICS: Infecção da Corrente Sanguínea; IRC: Insuficiência Renal Crônica; ITU: Infecção do Trato Urinário; LB: Lavado Broncoalveolar LCR: Líquido Cefalorraquidiano; LNH: Linfoma Não-Hodgkin; LMA: Leucemia Mieloide Aguda; LMC: Leucemia Mieloide Crônica; PAV: Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica; PNM: Pneumonia; PTI: Púrpura trombocitopênica idiopática; SNC: Sistema Nervoso Central; TMO: Transplante de Medula Óssea; TSCU: Transplante de células-tronco do cordão umbilical.

Ano	Autores	País	Casos	Idade	Amostra	Origem	Infecção	Doença Associada
2012	Bhuyar et al.	Índia	1	19 anos	Urina	Hospitalar	ITU	Pielolitotomia
2012	Souza et al.	Brasil	1	60 anos	Hemocultura; CPC	Hospitalar	Bacteremia (CLP)	DM; IRC
2012	Chen et al.	Taiwan	151	74,4 anos a 78,8 anos (média)	Escarro, hemocultura	Hospitalar	Bacteremia; PNM	DPOC/Doença cardiovascular hipertensiva; PAV; DM
2011	Wang et al.	Taiwan	1	68 anos	Líquido ascítico	Hospitalar	Peritonite	Neoplasia maligna da mama; Ascite
2011	Chou et al.	Taiwan	10	71,1 anos (média)	Hemocultura; líquido pleural	Hospitalar	Sepse	Neoplasias malignas, cirrose, PNM, Peritonite; DM
2011	Calderón et al.	Espanha	1	27	Aspirado traqueal; LB	Hospitalar	PAV	Doença cardíaca congênita
2010	Lin et al.	Taiwan	16	66 anos (média)	Hemocultura; Urina; CPC	Hospitalar	Bacteremia; ITU; Peritonite; Bacteremia (CLP);	Neoplasias malignas; DM; HAS
2010	Ferreira, Brandão e Lobo	Brasil	1	30 anos	Aspirado traqueal	Hospitalar	PAV	Aplasia de medula idiopática; Neutropenia febril
2010	Douvoyiannis et al.	EUA	1	33	Hemocultura	Comunidade	Bacteremia	Ausente
2007	Bayraktar et al.	Turquia	1	5 meses	Hemocultura	Hospitalar	ICS	Síndrome de Down
2006	Akay, Gunduz e Gulbas	Turquia	1	52 anos	CPC; Hemocultura	Hospitalar	Bacteremia (CLP)	Síndrome Mielodisplásica; TMO
2005	Cascio et al.	Itália	1	2 anos	Hemocultura	Hospitalar	Bacteremia	DM
2005	Christakis et al.	Grécia	1	54 anos	Hemocultura	Hospitalar	Bacteremia	Carcinoma nasal metastático
2001	Nulens et al.	Bélgica	1	38 anos	Hemocultura	Hospitalar	Bacteremia (CLP)	Neoplasia de mama
1996	Hsueh et al.	Taiwan	7	48,1 anos (média)	CPC; Hemocultura; Urina; Escarro	Hospitalar	Bacteremia (CLP); PNM; ITU; Ferida	Queimadura; Neoplasia maligna; AVE

Quadro 2. Características dos processos infecciosos causados por *C. Indologenes* entre 2012 a 1996. Legenda: AVE: Acidente Vascular Encefálico; CLP: Cateter de Longa Permanência; CPC: Cultura de ponta de cateter; DPOC: Doença Pulmonar obstrutiva Crônica; DM: Diabetes mellitus; EUA: Estados Unidos da América; ICS: Infecção da Corrente Sanguínea; IRC: Insuficiência Renal Crônica; ITU: Infecção do Trato Urinário; LB: Lavado broncoalveolar; PAV: Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica; PNM: Pneumonia; TMO: Transplante de Medula Óssea.

Apesar da espécie *C. meningosepticum* ser a mais patogênica, o *C. indologenes* é, atualmente a flavobactéria mais frequente em espécies clínicas, e está relacionada a vários tipos de infecções, como as intra-abdominais, do sistema biliar e trato urinário, sepse relacionada a cateteres, feridas sépticas, celulite, peritonite, queratite ocular, pneumonia e pneumonias associadas à ventilação mecânica (BELLAIS et al., 1999; CHRISTAKIS et al., 2005; CALDERÓN et al., 2011; MATSUMOTO et al., 2012; AFSHAR, NOBAKHT e LEW, 2013; MULTCALI, 2013; SEEMA et al., 2013).

3. FATORES DE VIRULÊNCIA BACTERIANOS

Os mecanismos utilizados pelas bactérias para invadir no organismo hospedeiro e evitar os mecanismos de destruição do mesmo, como a fagocitose, e penetrar em células para proliferar-se são diversos. Podemos citar como fatores de virulência bacterianos: moléculas de superfície que auxiliam na adesão ou aderência do microrganismo ao hospedeiro, formação de biofilme, proteína M, agressinas, cápsula, enzimas, sideróforos plasmídeos e toxinas bacterianas (BECEIRO, TOMÁS e BOU, 2013).

3.1 BIOFILME

Na natureza dificilmente os microrganismos vivem isoladamente, mas agrupados em comunidades descritas como biofilmes. A interação entre as bactérias no biofilme as torna um grupo com atividades coordenadas, e essa interação tem impacto na formação espacial e temporal do biofilme. Ele é constituído por uma matriz denominada limo, composta principalmente de polissacarídeos, mas que contém também DNA e proteínas produzidas pelas próprias bactérias. O biofilme assemelha-se a um hidrogel, que é um polímero complexo, possuindo uma quantidade de água correspondente a várias vezes seu peso seco, e podem compor-se por uma ou mais espécies de microrganismos e apresentar-se como espuma que é formada em certos efluentes ou em fluxo de corrente rápida, formando serpentes filamentosas (MACK, MACK e ACKERSON, 1975; CHANG et al., 2015; GIAOURIS et al., 2015; GUILHEN, FORESTIER, BALESTRINO, 2017; HØIBY, 2017).

O início da formação do biofilme se dá com a fixação de uma bactéria livre nadadora, ou planctônica, na superfície. À medida em que o biofilme se desenvolve, há a formação pilares ou canais ao longo da microcolônia bacteriana, possibilitando a distribuição proporcional de nutrientes entre as camadas, e impedindo o acúmulo de

resíduos tóxicos na parte mais profunda do mesmo. Os pilares possibilitam a entrada de nutrientes e saída de resíduos tóxicos através da água, formando um sistema circulatório rudimentar. Eventualmente, microrganismos podem sair do biofilme e agregar-se em outro local, havendo assim a extensão do biofilme (TRENTIN, GIORDANI e MACEDO 2013; SANTIN et al., 2014; GUILHEN, FORESTIER, BALESTRINO, 2017).

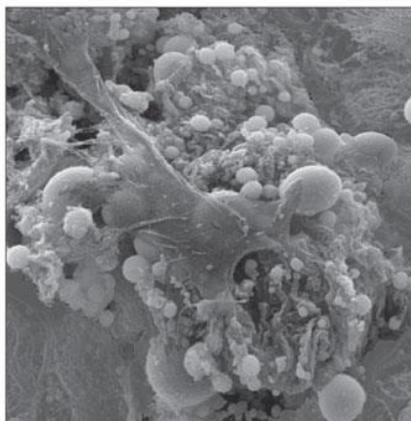


Figura 2. Biofilme bacteriano aumentado 12.000x. Fonte: BEZERRA et al. (2009).

No interior do biofilme, as bactérias são protegidas de exposições ao ambiente, como dissecação, antibióticos, agentes químicos e defesa do sistema imune do hospedeiro, além de, pela proximidade entre os microrganismos, existir a possibilidade de transmissão de informações entre espécies através da conjugação. As células que estão dispostas nas porções mais profundas do biofilme apresentam crescimento lento, sendo menos sensíveis aos agentes antimicrobianos, e possuem a habilidade de produzir agentes neutralizantes que protegem os organismos próximos (SANTIN et al., 2014; SALEEN et al., 2016).

Correlacionando biofilmes com a saúde/doença humana, os biofilmes são importantes, pois as bactérias inseridas nele podem apresentar uma resistência 10 a 1.000 vezes maior a drogas bactericidas. Grande parte das infecções hospitalares estão associadas a biofilmes, correspondentes a cerca de 80%, estando estes presentes em cateteres médicos, próteses, dispositivos de longa permanência, dentre outras. Chang e col. (2015) e Saleem e col. (2016) realizaram experimentos com isolados de *C. indologenes* que comprovaram a capacidade das mesmas de formação de biofilme (TRENTIN, GIORDANI e MACEDO 2013; SANTIN et al., 2014; GUILHEN, FORESTIER, BALESTRINO, 2017).

4. ANTIBIÓTICOS

Antibióticos são medicamentos que podem ter origem natural ou sintética utilizados na terapêutica de processos infecciosos causados por bactérias através de efeitos bactericidas (levando à morte da bactéria) ou bacteriostáticos (interrompendo o crescimento ou divisão celular). Sua classificação em grupos é determinada de acordo com seus mecanismos de ação, como disposto no quadro 3 (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010).

Antibióticos	Alvo	Mecanismo de ação
β -lactâmicos	Enzima transpeptidase; Enzima β -lactamase	Inibição da formação de ligação cruzada entre cadeias de peptidoglicano, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana. Inibição da enzima de resistência bacteriana, que degrada antibióticos β -lactâmicos.
Macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas, cloranfenicol, oxazolidinonas	Subunidade ribossômica 50S	Inibição da síntese proteica bacteriana.
Aminoglicosídeos, tetraciclinas	Subunidade ribossômica 30S	Inibição da síntese proteica bacteriana.
Glicopeptídeos	Dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala do peptidoglicano	Complexação com as cadeias peptídicas não ligadas e bloqueio da transpeptidação, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana.
Peptídeos não ribossomais	Membrana plasmática	Afetam permeabilidade da membrana bacteriana por facilitarem o movimento descontrolado de íons através da membrana.
Lipopeptídeos	Membrana plasmática	Afeta permeabilidade da membrana bacteriana e bloqueia síntese de ácido lipoteicoico, componente da membrana externa de bactérias Gram positivo.
Rifampicina	RNA polimerase dependente de DNA	Inibição da síntese de RNA.
Fluoroquinolonas	Enzima DNA girase	Bloqueio da replicação e reparo do DNA.
Sulfonamidas	Enzima di-hidropteroato sintetase	Bloqueio da formação de cofatores do ácido fólico, importantes para síntese de ácidos nucleicos.

Quadro 3. Principais classes de antibióticos utilizados na rotina clínica e mecanismos de ação antibiótica. Fonte: Adaptado de Guimarães, Momesso e Pupo, 2010.

4.1 ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

Quando a bactéria está em processo de crescimento e reprodução, a parede celular é destruída e reconstituída a todo momento. As hidrolases ou transpeptidases atuam causando a lise, e à medida que a parede se desintegra, novas subunidades de dissacarídeo-peptídeo são formadas e se unem, equilibrando o processo de

destruição e lise e mantendo a parede celular firme para exercer suas funções. Os antibióticos β -lactâmicos fazem uma ligação covalente às proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), que são um tipo de transpeptidase cuja atividade se dá na terceira e última fase da síntese de novas moléculas de peptidoglicano, na ligação de células precursoras e na formação de cadeias polissacarídicas. Com a inibição da síntese das subunidades, a membrana perde o equilíbrio e a quebra continua, o que leva a destruição, falha ou eliminação da parede anterior e lise osmótica bacteriana. Bactérias que apresentam redução nas PBPs tipo 2 apresentam afinidade reduzida às penicilinas (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010; KAHNE; KISHONY, 2012; ZAPUN, MORLOT e TAHA, 2016; BUSH e BRADFORD, 2017).

A composição complexa da parede celular das bactérias Gram-negativas, com camadas de LPS e lipoproteínas, torna essas bactérias mais resistentes aos β -lactâmicos, e seu o processo de lise osmótica relacionado à ação dos mesmos mais demorado, podendo até não ocorrer, quando o antibiótico for administrado por um tempo curto. Cepas de *C. indologenes* apresentam resistência à grande parte dos beta-lactâmicos, mas sensibilidade a algumas cefalosporinas (DOUVOYIANNIS et al., 2010; GUIMARÃES, MOMESSO e PUPPO, 2010).

Os β -lactâmicos são o grupo de antibióticos utilizados com maior frequência na rotina hospitalar, possuindo efeito bactericida, através da sua ação diretamente na parede celular bacteriana (Quadro 4). A ligação do antibiótico ao anel beta-lactâmico da bactéria inibe a ação da enzima transpeptidase, encontrada apenas nas bactérias, que age nas ligações do peptidoglicano mantendo a parede celular bacteriana firme. Com a inibição desta enzima, as etapas finais da formação da parede celular bacteriana são comprometidas, e as deformações na parede da célula levam à destruição da bactéria (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; BUSH e BRADFORD, 2016).

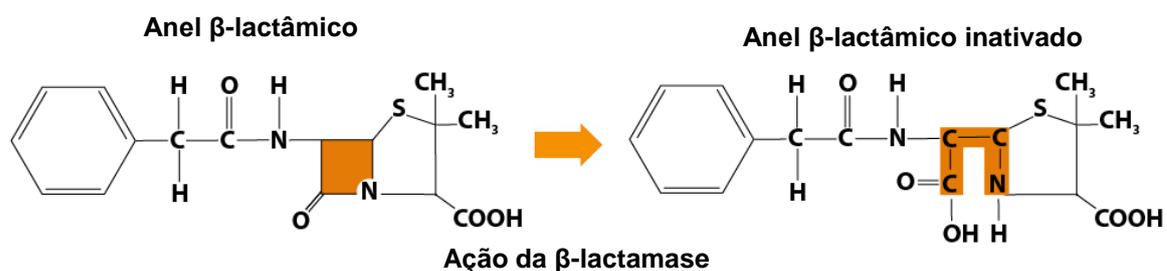


Figura 3 - Mecanismo químico de ação dos β -lactâmicos. Adaptado de Cummings, 2009.

As drogas β -lactâmicas são classificadas de acordo com as diferenças nas cadeias lineares nos anéis beta-lactâmicos e seus núcleos centrais, sendo subdivididos em penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (AZEVEDO, 2014; ARIZA et al., 2015).

A diferenças nas cadeias laterais permitiram o desenvolvimento de diversas classes de antibióticos. Os inibidores de β -lactamases são antimicrobianos formados pela união de um antibiótico e inibidor de β -lactamase, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. O mecanismo de ação desses inibidores envolve um mecanismo no qual as beta-lactamases são inativadas por esses inibidores de forma definitiva, através de reações químicas no sítio ativo das mesmas (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPPO, 2010; DRAWZ e BONOMO, 2010; AZEVEDO, 2014; ARIZA et al., 2015 CLSI, 2015).

Classe antimicrobiana	Subclasse antimicrobiana		Agentes
Penicilinas	Penicilinas penicilinase-lábeis	Penicilinas	Penicilina
		Aminopenicilinas	Amoxicilina, ampicilina
		Ureidopenicilinas	Azlocilina, mezlocilina, piperacilina
		Carboxipenicilinas	Carbenicilina, tigarcilina
	Penicilinas penicilinase-estáveis		Cloxacilina, dicloxacilina, meticilina, nafcilina, oxacilina
	Amidinopenicilinas		Mecilinam
β-lactâmicos/ Combinações de inibidores de β- lactamase	-		Amoxicilina/clavulanato, ampicilina/sulbactam, aztreonam/avibactam, ceftaroline/avibactam, ceftazidime/avibactam, ceftozolane/tazobactam, piperacilina/tazobactam, tigarcilina/clavulanato
Cefens (parenteral)	Cefalosporinas de 1ª geração		Cefazolim, cefalotina, cefapirim, cefradina
	Cefalosporinas de 2ª geração		Cefamandol, cefonicida, cefuroxime
	Cefalosporinas de 3ª geração		Cefoperazone, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona
	Cefalosporinas de 4ª geração		Cefepime
	Cefalosporinas com atividade anti-MRSA		Ceftarolime, ceftobiprole
	Cefamicina		Cefmetazol, cefotetam, cefoxitim
	Oxacefem		Moxalactam
Cefens (oral)	Cefalosporina		Cefaclor, cefadroxil, cefdinir, cefditoren, cefetamet, cefixima, cefpodoxima, cefprozil, ceftibutem, cefuroxime, cefalexina, cefradrina
	Carbacefem		Loracarbef
Monobactams			Aztreonam
Penens	Carbapenem		Biapenem, doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem, razupenem
	Penem		Faropenem, sulopenem

Quadro 4. Classificação dos antimicrobianos β-lactâmicos de acordo com suas classes e subclasses.

Fonte: CLSI (2015).

5. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

Os mecanismos de resistência bacteriana são variados, tendo a biologia molecular auxiliado de forma importantíssima no conhecimento e estudo dos mesmos. Dentre esses mecanismos temos: a) síntese de alvos modificados; b) inativação enzimática; c) diminuição ou perda de porinas; d) bombas de efluxo; e) aquisição bacteriana de elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons ou integrons) (MCMURRY, PETRUCCI JUNIOR e LEVY, 1980; CHOW e SHLAES, 1991; COTRIM; ROCHA; FERREIRA, 2012; ANES et al., 2015).

5.1 INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA (β -LACTAMASES)

Na década de 60, uma cepa de *Bacillus coli*, atualmente denominada *Escherichia coli* (*E. coli*), produziu uma enzima capaz de destruir a capacidade da penicilina de eliminar células bacterianas. Este isolado foi identificado em uma hemocultura de uma paciente na Grécia, chamada Temoniera. Em homenagem a ela, a enzima foi denominada TEM. Este foi o primeiro relato das β -lactamases. No decorrer das décadas, cepas tornaram-se resistentes a várias classes de antibióticos, fenômeno denominado multirresistência, com algumas cepas apresentando resistência a quase todos os agentes antimicrobianos à disposição. Apesar do tempo decorrido desde seu primeiro relato, a inativação enzimática de antimicrobianos se mantém como um dos mais importantes mecanismos de resistência bacteriana (FLEMING, 1929; BRADFORD, 2001; NIKAIDO, 2009; BUSH, 2010; KING; SOBHANIFAR; STRYNADKA, 2016).

As β -lactamases são enzimas que se localizam no espaço periplasmático das bactérias Gram-negativas ou extracelularmente como nas Gram-positivas, raramente ligando-se à membrana citoplasmática (LIVERMORE, 1995). A informação genética para sua síntese está situada ou no plasmídeo ou no cromossomo da bactéria. Mais de 500 β -lactamases já foram identificadas, e elas são classificadas em quatro classes, nomeadas de A à D, conforme sua estrutura primária e características funcionais e bioquímicas. Podem ser ainda divididas em serino- β -lactamases e metalo- β -lactamases (BERTHONCELLI; HÖRNER, 2008; LIAKOPOULOS; MEVIUS; CECCARELLI, 2016).

A β -lactamase age nos antibióticos β -lactâmicos se ligando de forma não-covalente ao anel β -lactâmico. A seguir, a hidroxila livre do lado do sítio ativo do resíduo leva à formação de um grupo acil-éster. A hidrólise terá como resultado água e ácido peniciloico, e liberará a enzima ativa e o antibiótico hidrolisado (SILVA; LINCOPAN, 2012; KING; SOBHANIFAR; STRYNADKA, 2016). A figura 3 apresenta de forma esquemática o mecanismo de hidrólise das β -lactamases.

A complexidade das β -lactamases é relevante por vários fatores, dentre eles o fato de uma mesma bactéria poder expressar diversos tipos de β -lactamases, o que compromete de forma importante a escolha terapêutica (CANDAN; AKSÖZ, 2015; ZHOU et al., 2015; SHAHRAKI-ZAHEDANI et al., 2016).

5.1.1. Classificação das β -Lactamases

Cantón e col. (2012), assim como Bush (2010), afirmaram em seus estudos que as enzimas β -lactamases são os mecanismos de resistência mais relevantes em bacilos Gram-negativos. Os métodos para classificação das β -lactamases são diversos, sendo a mais utilizada a classificação de Ambler e Bush (quadro 3). A classificação dessas enzimas pode envolver grupos funcionais, características hidrolíticas das enzimas, resposta aos inibidores, localização plasmidial ou cromossomal das β -lactamases, e características das proteínas reguladoras, porém, as mais utilizadas são as classificações de Ambler e Bush, descritas no quadro 5 (CANTÓN, GONZÁLEZ-ALBA e GÁLAN, 2012).

Bush-Jacoby-Medeiros	Classe Molecular de Ambler	Substratos	Enzimas	Resistência ou susceptibilidade a inibidores β -lactâmicos
1	C	Cefalosporinas	AmpC	Resistente
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas	TEM, SHV	Suscetível
2be	A	Penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro, monobactâmicos	TEM, SHV	Suscetível
2d	D	Penicilinas, cloxacilina	OXA	Resistente
2e	A	Cefalosporinas	Cefalosporinases induzidas por <i>Proteus vulgaris</i>	Suscetível
2f	A	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenens	NMC-A de <i>Enterobacter cloacae</i>	Resistente
3	B	Maioria dos β -lactâmicos, incluindo carbapenens	L1 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Resistente

Quadro 5. Classificação das β -lactamases de espectro estendido de acordo com Bush, Jacoby e Medeiros e classificação molecular de Ambler. Fonte: Dhillon e Clark (2012).

5.1.2 β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBL)

As ESBL são β -lactamases cuja transferência entre as espécies bacterianas pode ocorrer através de plasmídeo, originadas de mutações que levaram a mudanças na estrutura dos aminoácidos nas β -lactamases clássicas, que culminaram na capacidade dessas enzimas hidrolisarem diversos antimicrobianos, como as oximinocefalosporinas e aztreonam, podendo ser responsáveis pelo fenômeno de multirresistência presentes nas bactérias que as produzem (AL-ZAROUNI et al., 2008; CARASSO et al., 2016; DROPA et al., 2015). As ESBLs receberam esta denominação por apresentarem um ampliado espectro de ação. Atualmente já foram descritas na literatura mais de 200 enzimas do tipo ESBLs (BRADFORD, 2001; PATTERSON; BONOMO, 2005).

5.1.2.1. Enzima TEM

Anteriormente ao surgimento das cefalosporinas de amplo espectro, as penicilinas possuíam uma elevada prevalência entre as enterobactérias. Essas enzimas incluem a variante SHV-1 da *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), TEM-1 e TEM-135 identificadas em diversos isolados das espécies de *N. gonorrhoeae* e *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) (BUSH, 2010; WHILEY et al., 2014). As penicilinas são inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (BUSH, 2010).

O nome TEM é proveniente de Temoniera, paciente da qual essa enzima foi isolada. Esta enzima atua sobre os substratos ampicilina, carbenicilina, oxacilina, cefalotina, cefotaxima, ceftazidima. Existem, atualmente, mais de 200 tipos, geralmente localizadas em plasmídeos. Entretanto, nem todas são ESBLs, sendo a TEM-1, TEM-2 e TEM-13, exemplos de TEM não-ESBL. A enzima TEM-1 é a β -lactamase encontrada com maior frequência em bacilos Gram-negativos, sendo responsável pela resistência aos antibióticos ampicilina e penicilina nas espécies *H. influenzae* e *N. gonorrhoeae*. A primeira enzima do tipo TEM com o fenótipo ESBL foi a TEM-3, relatada em 1988. Foi sugerido que os subtipos provenientes da enzima TEM são decorrentes da pressão seletiva variável ocasionada por diversos β -lactâmicos (SOUGAKOFF, GOUSSARD e COURVALIN, 1988; BRADFORD, 2001; PATTERSON; BONOMO, 2005; EHLERS et al., 2009; RAO, 2013).

Whiley e col. (2014), apontaram que, na espécie *N. gonorrhoeae*, um dos mecanismos de resistência à penicilina ocorre por penicilinases encontradas em plasmídeos. Sete tipos de plasmídeos carreadores de genes codificadores de penicilinases foram descritos até o momento, e os genes *bla*_{TEM-1} e *bla*_{TEM-135} são os genes transportados por esses plasmídeos. Ainda segundo Whiley e col. (2014), a enzima TEM-135 é de particular preocupação, pois é considerada uma enzima intermediária entre as penicilinases e ESBL, o que a torna uma ameaça iminente para a eficácia terapêutica da *N. gonorrhoeae*.

Cerca de 75% dos estudos sobre bactérias produtoras de ESBL identificaram que a espécie *K. pneumoniae* é a principal bactéria produtora de ESBL, fator relacionado à elevação na utilização de antibióticos de amplo espectro, particularmente cefalosporinas de 3ª geração (PATTERSON; BONOMO, 2005; BANERJEE et al., 2016).

5.1.2.2 Enzimas SHV e AmpC

A enzima SHV (sulfidril variável), recebeu essa denominação por se pensar, a princípio, que a inibição da atividade da mesma pelo *p*-cloromercuribenzoato, eram associadas ao substrato e com atividade variando de acordo com o substrato utilizado em testes. Tal suposição não foi confirmada em estudos realizados com essa enzima. As enzimas SHV são provavelmente as ESBLs mais isoladas de amostras clínicas. A SHV-1 tem sua atividade hidrolítica sobre penicilinas e cefalosporinas de primeira geração. Foi identificada no plasmídeo conjugativo p453. Atualmente estão descritas 189 variantes, que ampliaram seu espectro de ação, tornando-se resistentes a cefalosporinas de terceira geração, monobactâmicos e carbapenêmicos (PATERSON; BONOMO, 2005; LIAKOPOULOS, MEVIUS e CECCARELLI, 2016).

A enzima SHV-1 é a mais frequentemente isolada das espécies de *K. pneumoniae*, e o gene *bla*_{SHV-1} está integrado ao cromossomo. Ainda não foi comprovada a existência de genes SHV em transposons e, cerca de 20% da resistência bacteriana ao antibiótico ampicilina, é decorrente da transferência de plasmídeos carreadores do gene *bla*_{SHV-1}. Das enzimas SHV com perfil ESBL, no Brasil, existem relatos dos subtipos SHV-5 e SHV-12 (BRADFORD, 2001; LIAKOPOULOS, MEVIUS e CECCARELLI, 2016).

As enzimas deste grupo são divididas em subgrupos de acordo com suas características moleculares ou funcionais (Quadro 6) (LIAKOPOULOS, MEVIUS e CECCARELLI, 2016).

Grupo	Subgrupo	Característica
I	2b	Hidrólise de penicilinas, cefaloridina, cefalotina; altamente inibida por ácido clavulânico e tazobactam
II	2br	Hidrólise de β -lactâmicos de amplo espectro; Resistência ao ácido clavulânico
III	2be	Hidrólise de uma ou mais oximino- β -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, aztreonam)

Quadro 6. Classificação das enzimas SHV de acordo com características moleculares e funcionais. Fonte: Adaptado de Liakopoulos, Mevius e Ceccarelli (2016).

O primeiro relato de cefalosporinases foi realizado em 1983, com a descrição da enzima SHV-2, divergente da SHV-1 por uma substituição de aminoácido (serina por glicina, no códon 238). Quatro anos depois, em 1987, em Santiago, Chile, foi detectada a primeira cefalosporinase na América Latina, a enzima SHV-5, produzida por uma cepa de *K. pneumoniae*, coletada de uma hemocultura de paciente com peritonite. Após três anos, em 1990, a primeira cefalosporinase não classificada nas famílias TEM ou SHV, CTX-M-1, foi descrita na Alemanha (KNOTHE et al., 1983; GUTMANN et al., 1989; SU et al., 2008; SILVA e LINCOPAN, 2012).

As cefalosporinases atuam no sítio ativo da serina, hidrolisando as cefalosporinas. São β -lactamases que estão associadas à perda de porinas na membrana externa de bactérias Gram-negativas, podem ser divididas em ESBL e AmpC e localizarem-se tanto no cromossomo quanto no plasmídeo na maioria das espécies pertencentes a família *Enterobacteriaceae*. As enzimas AmpCs não são classificadas como ESBL devido a sua resistência aos inibidores de β -lactâmicos. (SU et al., 2008; BUSH, 2010; SILVA e LINCOPAN, 2012; TINELLI et al., 2012).

As AmpCs são organizadas em grupos, de acordo com as características de aminoácidos e sua enzima cromossomal progenitora: grupo *Aeromonas caviae* (enzimas tipo FOX); grupo *Aeromonas* spp. (enzimas tipo MOX e algumas enzimas CMY); grupo *C. freundii* (enzimas tipo BIL, CFE, LAT, e algumas enzimas CMY); grupo *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) (enzimas tipo ACT e MIR); grupo *Hafnia alvei* (*H. alvei*) (enzimas ACC); e grupo *Morganella morganii* (*M. morganii*) (enzimas DHA) (SU et al., 2008).

5.1.2.3 Enzima CTX-M

Esta enzima foi descrita pela primeira vez após ser detectada em uma espécie bacteriana denominada *Kluyvera ascorbata* (*K. ascorbata*). A ação desta enzima sobre o antibiótico substrato cefotaxima, deu origem ao nome CTX (cefotaximase). Atualmente é o tipo de enzima mais prevalente na Europa, China e América do Sul. Estas enzimas atuam contra penicilinas, oximino-cefalosporinas e monobactâmicos, e dividem-se em 5 subgrupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (OHNISHI et al., 2013; AFZALI et al., 2015; SHAHRAKI-ZAHEDANI, 2016; HAN et al., 2016).

Localizadas no plasmídeo e frequentemente isoladas de *Salmonella enterica* (*S. enterica*) e *E. coli*, também podem ser encontradas em outras espécies de enterobactérias, como *K. pneumoniae*. Estudos mostram que a capacidade de disseminação através de integrons e transposons, representam fator importante na propagação das mesmas. Pesquisas mostram que as enzimas CTX-M possuem uma afinidade de hidrólise maior pelo antibiótico cefotaxima do que a ceftazidima. Porém, já foi descrito que alguns tipos, como CTX-M-15, também hidrolisa ceftazidima. Foi sugerido que a serina, localizada na posição 237 das enzimas CTX-M, possui um papel relevante nas ESBL (BRADFORD, 2001; MULVEY et al., 2004; PATERSON; BONOMO, 2005; AHMED et al., 2013; AFZALI et al., 2015; DROPA et al., 2015).

A enzimas deste grupo são consideradas endêmicas na América Latina, e constantemente relatadas em estudos realizados no Brasil. Dos grupos identificados, apenas o grupo CTX-M-25 ainda não foi identificado no Brasil. Os subtipos mais comuns no Brasil são CTX-M-15 (grupo 1), CTX-M-2 e CTX-M-59 (grupo 2), CTX-M-8 (grupo 8) e CTX-M-9 (grupo 9). A cepa ST131 de *E. coli*, produtora de CTX-M-15, emergiu recentemente, causando um quadro pandêmico (OHNISHI et al., 2013; DROPA et al., 2015).

5.1.2.4 Enzima OXA

A capacidade de hidrolisar a oxacilina (oxacilinase) originou o nome deste tipo de ESBL. Também hidrolisam benzilpenicilinas, porém, em menor eficiência em relação à hidrólise de oxacilina. Algumas bactérias produtoras de oxacilinases (como a OXA-23-like, OXA-40/24-like, OXA-58-like e OXA-235-like) apresentam atividade

hidrolítica contra as drogas carbapenêmicas, mas não com a mesma eficiência que as metalo- β -lactamases (SILVA e DOMINIGUES, 2016).

As β -lactamases do tipo OXA foram, em grande parte, derivadas da enzima OXA-10, e conferem resistência a cefalotina, além de possuir altos níveis de atividade contra oxacilina e cloxacilina e terem baixos níveis de inibição pelo ácido clavulânico. Foram identificadas, até o momento, cerca de 440 oxacilinases, 232 das quais são carbapenemase. As oxacilinases são encontradas principalmente na espécie *P. aeruginosa*, e sua disseminação pode ser plasmidial ou através de integrons, sendo encontrada também no cromossomo bacteriano (BRADFORD, 2001; PATERSON e BONOMO, 2005; POIREL, NAAS e NORDMANN, 2010; GIRMENIA, SERRAO e CANICHELLA, 2016; SILVA e DOMINGUES, 2016).

Identificada pela primeira vez em Instambul (Turquia), em 2001, a partir de um isolado de *K. pneumoniae*, a enzima OXA-48 é uma β -lactamase pertencente à classe D isolada com maior frequência. Sua atividade contra penicilinas é elevada, mas apresenta baixa hidrólise contra o carbapenêmico imipenem e, mínima atividade contra cefalosporinas de espectro estendido. Sua transmissão entre bactérias pode ocorrer via plasmidial, clonal ou por transposons, sendo esta enzima causa de preocupação, pois há uma dificuldade na sua detecção, associada com a ineficiência terapêutica e altas taxas de disseminação plasmidial. É relacionada com frequência a patógenos como *E. coli* e *K. pneumoniae*. Já foram identificadas 11 variantes de OXA-48 (POIREL, NAAS e NORDMANN, 2010; TEMKIN et al., 2014; GIRMENIA, SERRAO e CANICHELLA, 2016; BAKTHAVATCHALAM, ANANDAN e VEERARAGHAVAN, 2016).

5.1.2.5 Enzimas Carbapenemases

O primeiro relato de carbapenemase ocorreu em 1983, por Yotsuji e col., que descreveram sua produção na espécie *Bacterioides fragilis* (*B. fragilis*). Atualmente, algumas espécies de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, como *K. pneumoniae*, produzem com frequência enzimas do tipo carbapenemase, que podem ter origem cromossomal ou plasmidial, e que conferem a essas bactérias resistência a muitas classes importantes de antibióticos como carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Sua atividade é inibida parcialmente, *in vitro*, pelo ácido clavulânico, tazobactam e ácido borônico.

Devido à resistência das *K. pneumoniae* a maioria das classes mais importantes de antibióticos como os β -lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tem-se como última opção terapêutica o uso das drogas polimixina B, colistina, fosfomicina e tigeciclina (VANEGAS, PARRA e JIMÉNEZ, 2016; LEE et al., 2016).

Os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos pelos isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC, podem ocorrer de diversas maneiras, tais como:

- a) produção de β -lactamases com fraca atividade carbapenemase associadas à perda ou redução de porinas;
- b) produção de β -lactamases que fazem hidrólise de carbapenêmicos sem defeitos adicionais de permeabilidade;
- c) hiperexpressão de bombas de efluxo, como MexAB-OprM, causadas por mutações em proteínas regulatórias transcricionais, que retiram o antibiótico da célula bacteriana (VANEGAS; PARRA; JIMÉNEZ, 2016; CHEN, 2014; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

As carbapenemases também podem se dividir em classes de acordo com a utilização do íon Zinco (Zn^{+}) em seu sítio ativo, em metalo-carbapenemase, ou em serina em seu sítio ativo, como serino-carbapenemase ou como não metalo-carbapenemase (SEKYERE, 2016; PRAGASAM et al., 2016; LEE et al., 2016). Exemplos dessas classes são abordadas no quadro abaixo:

Classe	Exemplos
A (serino-carbapenemase)	NMC, SME, IMI, KPC. SFC e GES. As enzimas de maior importância clínica são KPC e GES
B (metalo-carbapenemase)	IND, IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, NDM. Mundialmente, as enzimas de maior importância clínica pertencem aos grupos IMP, VIM e NDM. No Brasil, pode-se incluir neste grupo também a SPM
C (serino-carbapenemase)	DHA, ACT, CMY, ADC
D (serino-carbapenemase)	OXA

Quadro 7. Classificação das carbapenemases. Fonte: BELLAIS et al., 2000; WU et al., 2016; PRAGASAM et al., 2016; LEE et al., 2016; PAPP-WALLACE et al., 2016).

As carbapenemases são encontradas principalmente em *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, mas também podem ser identificadas em espécies de *A. baumannii*, *E. cloacae* e *Serratia marcescens* (*S. marcescens*). Os principais tipos detectados são a New Delhi metalo- β -lactamase-1 (NDM-1), *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) ou oxacilinase-48 (OXA-48), IMP e VIM (BAKTHAVATCHALAM, ANANDAN e VEERARAGHAVAN, 2016).

5.1.2.5.1 Classe B: Metalo- β -Lactamases (M β LS) tipo IND

A enzima do tipo IND foi descrita pela primeira vez em 1999, por Bellais e col., decorrente de um estudo de isolado de *C. indologenes*, proveniente de uma amostra de escarro humana, na França. A enzima IND-1 apresentou um perfil de hidrólise amplo, englobando penicilinas e imipenem, não antagonizada por ácido clavulânico, mas inibida na presença de EDTA (ácido etilenodiamino tetracético). No ano seguinte, os mesmos autores identificaram 4 variantes desta enzima (IND-2, IND-2a, IND-3 e IND-4). A enzima IND-2 apresentou, em seu perfil fenotípico, resistência ou suscetibilidade reduzida à maioria dos β -lactâmicos testados e carbapenêmicos, excetuando a piperacilina e cefepime. A enzima IND-3 foi encontrada em 4 isolados, com 91% de similaridade com os aminoácidos de IND-1. A IND-4, apresentou sensibilidade a carbapenêmicos, e 71% de semelhança de aminoácidos com a IND-1 (BELLAIS et al., 1999; BELLAIS et al., 2000).

Em 2007, na Itália, Perilli e col. publicaram um estudo identificando um novo alelo da enzima IND, o IND-5, detectada em um isolado de *C. indologenes* coletado de uma amostra de escarro, de um paciente internado em uma unidade de Hematologia. A IND-5 apresentou perfil de hidrólise para amino, carboxi e ureidopenicilinas, cefazolina, cefotaxima e carbapenêmicos. Após dois anos, uma nova variante foi descrita, a IND-6, em pesquisa realizada por Zeba e col. (2009), na qual foi estudada uma cepa de *C. indologenes* responsável por processo infeccioso do trato urinário, em Burquina-Faso. A IND-6 hidrolisou todos os β -lactâmicos e carbapenêmicos testados, porém, sua ação foi inerte em relação ao antibiótico aztreonam. A variante IND-7 foi identificada por Yamaguchi e col., em 2010. Até o término deste estudo, a última variante foi descrita por Wang e col. (2016), a enzima IND-16, após análise de genoma completo de um isolado de *C. indologenes*, possuindo 99% de similaridade com as variantes IND-8 e IND-10.

5.1.3 Epidemiologia das ESBLs

Inicialmente identificadas na Europa Ocidental, as ESBLs se disseminaram para os Estados Unidos e Ásia, hoje sendo encontradas em todos os continentes. A taxa de prevalência varia de acordo com o país e instituição de saúde. Em Portugal, encontra-se prevalências entre 34-38%, na Suécia entre 3-8%, enquanto que na Holanda, ocorre em 1% dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*. Na França, 40% dos

isolados de *K. pneumoniae* demonstraram resistência a ceftazidima, e na Turquia, 58% dos isolados de *Klebsiella* spp. provenientes de amostras de pacientes internados em unidades de terapia intensiva, eram produtores de ESBL. Nos Emirados Árabes, a prevalência detectada foi de 41%, sendo 60% das bactérias isoladas pertencentes à espécie *E. coli* e 36% *K. pneumoniae* (BRADFORD, 2001; PATTERSON; BONOMO, 2005; AL-ZAROUNI et al., 2008). Em relação ao tipo de ESBL, a enzima CTX-M tem papel prevalente, superando os tipos TEM e SHV na Europa (HAN et al., 2016)

No continente asiático, a prevalência de bacilos Gram-negativos produtores de ESBL é variada. Na Mongólia, estudo realizado por Baljin e col. (2016) encontrou uma prevalência entre 42,4% e 69,2%. Pesquisa realizada por Alyamani e col., (2017), Na Arábia Saudita, identificaram frequência do gene CTX-M em 46,7% dos isolados pesquisados, 48,3% do gene OXA, 38,7% do gene TEM e 3,2% do gene SHV. Em países como Japão e Malásia, e na cidade-estado Singapura, os percentuais de produção de ESBL são de 8%. Na Tailândia, Taiwan, Filipinas e Indonésia, entre 12-24% (PATTERSON; BONOMO, 2005). As frequências de cepas produtoras de ESBL, em outros países da Ásia variam de 4,8% (Coréia) a 12% (Hong Kong). Na China, a produção de ESBL por *E. coli* é de 13-15% e 20% nas *K. pneumoniae*, sendo os tipos de ESBL mais comuns CTX-M e SHV (BRADFORD, 2001; DHILLON e CLARK, 2012; HAN et al., 2016).

Buys e col., (2016) identificaram na África do Sul 83% de isolados *K. pneumoniae* produtores de ESBL decorrentes de infecções na corrente sanguínea. Oduro-Mensah e col. (2016), detectaram em Gana uma prevalência de 37.9% de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL. Ndir e col., (2016), realizaram uma pesquisa tipo caso-controle em pacientes pediátricos por 2 anos em Senegal, identificando que, dentre as espécies produtoras de ESBL, as principais eram *Enterobacter* spp. (88%), *Klebsiella* spp (82%) e *E. coli* (58,3%). Na República da Serra Leoa, 70 isolados da família *Enterobacteriaceae*, coletados de amostras de urina de pacientes com suspeita de infecção do trato urinário, foram estudados por Leski e col. (2016). Destes, 64,3% mostraram-se produtores de ESBL.

Nos Estados Unidos, a prevalência de bactérias produtoras de ESBL é de 3%, com os índices institucionais variando de 0% a 25% (BRADFORD, 2001). Dhillon e

Clark (2012), apontam uma redução da prevalência de ESBL no país (1,5% em *E. coli* e 2,4 a 4,4% em *K. pneumoniae*) em 0,5 a 1% de infecções adquiridas no hospital.

Na América Latina, as frequências chegam a 45-51% em isolados de *Klebsiella spp.* enquanto que em *E. coli*, abrangem cerca de 8,5-18%. O subtipo de ESBL isolada com maior frequência é o CTX-M (DHILLON e CLARK, 2012).

Estudos realizados em países da América Latina pelo *SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*, apontam taxas de produção de 12,8% de ESBL em *E. coli* e 49.9% em *K. pneumoniae* (GALES et al., 2012).

No Brasil, no estado do Paraná, estudos realizados por Nogueira e col. (2015), detectaram uma prevalência de 21,3% de enterobactérias produtoras de ESBL, com expressão dos genes SHV, TEM, CTX-M e PER, enquanto que no Rio Grande do Sul, pesquisa conduzida por Rugini e col. (2015), na cidade de Passo Fundo, identificou que das 2.197 amostras pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, 30,3% delas produziam alguma enzima ESBL.

Abreu e col. (2013), em estudo realizado em uma comunidade do município de São Luís, Maranhão, identificaram uma prevalência de cerca de 7,6% de isolados produtores de ESBL, em amostras biológicas oriundas de casos de infecções urinárias. Já na cidade de Manaus, Amazonas, pesquisa realizada por Ferreira e col. (2011), na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM), isolou 44 espécies bacterianas, dentre as quais 17 foram classificadas como Gram-negativas, e destas, 12 foram identificadas como produtoras de ESBL, sendo os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, e *bla*_{OXA}, os mais frequentes.

5.1.4 Importância clínica das ESBLs

A importância clínica das ESBLs está no fato de a maioria das mesmas serem transferidas por plasmídeos. Devido a isto, o gene de resistência, que pode conter também resistência a outras classes de antibióticos, como aminoglicosídeos (estreptomicina, gentamicina, amicacina), pode ser transferido entre as diferentes espécies bacterianas, principalmente as Gram-negativas, mediando assim resistência a múltiplas drogas (BRADFORD, 2001; ALYAMANI et al., 2017).

Bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL estão relacionadas a processos infecciosos graves (intra-abdominais, trato urinário, respiratórios) e falha terapêutica

quando ocorre a utilização de cefalosporinas. A demora no diagnóstico bacteriológico dessas bactérias, pode ocasionar demora no uso da terapia adequada. O período de tempo relacionado entre a identificação do patógeno, da espécie bacteriana produtora de ESBL pelo laboratório clínico, e o início da terapêutica adequada possui forte relação com a elevação da mortalidade, principalmente de pacientes imunossuprimidos com período de internação prolongado (FERREIRA et al., 2011; DHILLON e CLARK 2012; ALYAMANI et al., 2017).

5.2 PLASMÍDEOS

Plasmídeos são fragmentos de DNA capazes de autorreplicação, que possuem genes que auxiliam o organismo em que ele se encontra a adaptar-se e defender-se de estímulos nocivos. Plasmídeos são moléculas extra cromossômicas cuja replicação do DNA independe do cromossoma bacteriano, e podem conter genes de resistência a antibióticos ou genes que elevem a virulência bacteriana. Plasmídeos bacterianos não são fatores de virulência propriamente ditos, porém, a maioria dos genes responsáveis pela virulência bacteriana encontram-se nos plasmídeos. Os plasmídeos podem ser transferidos entre as bactérias por transferência horizontal ou vertical. Plasmídeos contendo genes que codificam os fatores R são considerados importantes para a virulência, pois eles estão envolvidos na resistência bacteriana a antimicrobianos. Plasmídeos de conjugação possuem grande relevância no surgimento de bactérias patogênicas multirresistentes, tanto nos hospitais quanto no meio ambiente (MILLION-WEAVER; CAMPS, 2014; MULVEY; SIMOR, 2009; LETCHUMANAN; CHAN; LEARN-HAN LEE, 2015; POULIN-LAPRADE; CARRARO; BURRUS, 2015).

A replicação plasmidial se dá em um local denominado origem da replicação vegetativa (*oriV*), e os sistemas de replicação dos plasmídeos podem ser de três tipos: replicação do tipo teta, deslocamento vertente e replicação circular, e replicação em deslocamento de cadeia (SHINTANI; SANCHEZ; KIMBARA, 2015).

Os plasmídeos dividem-se em fator R (**resistente**) e fator F (**fertilidade**). Fatores R são aqueles que carregam genes que degradam antibióticos e modificam sistemas de transporte. Apresentam duas propriedades para produzir resistência às drogas como: 1 - replicação independente do cromossoma bacteriano, podendo produzir várias cópias e, 2 - podem ser transferidos para outras células de gênero e

espécie diferentes. A transferência por conjugação está sob o controle do gene do plasmídeo R e ocorre com maior frequência em ambientes hospitalares (SOUSA JUNIOR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004; HUDDLESTON, 2014).

Os plasmídeos podem ainda carrear outros elementos genéticos, como transposons ou integrons, que podem conter sequências genéticas relacionadas à resistência antimicrobiana (MULLANY; ALLAN; ROBERTS, 2015; COLLELLO et al., 2015).

5.3 RESISTÊNCIA DO *C. INDOLOGENES* AOS ANTIMICROBIANOS

Nos últimos vinte (20) anos, diversos trabalhos sobre *C. indologenes* demonstraram diferentes resistências em diferentes situações clínicas. Os principais processos infecciosos relatados abrangem pneumonias, pneumonias relacionadas a ventilação mecânica, bacteremia e infecções relacionadas a cateter de longa permanência, e seu perfil de resistência envolve grande parte dos β -lactâmicos e carbapenêmicos (Quadro 8) (HSUEH et al., 1996; AKAY, GUNDUZ e GULBAS, 2006; FERREIRA, BRANDÃO e LOBO, 2012; MATSUMOTO et al., 2012; GONZÁLEZ-CASTRO et al., 2017).

Antibióticos Autores	Imataki e Uemura (2017)	McKew (2014)	Bhuyar et al. (2013)	Chen et al. (2013)	Wang et al. (2011)	Douvoyiannis et al. (2010)	Zeba et al. (2009)	Akay, Gunduz e Gulbas (2006)
Aztreonam	R		R	R		R		R
Ampicilina/Sulbactam					R	R		
Piperacilina/tazobactam	S		S			S	S	S
Polimixina			R					
Amicacina	S	R	R			R	R	
Gentamicina		R	R		R	R	R	R
Imipenem			R	R		R	R	R
Cefazolina		R			R			
Cefotaxime			R					
Cefoxitina		I					I	
Cefepime		R				S	S	R
Ceftriaxona						R		
Ceftazidime	S	R	R		R		S	
Ciprofloxacina	R	I	R		R	S	S	
Norfloxacina		S	R				S	
Trimetropim		S						
Sulfametoxazol/trimetropina		S		S	S	S	S	
Cefoperazone/Sulbactam				S				

Quadro 8. Perfil de sensibilidade e resistência de diferentes isolados de *C. Indologenes*. Legenda: R: Resistente; I: Sensibilidade reduzida; S: Sensível.

6. DOENÇAS INFECCIOSAS BACTERIANAS E SAÚDE

Bacilos Gram-negativos são importantes agentes de graves infecções, e a terapêutica torna-se um desafio à medida que as bactérias adquirem diferentes mecanismos de resistência aos antibióticos (BEREZIN e SOLÓRZANO, 2014; ANES et al., 2015).

As bactérias Gram-negativas frequentemente apresentam mecanismos de resistência contra as penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas, trimetropim-sulfametoxazol e aminoglicosídeos. Alguns isolados apresentam ainda resistência aos carbapenêmicos, que neste caso, pode limitar consideravelmente as opções terapêuticas (MULVEY; SIMOR, 2009).

Além disso, vale ressaltar que ao longo dos anos as bactérias desenvolveram vários mecanismos de resistência naturais e genéticos, transferidos de forma cromossomal ou plasmidial, sendo este último mais importante devido ao fato de ser facilmente transferido por conjugação, o que facilita a disseminação entre as espécies. Devido ao fato da maioria dos plasmídeos albergarem mais de um fator de resistência, o estímulo de um gene acarretará também na ativação de todos os outros contidos no plasmídeo, conferindo a bactéria o caráter de multirresistência. Pacientes internados acometidos por processos infecciosos ocasionados por esse tipo de patógeno, podem ir a óbito e, além disso, existe também a possibilidade da disseminação desses clones patogênicos multirresistentes, originando assim os surtos de infecção hospitalar com elevada mortalidade (RUPPÉ, WOERTHER e BARBIER, 2015).

As doenças infecciosas bacterianas que acometem pacientes imunossuprimidos, condição frequente em pacientes tratados em hospitais hematológicos, muitas vezes submetidos a tratamentos como quimioterapia, radioterapia e transplante de medula óssea, possuem um alto impacto no processo terapêutico e são causa de sérios agravos à saúde do paciente, podendo levar ao óbito, como casos de infecção relacionado à *C. indologenes* já relatados na literatura (GABE; ALMEIDA; SIQUEIRA, 2009; YABUMOTO, 2009; OMAR et al., 2014; IMATAKI e UEMURA, 2017).

Infecções bacterianas que podem ocorrer na corrente sanguínea são um grave problema de saúde pública mundial, e podem colocar em risco a vida do paciente

quando o agente causador apresenta diversos mecanismos de resistência aos antibióticos (CARASSO et al., 2016). Hsueh e col. (1996) afirmaram em seu estudo que pacientes acometidos por neoplasias malignas, neutropenias ou patologias graves comprometedoras da condição de saúde apresentavam risco aumentado para o desenvolvimento de infecções de corrente sanguíneas causadas por *C. indologenes*.

Estudo realizado por Atici e col. (2016) abordou que fatores de risco que se relacionam ao aumento do risco de infecção relacionados à *C. indologenes* incluem cateteres de longa permanência ou equipamentos invasivos utilizados na assistência de saúde, utilização de antibióticos de espectro estendido e condições de saúde que causem imunossupressão, fatores que podem estar presentes, parcialmente ou em sua totalidade, em pacientes hematológicos, seja devido aos sinais e sintomas da patologia ou consequências da terapêutica hematológica. Gu e col. (2016), identificou como fatores de risco para a mortalidade precoce em pacientes acometidos por bacteremia ocasionada por *A. baumannii*, a neutropenia, neoplasia maligna e doença em estágio avançado, condições estas que também podem ser associadas ao contexto hematológico.

Nos Estados Unidos, a Vigilância e Controle de Patógenos de Importância Epidemiológica (SCOPE), aponta que 49,4% das infecções de corrente sanguínea ocorreram na unidade de terapia intensiva, e que na ocasião, eram a décima causa de óbitos (CARASSO et al., 2016; AHMED et al., 2009).

Nos últimos 30 anos, cerca de 75% das infecções da corrente sanguínea foram ocasionadas por bacilos Gram-negativos, mas na década de 90 as bactérias Gram-positivas reemergiram como os principais patógenos causadores de infecções hospitalares. A morbimortalidade é mais grave quando o agente causador são bactérias multirresistentes, especialmente da família *Enterobacteriaceae*, pois a terapêutica torna-se mais difícil (AHMED et al., 2009).

Maaroufi e col. (2015), em seu artigo sobre identificação de possível resistência ao antibiótico cefepime, utilizado em um hospital hematológico, abordou que a exposição prolongada ao agente infeccioso e administração prévia de β -lactâmicos, são fatores de risco para o desenvolvimento de mecanismos de resistência

bacteriana, identificando a existência de relação entre resistência ao antibiótico (cefepime) e mortalidade precoce.

Bochennek e col. (2016), em um ensaio clínico sobre complicações derivadas de infecções em pacientes acometidos por leucemia mieloide aguda, abordam que o tratamento quimioterápico, utilizado para combater a patologia, contribui para o aparecimento de complicações decorrentes de infecções, especialmente na neutropenia, que compromete o sistema imunológico de forma significativa. Em seu estudo, houve uma média de 3,3 complicações por paciente, e os que evoluíram a óbito, eram portadores de infecções bacterianas ocasionadas por isolados Gram-negativos.

Rubio e col. (2013), realizou uma pesquisa com isolados de um hospital do estado de São Paulo em um período de 10 anos, com total de 53.316 isolados bacterianos, sendo 29.824 (66,1%) destes bacilos Gram-negativos, e 10.732 caracterizados como patógenos multirresistentes. É importante ressaltar que o número de bacilos Gram-negativos foi duas vezes maior que o de cocos Gram-positivos, o que demonstra a importância destes agentes nos processos infecciosos.

7. OBJETIVOS

7.1 GERAL

Caracterizar molecularmente genes de resistência das β -lactamases em isolados de *Chryseobacterium indologenes*.

11.2 ESPECÍFICOS

- Identificar o perfil fenotípico de resistência aos antibióticos;
- Determinar a presença dos genes das β -lactamases de espectro estendido (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} grupos 1, 2, 8 e 9) e das cefalosporinases (*bla*_{AmpC});
- Investigar a presença dos genes das carbapenemases da Classe A de Ambler (*bla*_{GES}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMI}), da classe D (*bla*_{OXA}, *bla*_{OXA-48 like}) e metalo- β -lactamases (*bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{IND-like} e *bla*_{IND-2});
- Identificar molecularmente mutações associadas à resistência nos genes e plasmídeos.
- Caracterizar por análise filogenética as sequências obtidas no estudo em relação às sequências depositadas no GenBank.

8. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 DELINEAMENTO

8.1.1 Tipo de estudo e amostra

Estudo descritivo, realizado com bactérias da espécie *C. indologenes* isoladas de amostra biológica (sangue) de duas pacientes do sexo feminino, com idade superior a 60 anos, provenientes da Maternidade Balbina Mestrinho e posto de coleta da Fundação Sangue Nativo, enviadas ao laboratório de Bacteriologia do HEMOAM, autarquia do governo do estado do Amazonas, para realização de testes de rotina e confirmatórios, armazenadas na bacterioteca do Laboratório de Genômica, no período de 2014 a 2015. Informações acerca de características clínicas das pacientes não foram coletadas devido a impossibilidade de rastreamento das mesmas.

8.1.2 Identificação

Primeiramente, na rotina laboratorial os isolados foram identificados quanto ao gênero, espécie e teste de suscetibilidade antimicrobiana através do equipamento VITEK 2 Compact. As amostras foram armazenadas na bacterioteca para fins de realização de testes confirmatórios e/ou estudos, localizada no Laboratório de Genômica do HEMOAM, sendo, posteriormente, subcultivadas em meio de ágar MacConkey, para a realização de extrações dos DNAs cromossômico e plasmidial, a serem utilizados nos protocolos de PCR para a identificação dos genes de interesse e sequenciamento dos mesmos (Figura 4).

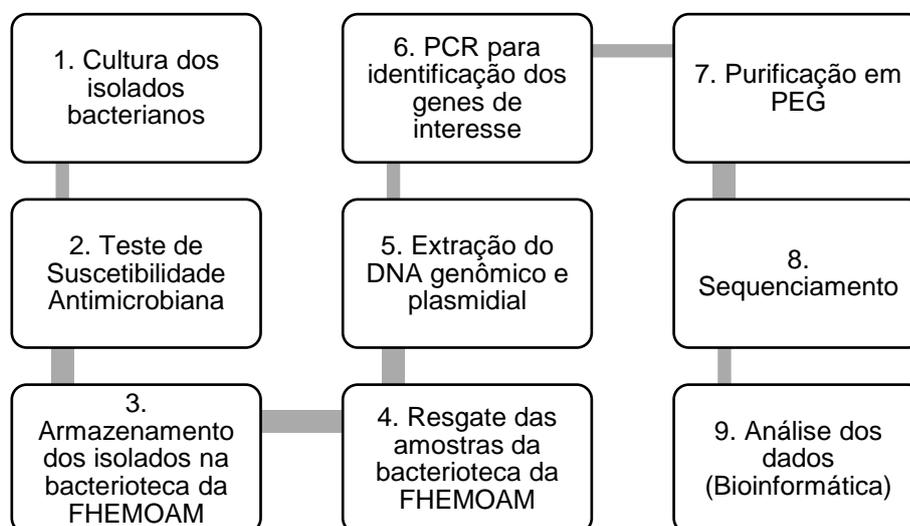


Figura 4. Fluxograma de procedimentos da pesquisa.

8.2 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO

A extração do DNA genômico e plasmidial do isolado de *C. indologenes* foi realizado conforme protocolo dos kits PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), utilizando-se previamente tratamento com lisozima 50µl (10mg/mL) para permitir a lise bacteriana, e *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kits* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) (Anexos 1 e 2).

8.3 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR) DOS GENES ESBLs

A detecção dos genes *bla* (beta-lactamase) foi realizada através de técnica de PCR *in house*. Os *primers* utilizados estão descritos no Quadro 9 e os Mixs padronizados no Quadro 10.

Genes Iniciadores		Sequências	Referência
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG	Lim et al., 2009
	TEM-R	CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA	Lim et al., 2009
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F	GGT TAT GCG TTA TAT TCG CC	Lim et al., 2009
	SHV-R	TTA GCG TTG CCA GTG CTC	Lim et al., 2009
<i>bla</i> _{CTX-M-1 group}	CTX-F	CGCT TTG CGA TGT GCAG	Villegas et al., 2004
	CTX-R	ACC GCG ATA TCG TTG GT	Villegas et al., 2004
<i>bla</i> _{CTX-M-2 group}	CTX-F	TTA ATG ACT CAG AGC ATTC	Villegas et al., 2004
	CTX-R	GAT ACC TCG CTC CAT TTA TTG	Villegas et al., 2004
<i>bla</i> _{CTX-M-8 group}	CTX-F	TGA ATA CTT CAG CCA CACG	Villegas et al., 2004
	CTX-R	TAG AAT TAA TAA CCG TCG GT	Villegas et al., 2004
<i>bla</i> _{CTX-M-9 group}	CTX-F	CGC TTT ATG CGC AGA CGA	Villegas et al., 2004
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48-F	GCT TGA TCG CCC TCG ATT	Dallene et al., 2010
	OXA-48-R	GAT TTG CTC CGT GGC CGA AA	Dallene et al., 2010
<i>bla</i> _{OXA}	OXA-F	ACACAATACATATCAACTTCGC	Lim et al., 2009
	OXA-R	AGTGTGTTTAGAATGGTGATC	Lim et al., 2009
<i>bla</i> _{GES}	GES-F	GCT TCA TTC ACG CAC TATT	Hong et al., 2012
	GES-R	CGA TGC TAG AAA CCG CTC	Hong et al., 2012
<i>bla</i> _{AmpC}	NHAmpCF	ATTCGTATGCTGGATCTCGCCACC	Coudron, Hanson e Climo, 2003
	NHAmpCR	CATGACCCAGTTCGCCATATCCTG	Coudron, Hanson e Climo, 2003
<i>bla</i> _{KPC}	KPC_FNF	ATGTCACTGTATCGCCGTC	Nosso estudo
	KPC_FNR	TTACTGCCCCGTTGACGCC	Nosso estudo
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-F	TTG ACA CTC CAT TTA CDG	Dallene et al., 2010
	IMP-R	GAT YGA GAA TTA AGC CAC YCT	Dallene et al., 2010
<i>bla</i> _{NDM}	NDM_CFFOR	GCC CAA TAT TAT GCA CCC GG	Nosso estudo
	NDM_CFREX	CGC AGC TTG TCG GCC AT	Nosso estudo
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-F	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A	Dallene et al., 2010
	VIM-R	CGA ATG CGC AGC ACC AG	Dallene et al., 2010
<i>bla</i> _{IND-iike}	IND1-F	GCCCAGGTTAAAGATTTTGTAAAT	Bellais et al., 2000
	IND1-R	CATGGCCACCGCCTTTCCATTC	Bellais et al., 2000
<i>bla</i> _{IND-2}	IND2-F	GGTTTGCATATCTATCTGCC	Bellais et al., 2000
	IND2-R	ATCCAAAGAGAGGCTGGAGT	Bellais et al., 2000
<i>bla</i> _{mcr-1}	CF-CLR-FOR	CGGTCAGTCCGTTTGTTTC	Nosso estudo
	CF-CLR-VER	TTGGTCGGTCTGTAGGG	Nosso estudo

Quadro 9. Iniciadores a serem utilizados para as reações de polimerase em cadeia das β -lactamases de espectro estendido.

Gene de interesse	Mix	Ciclagem	Pares de base (bp)
<i>TEM</i>	H ₂ OQ: 10,8µl Buffer Tp5x: 5µl MgCl ₂ (25mM): 2,5µl dNTP [10mM]: 0,5µl Primer [5mM]: 1µl Taq (5UI): 0,2µl	<u>1x</u> : 96°C, 5 min; <u>35x</u> : 96°C, 1 min, 58° C, 1 min, 72°C, 1 min; <u>1x</u> : 72°C, 10 min; 4°C, ∞	<u>867</u>
<i>SHV</i>	H ₂ OQ: 12,05µl Buffer Tp5x: 5µl MgCl ₂ (25mM): 1,25µl dNTP [10mM]: 0,5µl Primer [5mM]: 1µl Taq (5UI): 0,2µl	<u>1x</u> : 96°C, 5 min; <u>35x</u> : 96°C, 1 min, 60° C, 1 min, 72°C, 1 min; <u>1x</u> : 72°C, 10 min; 4°C, ∞	<u>867</u>
<i>CTX-M</i> grupos 1, 2, 8 e 9	H ₂ OQ: 14,7µl Buffer Tp10x: 2,5µl MgCl ₂ (50mM): 0,75µl dNTP [10mM]: 0,5µl Primer [5mM]: 1,25µl Taq (5UI): 0,3µl	<u>1x</u> : 95°C, 5 min; <u>30x</u> : 95°C, 1 min, 53 °C, 1 min, 72°C, 1 min; <u>1x</u> : 72°C, 20 min; 4°C, ∞	<u>550</u>
<i>OXA</i>	H ₂ OQ: 11µl Buffer Tp5x: 5µl MgCl ₂ (25mM): 2µl dNTP [10mM]: 0,5µl Primer [5mM]: 1,0µl Taq (5UI): 0,5µl	<u>1x</u> : 96°C, 5 min; <u>35x</u> : 96°C, 1 min, 59°C, 1 min, 72°C, 1 min; <u>1x</u> : 72°C, 10 min; 4°C, ∞	<u>855</u>
<i>OXA-48</i>	H ₂ OQ: 14,25µl Buffer Tp10x: 2,5µl MgCl ₂ (50mM): 1,25µl dNTP [10mM]: 0,5µl Primer [5mM]: 1,0µl Taq (5UI): 0,5µl	<u>1x</u> : 94°C, 3 min; <u>30x</u> : 94°C, 40 seg, 60° C, 1 min, 40 seg 72°C, 1 min, 1min <u>1x</u> : 72°C, 10 min; 4°C, ∞	<u>281</u>
<i>GES</i>	H ₂ OQ: 11µl Buffer Tp5x: 5µl MgCl ₂ (25mM): 2µl dNTP [10mM]: 0,5µl Primer [5mM]: 1,0µl Taq (5UI): 0,5µl	<u>1x</u> : 95°C, 5 min; <u>30x</u> : 95°C, 1 min, 55° C, 45 seg 72°C, 1 min 30 seg <u>1x</u> : 72°C, 8 min; 4°C, ∞	<u>827</u>
<i>AmpC</i>	H ₂ OQ: 11µl Buffer Tp5x: 5µl MgCl ₂ (25mM): 2µl dNTP [10mM]: 0,5µl Primer [5mM]: 1,0µl Taq (5UI): 0,5µl	<u>1x</u> : 95°C, 3 min; <u>28x</u> : 95°C, 30 seg, 55°C, 30 seg, 72°C, 2 min; <u>1x</u> : 72°C, 5 min; 4°C, ∞	<u>396</u>
<i>KPC e IMP</i>	H ₂ OQ: 11µl Buffer Tp5x: 5µl MgCl ₂ (25mM): 2µl dNTP [10mM]: 0,5µl Primer [5mM]: 1,0µl Taq (5UI): 0,5µl	<u>1x</u> : 94°C, 3 min; <u>30x</u> : 94°C, 30 seg, 58° C, 1 min, 30 seg 72°C, 1 min, 15 seg <u>1x</u> : 72°C, 10 min; 4°C, ∞	<u>1000 (KPC)</u> <u>139 (IMP)</u>
<i>NDM</i>	H ₂ OQ: 11µl Buffer Tp5x: 5µl MgCl ₂ (25mM): 2µl dNTP [10mM]: 0,5µl Primer [5mM]: 1,0µl Taq (5UI): 0,5µl	<u>1x</u> : 94°C, 3 min; <u>30x</u> : 94°C, 30 seg, 54° C, 1 min, 30 seg 72°C, 1 min, 15 seg <u>1x</u> : 72°C, 10 min; 4°C, ∞	<u>801</u>
<i>VIM</i>	H ₂ OQ: 11µl Buffer Tp5x: 5µl MgCl ₂ (25mM): 2µl dNTP [10mM]: 0,5µl Primer [5mM]: 1,0µl Taq (5UI): 0,5µl	<u>1x</u> : 94°C, 10 min; <u>30x</u> : 94°C, 40 seg, 55°C, 34 seg, 72°C, 1 min; <u>1x</u> : 72°C, 7min; 4°C, ∞	<u>390</u>
<i>IND-1 e IND-2</i>	H ₂ OQ: 11µl Buffer Tp5x: 5µl MgCl ₂ (25mM): 2µl dNTP [10mM]: 0,5µl Primer [5mM]: 1,0µl Taq (5UI): 0,5µl	<u>1x</u> : 95°C, 5 min; <u>42x</u> : 95°C, 1 min, 53 °C, 1 min, 72°C, 1 min; <u>1x</u> : 72°C, 10 min; 4°C, ∞	<u>580</u>

Quadro 10. Mix e ciclagens para as reações de polimerase em cadeia dos genes de interesse.

8.4 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Para a purificação dos produtos da PCR, visando a remoção de oligos e nucleotídeos não incorporados na PCR, foi utilizado o protocolo de precipitação com Polietilenoglicol (PEG) (Anexo 3). Para a reação de sequenciamento, utilizou-se o kit *Big Dye Terminator* 3.1, no equipamento 3130/*genetic analyser* conforme protocolo do fabricante (*Applied Biosystems Hitachi*). Este procedimento foi realizado no laboratório da Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ Amazônia).

8.5 CEPA DE CONTROLE DE QUALIDADE

Foram utilizadas como controle de qualidade dos meios de cultura e reações de PCR as cepas de *K. pneumoniae* ATCC 700603, *E. coli* ATCC 25922, e *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*).

8.6 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As sequências obtidas dos genes das β -lactamases foram comparadas as de referência, localizadas no banco de dados de domínio público (*Beta lactamase Data Resources*, GeneBank), sendo realizado o alinhamento de múltipla sequência utilizando o software Geneious v.10.0.10. A construção da árvore filogenética das sequências foi realizada utilizando-se o software Geneious v10.0.10, utilizando-se o método estatístico de Neighbor-Joining, descrito por Saitou e Nei (1987), modelo de distância genética de Tamura-Nei, incluindo as substituições do tipo transições mais transversões. Para a analisar a confiabilidade das estimativas das árvores, foi utilizado o método estatístico não paramétrico de Bootstrap, com percentual mínimo de 100% de replicações. Este método permite calcular as distribuições estatísticas estimadas por meio de criação repetida.

9. RESULTADOS

9.1 TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA (TSA)

O teste de suscetibilidade antimicrobiana (tabela 1), demonstra que ambos os isolados apresentaram resistência aos antibióticos do grupo dos β -lactâmicos como a ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefoxitina, ceftriaxona, cefuroxima, axetilcefuroxima, imipenem, meropenem e piperacilina/tazobactam; da classe dos aminoglicosídeos como a gentamicina e, das polimixinas como a colistina.

Sensibilidade reduzida aos antibióticos β -lactâmico como a ceftazidima, as quinolonas como a ciprofloxacina e a classe das glicilciclina, como a tigeciclina, foi verificada no isolado 2, enquanto que sensibilidade ao antibiótico ciprofloxacina foi detectada apenas no isolado 1 (P 133), e ao cefepime, somente no isolado 2 (BGN 23).

Tabela 1. Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana dos isolados de *C. indologenes*

Antibióticos	Isolados					
	<i>C. indologenes</i> 1 (P 133)			<i>C. indologenes</i> 2 (BGN 23)		
	S	I	R	S	I	R
Amicacina	-	-	≥64	-	-	≥64
Ampicilina	-	-	≥32	-	-	≥32
Ampicilina/Sulbactam	-	-	≥32	-	-	≥32
Cefepime	-	-	32	4	-	-
Cefoxitina	-	-	32	-	-	32
Ceftazidima	-	-	32	-	16	-
Ceftriaxona	-	-	≥64	-	-	≥64
Cefuroxima	-	-	≥64	-	-	≥64
Cefuroxime acetil	-	-	≥64	-	-	≥64
Ciprofloxacina	1	-	-	-	2	-
Colistina	-	-	≥16	-	-	≥16
Gentamicina	-	-	≥16	-	-	≥16
Imipenem	-	-	≥16	-	-	≥16
Meropenem	-	-	≥16	-	-	≥16
Piperacilina/Tazobactam	-	-	≥128	-	-	≥128
Tigeciclina	-	-	≥8	-	4	-

Legenda: R: resistente; I: resistência intermediária; S: sensível.

9.2 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

As reações da PCR realizadas nas amostras, possibilitaram detectar a presença do gene *bla*_{IND-like}, tanto nos dois isolados (P 133 e BGN 23). As demais reações realizadas para os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M grupo 1}, *bla*_{CTX-M grupo 2}, *bla*_{CTX-M grupo 8}, *bla*_{CTX-M grupo 9}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{AmpC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GES}, *bla*_{IMP}, *bla*_{IND-2}, não apresentaram ampliações, caracterizando a ausência de alelos nas amostras testadas (figuras 5 e 6).

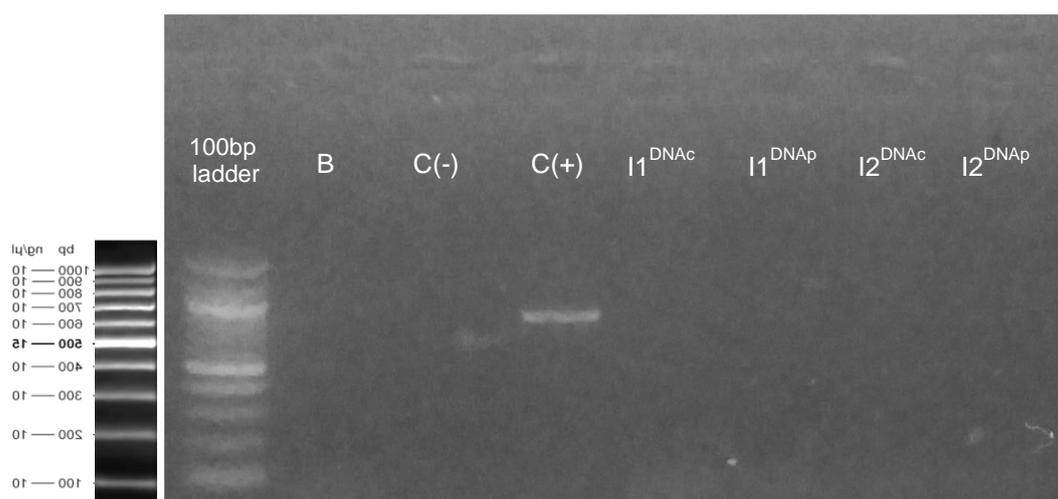


Figura 5. Gel de agarose a 1,5% com ausência de ampliações do gene *bla*_{OXA}. Legenda: B: Branco; C (-): Controle negativo; C (+): Controle positivo (*B. cepacia*); I1^{DNAc} – Isolado 1 DNA cromossômico; I1^{DNAp}: Isolado 1 DNA plasmidial; I2^{DNAc}: Isolado 2 DNA cromossômico; I2^{DNAp}: Isolado 2 DNA plasmidial. Imagem: Acervo pessoal.

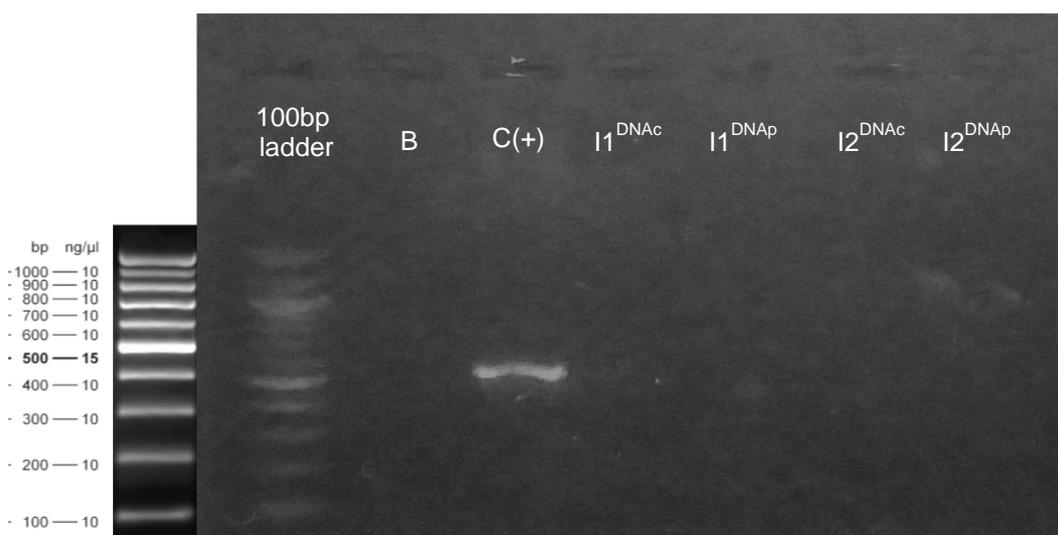


Figura 6. Gel de agarose a 1,5% com ausência de ampliações do gene *bla*_{CTX-M-grupo-1}. Legenda: B: Branco; C (+): Controle positivo (*B. cepacia*); I1^{DNAc} – Isolado 1 DNA cromossômico; I1^{DNAp}: Isolado 1 DNA plasmidial; I2^{DNAc}: Isolado 2 DNA cromossômico; I2^{DNAp}: Isolado 2 DNA plasmidial. Imagem: Acervo pessoal.

9.2.1 Detecção do gene *bla*_{IND-like}

O gene foi detectado no DNA cromossomal e plasmidial do isolado 1 (P 133), enquanto que no isolado 2 (BGN 23), foi identificado somente no DNA plasmidial. Ambos apresentaram bandas de aproximadamente ≈580bp, conforme demonstrado na figura 7.

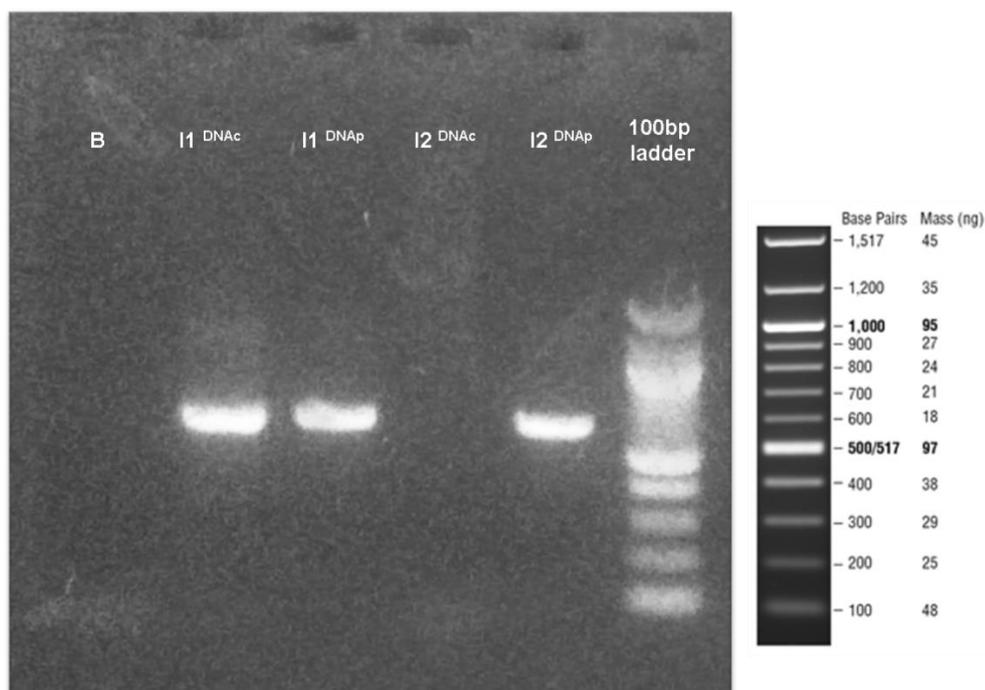


Figura 7. Gel de agarose a 1,5% com amplificações do gene *bla*_{IND-like}. Legenda: B: Branco; I1^{DNAc} – Isolado 1 DNA cromossômico; I1^{DNAP}: Isolado 1 DNA plasmidial; I2^{DNAc}: Isolado 2 DNA cromossômico; I2^{DNAP}: Isolado 2 DNA plasmidial. Imagem: Acervo pessoal.

A análise das sequências obtidas, possibilitou detectar a presença do **subtipo 8 do gene *bla*_{IND-like}** no isolado **2 (BGN 23)**, porém, sem mutações na tradução quando comparada com as sequências de referências depositadas no Genbank (Figura 8). Quanto ao isolado **1 (P 133)**, foi possível identificar o **subtipo 3**; ressaltando-se que a amostra em estudo apresentou **uma mutação** na posição **119 (ALA→SER)**, substituição esta que a diferencia das demais sequências de referência, quando submetidas a análise comparativa (Figura 9). As sequências de referências do **Genbank**, número de acesso **GU186044** e **AF219131**, foram utilizadas como de referência na identificação dos respectivos subtipos e na análise comparativa dos resíduos.

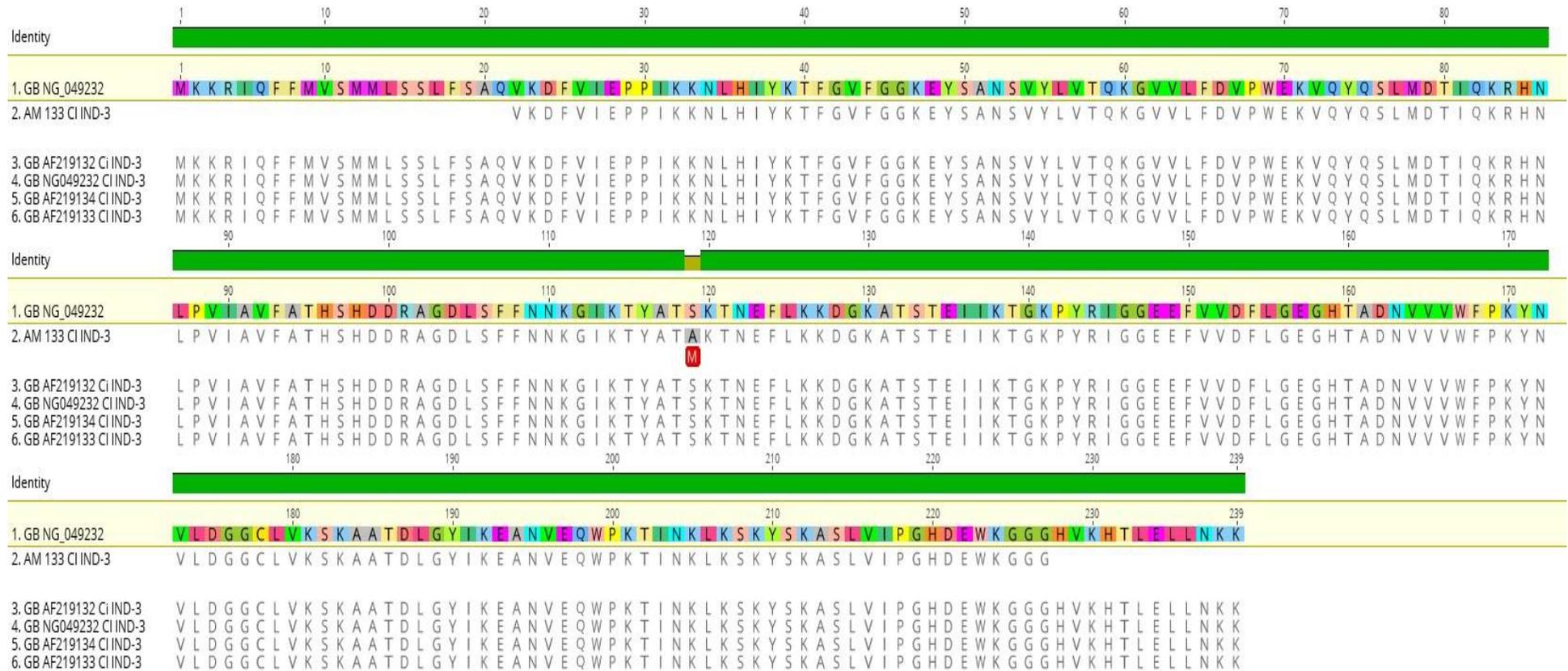


Figura 9. Análise comparativa do isolado **1 IND-3** com a sequência de referência AF219131 e outras. Imagem: William Antunes Ferreira.

Pode-se observar ainda que, na matriz de distâncias dos nucleotídeos (Tabela 2) que compara os isolados 01 (P 133) e 02 (BGN 23) com os tipos de enzima IND disponíveis no banco de dados *Beta-lactamase Data Resources – Pathogen Detection – NCBI*, que o isolado 01 apresentou maior similaridade com a enzima IND-3 (99,1%) enquanto que o 02, similaridade com a enzima IND-8.

Tabela 2. Matriz de distâncias do gene IND. Isolado 01 e isolado 02 frente às sequências de referência dos demais genes IND.

-	IND-1	IND-2	IND-2a	IND-3	IND-4	IND-5	IND-6	IND-7	IND-8	IND-9	IND-10	IND-11	IND-12	IND-14	IND-15
I1	84,4%	76,3%	76,1%	99,1%	69,9%	84,2%	83,7%	84,9%	83,2%	79,4%	83,0%	76,5%	76,5%	98,8%	75,6%
I2	84,7%	77,0%	76,8%	82,8%	70,3%	84,2%	82,6%	84,9%	98,6%	80,1%	98,5%	77,1%	77,1%	83,7%	76,5%

Legenda: I1: isolado 1; I2: Isolado 2. Sequências extraídas a partir da base de dados *Beta-lactamase Data Resources – Pathogen Detection – NCBI*, disponível em: <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>.

De acordo com o padrão de análise obtido na árvore filogenética, o isolado IND-8 (BGN 23) apresentou 100% de similaridade tanto com seu ancestral comum, como o mais próximo, porém, diferiu 12% na similaridade com o grupo descendente IND-8 e IND-10. Em relação ao isolado IND-3 (P 133), verificou-se que o mesmo apresentou 9% de diferença na similaridade com os demais descendentes IND-3 e IND-14. Em relação a seu ancestral direto mais próximo, pode-se observar que foi 100% similar, o que não ocorreu em relação ao ancestral comum, pois foi verificada uma distância em relação ao mesmo. De uma forma geral, foi observado também uma predominância do perfil asiático em relação ao europeu.

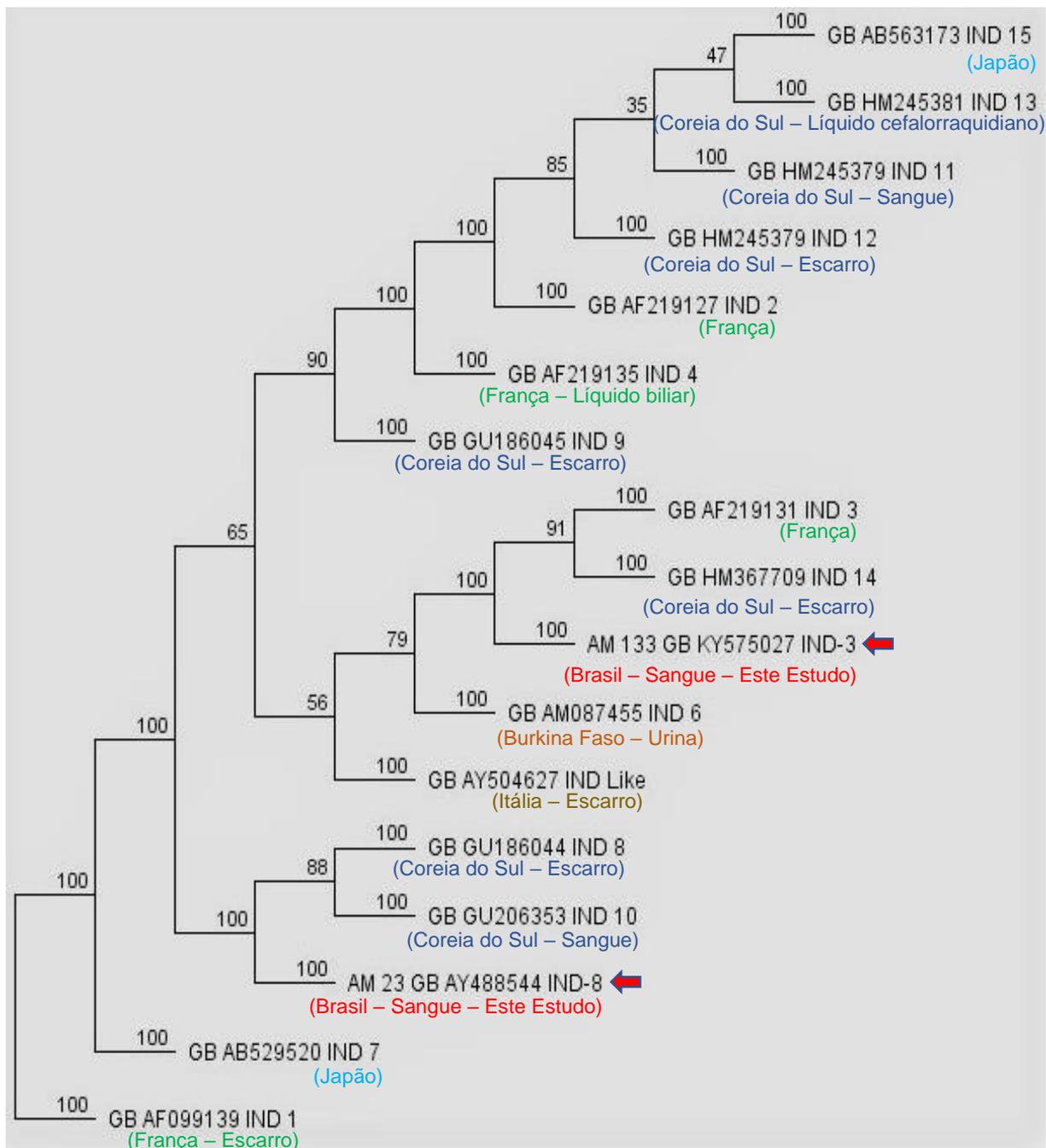


Figura 10. Análise da árvore filogenética dos isolados de *C. indologenes* em relação às sequências das enzimas tipo IND obtidas no banco de dados do GenBank. Imagem: William Antunes Ferreira.

10. DISCUSSÃO

Os isolados de *C. indologenes* P 133 (isolado 1) e BGN 23 (isolado 2) demonstraram perfil de multirresistência aos antibióticos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, polimixinas e glicilciclinas. O isolado P 133 (01) diverge do isolado BGN 23 (02) em relação a algumas classes de antibióticos como quinolonas, glicilciclina e alguns antibióticos β -lactâmicos como a ceftazidima e cefepime, diferenciando quanto a sensibilidade, sensibilidade reduzida e resistência.

Este perfil de resistência é semelhante ao encontrados no estudo conduzido por Bhuyar e col. (2012), Douvoyannis e col. (2010), e Teke e col. (2014), onde os isolados apresentaram resistência às penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, aminoglicosídeos, carbapenêmicos, polimixinas e glicilciclinas. Quanto às quinolonas, o isolado 1 (P 133) de *C. indologenes*, apresentou sensibilidade para a ciprofloxacina, enquanto que o isolado 2 (BGN 23), demonstrou sensibilidade reduzida, diferindo dos estudos realizados por Teke col. (2014), Bhuyar col. (2012), e Wang e col., (2016), que demonstraram resistência a essa droga.

Em 2006, Akay e col. isolaram *C. indologenes* multirresistente, proveniente de processo infeccioso de paciente submetido a transplante de medula óssea. Esta bactéria se diferenciou das deste estudo por apresentar sensibilidade a piperacilina/tazobactam, e no isolado 02 (BGN 23), que apresentou sensibilidade ao cefepime. Apesar da maioria dos casos de infecção por *C. indologenes* estar relacionada a pacientes imunodeprimidos, como demonstrado em estudos realizados por Srinivasan e col. (2016), Imataki e Uemura (2017), Ferreira e col. (2012), Wang e col. (2011), relatos como o de Baruah e col. (2016), abordaram processo infeccioso também em pacientes imunocompetentes. Nesse estudo o perfil de resistência bacteriano foi semelhante ao do isolado 01 (P 133).

Shahul e col. (2014), relatando uma pneumonia por *C. indologenes* em um paciente portador de linfoma não-Hodgkin, em quimioterapia de manutenção, mostrou que o isolado de seu estudo apresentou um perfil fenotípico que diverge de algumas literaturas, como Srinovasan e col. (2016), Bhuyar e col. (2012) e Teke e col. (2014), incluindo as deste estudo. O isolado estudado pelo autor, apresentou sensibilidade aos antibióticos amicacina, gentamicina, piperacilina, cefoperazone/sulbactam e

piperacilina/tazobactam, e resistência a ceftazidima, quinolonas, netilmicina, tobramicina, cefepime e imipenem.

Imataki e Uemura (2017) relatam o isolamento de *C. indologenes* com perfil de resistência semelhante aos dos isolados deste estudo, diferenciando apenas no antibiótico ciprofloxacina, ao qual o isolado 01 (P 133) apresentou sensibilidade enquanto que o isolado 02 (BGN 23), sensibilidade reduzida. Atici e col., em 2016, também identificou *C. indologenes* com perfil de resistência muito similar ao das bactérias deste estudo, confirmando que a presença de isolados multirresistentes já está disseminada pelo mundo, ocasionando grande preocupação clínica.

Estudos relacionados à *C. indologenes* no Brasil ainda são escassos. Ferreira e col. (2012), relataram o isolamento de *C. indologenes* de processo infeccioso de paciente com suspeita de aplasia de medula idiopática e neutropenia febril. Esta bactéria evidenciou sensibilidade aos antibióticos cefepime, ceftazidima, ciprofloxacina e sulfametoxazol/trimetoprima, divergindo dos isolados deste estudo.

Relato realizado por Souza e col. (2012), na Bahia, mostra um isolado de *C. indologenes* com um perfil de sensibilidade diverso em relação ao deste estudo. O isolado dos autores apresentou sensibilidade às quinolonas, carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira e quarta gerações. Os casos de infecção ocasionados por *C. indologenes* podem apresentar variações relevantes, dependentes das características fisiológicas dos pacientes e seu estado clínico, abrangendo lactentes, jovem imunocompetentes a idosos com comorbidades imunossupressoras, assim como fatores de virulência e patogenicidade da bactéria e o perfil de resistência aos antimicrobianos.

É possível perceber algumas similaridades quanto ao perfil de resistência, como em relação aos carbapenêmicos e penicilinas, porém, a utilização de alguns medicamentos ainda causa muitas divergências na literatura, o que impacta de forma direta no manejo terapêutico adequado dos pacientes acometidos por esses processos infecciosos. Conforme critério publicado pelo CLSI, em 2015, para as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, a detecção da produção de enzima ESBL deve ser relatada como resistente a todos os beta-lactâmicos, não importando o resultado do teste de suscetibilidade (FERREIRA et al., 2010). Como as bactérias deste estudo pertencem à família *Flavobacteriaceae*, seria conveniente uma avaliação

mais cuidadosa em relação ao resultado do teste de suscetibilidade e acompanhamento clínico do paciente até que estudos mais aprofundados e guias internacionais padronizados sejam publicados.

Como a bactéria estudada apresentou também perfil de resistência a outras classes de antimicrobianos como as fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, gliciliclinas e polimixinas, pode-se inferir que, provavelmente, outros mecanismos de resistência também possam estar corroborando, como por exemplo a mutação independente, que afeta a estrutura alvo do antibiótico e envolve genes que codificam a subunidade GyrA ou GyrB da Topoisomerase II, resultando na resistência a algumas quinolonas, ou mutações cooperativas, na qual a presença de cópias múltiplas do gene alteram a mutabilidade global, e mutações que ocorrem em diferentes cópias que podem induzir a um fenótipo de resistência, processo comum nas ESBLs codificadas por plasmídeos, ou outros mecanismos como bomba de efluxo, mutação de porinas, ou alterações no gene *mgrB* que medeia modificações no lipídeo A do lipopolissacarídeo da parede celular bacteriana (MARTINEZ e BAQUERO, 2000, MULVEY et al., 2009, KIDD et al., 2017).

Outro fator a ser levado em consideração são as divergências nos perfis de resistência das amostras do estudo, pois evidenciam que a pressão seletiva atuante nas bactérias pode, possivelmente, estar causando o desenvolvimento de mecanismos de resistência importantes. A detecção do gene *bla*_{IND}, com as variantes IND-3 e IND-8 identificados no sequenciamento, foi um achado significativo, especialmente pela detecção plasmidial dos mesmos, pois a transferência horizontal desses genes entre bactérias de outras espécies, podem ocasionar surtos e epidemias importantes e de difícil tratamento, considerando o perfil de resistência apresentado pelas bactérias do estudo.

Muitas das publicações acerca de infecções causadas por *C. indologenes* são relatos de caso que se limitam apenas a informações fenotípicas, dificultando assim o conhecimento sobre as características moleculares que podem estar envolvidas no perfil de resistência tão abrangente desta espécie. Esta pesquisa, portanto, é o primeiro estudo genotípico a ser realizado tanto na região Amazônica como no Brasil, reforçando-se a importância dos testes moleculares para melhor compreensão dos mecanismos de resistência presentes nessa espécie, pois a terapêutica adequada é prejudicada pelo desconhecimento dos mesmos.

O perfil genotípico evidenciou a presença do gene *bla*_{IND-3} e *bla*_{IND-8}, uma metalo- β -lactamase. O isolado 01 (P 133) mostrou-se geneticamente similar à enzima IND-3, diferindo da mesma apenas em uma mutação na posição 119 (ALA \rightarrow SER), da sequência de aminoácidos. Esta mutação pode levar a uma mudança significativa no perfil de resistência ou sensibilidade, levando em consideração que o isolado de nosso estudo apresentou sensibilidade a uma classe antimicrobiana diversa dos β -lactâmicos. Os perfis das enzimas IND identificadas e relatadas em outros artigos, estão descritos no anexo 4.

Em relação ao isolado 02 (BGN 23), pode-se verificar que o mesmo demonstrou 100% de similaridade com a sequência de referência da enzima IND-8, na análise da sequência de aminoácidos das mesmas. O perfil fenotípico da enzima IND-8 não está disponível na literatura, apenas sua sequência, armazenada no *Beta-lactamase Data Resources*, sob o número de identificação GU186044. A indisponibilidade de informações relevantes acerca das enzimas IND-3 e IND-8 são fatores que impactam negativamente na discussão da literatura em relação aos dados encontrados em nossa pesquisa. As sequências das amostras deste estudo foram submetidas ao GenBank sob os números de acesso: KY575027 (isolado 01, P 133) e AY488544 (isolado 02, BGN 23).

A árvore filogenética evidenciou que a maioria de enzimas do tipo IND foram descritas na Coreia do Sul (7 enzimas), seguida da França (4 enzimas) e Japão (2 enzimas). Na Itália e em Burkina Faso, foram identificadas 1 enzima, respectivamente.

No padrão de análise obtido na árvore filogenética, observou-se similaridade do isolado IND-8 (BGN 23) tanto com seu ancestral comum (enzima IND-8), como com o mais próximo (IND-10), diferindo em relação a linhagem descendente próxima do mesmo em 12%, corroborando com dados encontrados na matriz de distâncias das sequências de nucleotídeos, que demonstrou que a enzima do nosso estudo apresenta maior similaridade às enzimas IND-8 e IND-10 armazenadas no Genbank, com 98,6% e 98,5%, respectivamente. A proximidade com o ancestral comum indica uma maior semelhança nas características genéticas. Em relação ao isolado IND-3 (P 133), verificou-se que difere geneticamente de seu ancestral comum (IND-3, através da mutação na posição 119 ALA \rightarrow SER), com 8% de diferença na árvore filogenética entre as enzimas IND-3 e IND-14 armazenadas no Genbank. Porém, apresenta semelhança com seus descendentes próximos, de 99,1 e 98,8%, de acordo com a matriz

de distâncias. Isto indica a existência de diferenças genéticas de nosso isolado em relação ao ancestral comum. Foi observado também, uma predominância do perfil asiático em relação ao europeu, estando os isolados deste estudo, inseridos em uma nova descendência dentro desta árvore, latino-americana. A identificação destes isolados pode ser fonte de informações importantes acerca das características genóticas das espécies de *C. indologenes* na região amazônica e, em maior contexto, no continente americano.

Estudos moleculares sobre mecanismos de resistência bacterianos de espécies multirresistentes devem ser incentivados, pois auxiliarão em futuras pesquisas para o descobrimento de novas drogas, novos mecanismos de resistência genéticos e/ou intrínsecos, ou até mesmo a identificação de novos alvos moleculares bacterianos, que possam inibir a ação dos atuais mecanismos de multirresistência utilizados por esses patógenos virulentos, restaurando assim a utilidade da antibioticoterapia necessária para tratar as doenças infecciosas ocasionadas pelos mesmos e, assim, evitar a disseminação desses clones patogênicos no tanto no âmbito hospitalar como comunitário.

CONCLUSÃO

Os isolados de *C. indologenes* apresentaram um perfil de multirresistência aos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, polimixinas e glicilciclinas, utilizados com maior frequência na rotina hospitalar, diminuindo a opção terapêutica para tratamento.

Na análise da sequência traduzida, a variante IND-3 apresentou uma mutação em relação a sequência de referência (GU186044), o que pode levar a modificações importantes no perfil de sensibilidade ou resistência da mesma, sendo provavelmente, um novo subtipo da variante IND-3. Estudos posteriores mais aprofundados devem ser continuados para verificação desta hipótese.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. G. et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community-acquired urinary tract infections in São Luís, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 44, v. 2, p. 469-471, 2013.
- AFSHAR, M.; NOBAKHT, E.; LEW, S. Q. *Chryseobacterium indologenes* peritonitis in peritoneal dialysis. **BMJ Case Reports**, 2013.
- AFZALI, H. et al. Characterization of CTX-M-Type Extend-Spectrum β -Lactamase Producing *Klebsiella* spp. in Kashan, Iran. **Jundishapur J Microbiol**, v. 8, n. 10, out 2015.
- AHMED, S. H. et al. Nosocomial blood stream infection in intensive care units at Assiut University Hospitals (Upper Egypt) with special reference to extended spectrum β -lactamase producing organisms. **BMC Research Notes**, v. 2, n. 76, mai 2009.
- AKAY, M.; GUNDUZ, E.; GULBAS, Z. Catheter-related bacteremia due to *Chryseobacterium indologenes* in a bone marrow transplant recipient. **Bone Marrow Transplantation**, v. 37, p. 435-436, 2006.
- ALYAMANI, E. J. et al. The occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* carrying aminoglycoside resistance genes in urinary tract infections in Saudi Arabia. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 16, n.1, 2017
- AL-ZAROUNI, M. et al. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in the United Arab Emirates. **Med Princ Pract**, n. 17, p. 32–36, 2008.
- ANES, J. et al. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.
- ARIZA, A. et al. Hypersensitivity Reactions to β -Lactams: Relevance of Hapten-Protein Conjugates. **J Investig Allergol Clin Immunol**, v. 25, n. 1, p. 12-25, 2015.
- ATICI, S. et al. Ventilator-associated pneumonia caused by *Chryseobacterium indologenes*: a rare infant case and review of the literature. **SpringerPlus**, v. 5, out 2016.
- AZEVEDO, S. M. M. **Farmacologia dos antibióticos beta-lactâmicos**. 2014. 70 p. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.
- BAKTHAVATCHALAM, Y. D.; ANANDAN, S.; VEERARAGHAVAN, D. Laboratory Detection and Clinical Implication of Oxacillinase-48 like Carbapenemase: The Hidden Threat. **J Glob Infect Dis**. V. 8, n.1, p. 41-50, jan-mar 2016.
- BALJIN, B. et al. Faecal Carriage of Gram-Negative MultidrugResistant Bacteria among Patients Hospitalized in Two Centres in Ulaanbaatar, Mongolia. **Plos One**, dez 2016.
- BANERJEE, T. et al. Long-term outbreak of *Klebsiella pneumoniae* e third generation

cephalosporin use in a neonatal intensive care unit in north India. **Indian J Med Res**, v. 144, n. 4, p. 622-629, out 2016

BARUAH, M. et al. Noncatheter-related bacteraemia due to *Chryseobacterium indologenes* in an immunocompetent patient. **Indian J Med Microbiol**, v. 34, n. 3, p. 380-381, 2016.

BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World?. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185-230, abr 2013.

BELLAIS, S. et al. Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from *Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 171, n. 2, p. 127–132, 1999.

BELLAIS, S. et al. Genetic Diversity of Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamases from *Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 11, p. 3028–3034, nov 2000.

BEREZIN, E. N.; SOLÓRZANO, F. Gram-negative infections in pediatric and neonatal intensive care units of Latin America. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 8, p. 942–53, 2014.

BHUYAR, G. et al. Urinary tract infection by *Chryseobacterium indologenes*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 370-372, 2012.

BOCHENNEK et al. Infectious complications in children with acute myeloid leukemia: decreased mortality in multicenter trial AML-BFM 2004. **Blood Cancer Journal**, v. 6, jan 2016.

BRADFORD, P. A. Extended-Spectrum Beta-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 922-951, out 2001.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 6, n. 8, ago 2016.

BUSH, K. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. **Critical Care (London, England)**, v. 14, n. 3, 2010.

CALDERÓN, G. et al. *Chryseobacterium indologenes* infection in a newborn: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 5, 2011.

CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M enzymes: origin and diffusion. **Frontiers in microbiology**, v. 3, abr 2012.

CARASSO, E. et al. Draft Genome Sequences of Two Multidrug-Resistant Extended Spectrum--Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Bloodstream Infections. **Genome Announcements**, v. 4, n. 1, jan/fev 2016.

CHANG, Y.-C. et al. Identification, epidemiological relatedness, and biofilm formation of clinical *Chryseobacterium indologenes* isolates from central Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, n. 48, p. 559-654, mai 2015.

CHEN, F.-L. et al. Clinical and epidemiological features of *Chryseobacterium indologenes* infections: Analysis of 215 case. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, n. 6, p. 425-432, dez 2013.

CHOW, J. W.; SHLAES, D. M. Imipenem resistance associated with the loss of a 40 kDa outer membrane protein in *Enterobacter aerogenes*. **J Antimicrob Chemother**, v. 28, n. 4, p. 499-504, out 1991.

CHRISTAKIS, G. B. et al. *Chryseobacterium indologenes* Non-Catheter-Related Bacteremia in a Patient with a Solid Tumor. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 2021–2023, abr 2005.

COLLELLO, R. et al. Antibiotic resistance and integrons in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). **Braz. J. Microbiol.**, v. 46, n. 1, jan-mar 2015.

COTRIM, E. R.; ROCHA, R. D. R.; FERREIRA, M. F. R. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase – KPC em *Enterobacteriaceae*: o desafio das bactérias multirresistentes. **Pós em revista do Centro Universitário Newton Paiva**. 5ª ed., 2012.

CUSHNIE, T. P.; O'DRISCOLL, N.H.; LAMB, A. J. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. **Cell Mol Life Sci.**, v. 73 n. 23, p. 4471-4492, dez 2016.

DHILLON. R. H.-P.; CLARK, J. ESBLs: A Clear and Present Danger? **Critical Care Research and Practice**, 2012.

DOUVOYIANNIS, M. et al. *Chryseobacterium indologenes* bacteremia in an infant. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 531-532, jun 2010.

DROPA, M. et al. Complex class 1 integrons harboring CTX-M-2-encoding genes in clinical *Enterobacteriaceae* from a hospital in Brazil. **J Infect Dev Ctries**, v. 9, n. 8, p.890-897, 2015.

EHLERS, M. M. et al. Detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M antibiotic resistance genes in randomly selected bacterial pathogens from the Steve Biko Academic Hospital. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 56, p. 191–196, 2009.

FAIRMAN, J. W.; NOINAJ, N.; BUCHANAN, S. K. The structural biology of β -barrel membrane proteins: a summary of recent report. **Curr Opin Struct Biol.**, v. 21, n. 4, p. 523-531, ago 2011.

FERREIRA, C. M. et al. Novel methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* clone isolated from patients with haematological diseases at the blood bank centre of Amazon, Brazil. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 2, p. 233–238, 2011.

FLEMING, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special

Reference to Their Use in the Isolation of *B. influenzae*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, p 226-236, 1929.

FLORES-KIM, J.; DARWIN, A. J. Regulation of bacterial virulence gene expression by cell envelope stress responses. **Virulence**, v. 5, n. 8, p. 835—851, nov/dez 2014.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010) **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 73, n. 4, p. 354-360, ago 2012.

GIAOURIS, E. et al. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Front Microbiol**, v. 6, n. 841, 2015.

GIRMENIA, C.; SERRAO, A.; CANICHELLA, M. Epidemiology of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections in Mediterranean Countries. **Mediterr J Hematol Infect Dis**, n. 8 jul 2016.

GUILHEN, C. FORESTIER, C. BALESTRINO, D. Biofilm dispersal: Multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties. **Mol Microbiol.**, abr 2017.

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

GUTMANN, I. et al. SHV-5, a Novel SHV-Type β -Lactamase That Hydrolyzes BroadSpectrum Cephalosporins and Monobactams. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 33, n. 6, p. 951-956, jun 1989.

HAN, S.-T. et al. Establishment of a Simple and Quick Method for Detecting Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) Genes in Bacteria. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 27, p. 132–137, 2016.

HØIBY, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. **APMIS**, v. 125, n.4, p. 272-275, abr 2017.

HUDDLESTON, J. R. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. **Infection and Drug Resistance**, v. 7, p. 167–76, 2014.

HSUEH, P.-O. et al. *Flavobacterium indologenes* Bacteremia: Clinical and Microbiological Characteristics. **Clin Infect Dis**, v. 23, n. 3, p. 550-555, set 1996.

HSUEH, P.-O. et al. Susceptibilities of *Chryseobacterium indologenes* and *Chryseobacterium meningosepticum* to Cefepime and Cefpirome. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 12, p. 3323-3324, dez 1997.

IMATAKI, O.; UEMURA, M. *Chryseobacterium indologenes*, a possible emergent organism resistant to carbapenem antimicrobials after stem cell transplantation. **Clinical Case Reports**, v. 5, n. 1, p. 22-25, jan 2017.

JOOSTE, P.J.; Hugo, C. J. The taxonomy, ecology and cultivation of bacterial genera belonging to the family *Flavobacteriaceae*. **International Journal of Food**

Microbiology, v. 53, p. 81-94, out 1999.

KIDD, T. J. et al. A *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistance mechanism that subdues host defences and promotes virulence. **EMBO Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, fev 2017.

KIM, E. S.; HOOPER, D. C. Clinical importance and epidemiology of quinolone resistance. **Infect Chemother**, v. 46, n. 4, p. 226–238, dez 2014.

KING, D. T.; SOBHANIFAR, S.; STRYNADKA, N. C. J. One ring to rule them all: Current trends in combating bacterial resistance to the β -lactams. **Protein Science**, v. 25, p. 787-803, jan 2016.

KNOTHE, H. et al. Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, n. 6, p. 315-317, 1983.

LEE, C-R. et al. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, jun 2016.

LEE, C-R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 7, mar 2017.

LEE, K. et al. Novel Acquired Metallo- β -Lactamase Gene, blaSIM-1, in a Class 1 Integron from *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Korea. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4485–4491, nov. 2005.

LESKI, T. A. et al. High prevalence of multidrug resistant *Enterobacteriaceae* isolated from outpatient urine samples but not the hospital environment in Bo, Sierra Leone. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 167, 2016.

LIAKOPOULOS, A.; MEVIUS, D.; CECCARELLI, D. A Review of SHV Extended-Spectrum- β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, set 2016.

LIU, Y.; BREUKINK, E. The Membrane Steps of Bacterial Cell Wall Synthesis as Antibiotic Targets. **Antibiotics (Basel)**, v. 5, n.3, set 2016.

LYU, Z. X.; ZHAO, X. S. Periplasmic quality control in biogenesis of outer membrane proteins. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 43, p., 133–138, 2015.

MAAROUFI, H. E. et al. Risk Factors and Scoring System for Predicting Bacterial Resistance to Cefepime as Used Empirically in Haematology Wards. **BioMed Research International**, 2015.

MACK, W. N.; MACK, J. P. ACKERSON, A. O. Microbial film development in a trickling filter. **Microb Ecol.**, v. 2, n. 3, p. 215-226, set 1975.

MCKEW, G. Severe Sepsis Due to *Chryseobacterium indologenes* in an Immunocompetent Adventure Traveler. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n.

11, p. 4100-4101, nov 2014.

MALDONADO, R. F.; SÁ-CORREIA, I.; VALVANO, M. A. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, p. 480–493, abr 2016.

MARTINEZ, J. L.; BAQUERO, F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1771-1777.

MATSUMOTO, T. et al. Characterization of CIA-1, an Ambler class A extended-spectrum β -lactamase from *Chryseobacterium indologenes*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n.1, p. 588–590, 2012.

MILLION-WEAVER, S.; CAMPS, M. Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked? **Plasmid**. set 2014.

MAY, K. L. et al. Lipopolysaccharide transport to the cell surface: periplasmic transport and assembly into the outer membrane. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 5, out 2015.

MAY, K. L.; SILHAVY, T. J. Making a membrane on the other side of the wall. **Biochim Biophys Acta**, out 2016.

MCMURRY, L.; PETRUCCI JUNIOR, R. E.; LEVY, S. B. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci**, v. 77, n. 7, p. 3974-3977, jul 1980.

MULLANY, P.; ALLAN, E.; ROBERTS, A. P. Mobile genetic elements in *Clostridium difficile* and their role in genome function. **Res Microbiol.**, v. 166, n. 4, p. 361-367, mai 2015.

MULVEY, M. R. et al. Ambler Class A Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian Hospitals. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1204–1214, abr 2004.

MULVEY, M. R.; SIMOR, A. E. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be?. **CMAJ**, v. 180, n. 4, fev 2009.

MUTCALI, S. I. et al. Recurrent port infection due to *Chryseobacterium indologenes*. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 45, n. 1, p. 60–61, 2013.

NDIR, A. et al. Epidemiology and Burden of Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing *Enterobacteriaceae* in a Pediatric Hospital in Senegal. **Plos One**, v. 11, n. 2, fev 2016.

NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annu Rev Biochem**, 2009.

NOGUEIRA, K. S. et al. Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 2, p. 162-169, mar/abr 2015.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. **Clinical Microbiology and**

Infection, v. 20, n. 9, set 2014.

OGARAWA, H. Self-resistance in *Streptomyces*, with Special Reference to β -Lactam Antibiotics. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016.

OHNISHI, M. et al. Genetic Characteristics of CTX-M-Type Extended-Spectrum- β -Lactamase (ESBL)-Producing *Enterobacteriaceae* Involved in Mastitis Cases on Japanese Dairy Farms, 2007 to 2011. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 9, p. 3117–3122, set 2013.

OMAR, A. et al. *Chryseobacterium indologenes* in a woman with acute leukemia in Senegal: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 8, 2014.

OZCAN, N. et al. Is *Chryseobacterium indologenes* a shunt-lover bacterium? A case report and review of the literature. **Le Infezioni in Medicina**, n. 4, p. 312-316, 2013.

PAPP-WALLACE, K. M. et al. Carbapenems: Past, Present, and Future. Antimicrobial agents and chemotherapy, p. 4943–4960, nov 2011.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-686, out 2005.

PERILLI, M. et al. Identification and Characterization of a New Metallo- β -Lactamase, IND-5, from a Clinical Isolate of *Chryseobacterium indologenes*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 2988–2990, ago 2007.

PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, out 2015.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D Beta-Lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. 24–38, jan 2010.

PRAGASAM, A. K. A Pilot Study on Carbapenemase Detection: Do We See the Same Level of Agreement as with the CLSI Observations. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 7, jul 2016.

RAO, S. P. N. **Extended spectrum beta-lactamase**. Jun 2012. Disponível em: www.microrao.com.br.

RUBIO, F. G. et al. Trends in bacterial resistance in a tertiary university hospital over one decade. **Braz J Infect Dis**, v. 17, n. 4, p. 480-482, jul/ago 2013.

RUGINI, C. L.; SOBOTTKA, A. M.; FUENTEFRIA, D. B. Occurrence and sensitivity profile of extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* at a tertiary hospital in Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 692-698, nov/dez 2015.

SANTIN, G. C. et al. Antimicrobial photodynamic therapy and dental plaque: a systematic review of the literature. **The Scientific World Journal**, 2014.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SEEMA, Y. et al. *Chryseobacterium indologenes* in a woman with metastatic breast cancer in the United States of America: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 7, n. 190, 2013.

SEKYERE, J. O. Resistance to Last-Resort Antibiotics in South Africa: A Review from a Public Health Perspective. **Frontiers in Public Health**, v. 4, set 2016.

SERRATI, S. et al. Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 7355–7365, 2016.

SHAHRAKI-ZAHEDANI, S. et al. First report of TEM-104-, SHV-99-, SHV-108-, and SHV-110- producing *Klebsiella pneumoniae* from Iran. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. 4, p. 441-445, jul-ago 2016.

SHAHUL, H. A. *Chryseobacterium indologenes* pneumonia in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. **BMJ Case Rep**, 2014.

SHINTANI, M.; SANCHEZ, Z. K.; KIMBARA, K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, mar 2015.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.48 n.c2, abr 2012.

SILVA, G. J. da; DOMINGUES, S. Insights on the Horizontal Gene Transfer of Carbapenemase Determinants in the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Microorganisms**. v. 4, N. 29, 2016.

SOUGAKOFF, W.; GOUSSARD, S.; COURVALIN, P. The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 56, n. 3, p. 343-348, dez 1988.

SOUSA JUNIOR, M. A.; FERREIRA, E. S. CONCEIÇÃO, G. C. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. **NewsLab**, v. 63, 2004.

SRINIVASAN, G. et al. Unforeseeable presentation of *Chryseobacterium indologenes* infection in a paediatric patient. **BMC Res Notes**, v. 9, abr 2016.

STRANDBERG, E.; ULRICH, A. S. AMPs and OMPs: Is the folding and bilayer insertion of β -stranded outer membrane proteins governed by the same biophysical principles as for α -helical antimicrobial peptides? **Biochim Biophys Acta.**, v. 1848, n. 9, p. 1944-1954, set 2015.

TEKE, T. A. et al. *Chryseobacterium indologenes* septicemia in an Infant. **Case Reports in Infectious Diseases**, 2014.

TEMKIN, E. et al. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: biology, epidemiology, and management. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1323, p. 22–42, 2014.

TINELLI, M., et al. Epidemiology and genetic characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in long-term care facilities. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, p. 2982–2987, ago 2012.

TOWNSEND, C. A. Convergent biosynthetic pathways to β -lactam antibiotics. **Curr Opin Chem Biol.**, v. 35, p. 97-108, dez 2016.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. G.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez. 2013.

VANEGAS, J.M.; PARRA, O. L.; JMÉNEZ, J. N. Molecular epidemiology of carbapenem resistant Gram-negative bacilli from infected pediatric population in tertiary care hospitals in Medellín, Colombia: an increasing problem. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 463, set 2016.

VANDAMME, P. et al. New Perspectives in the Classification of the *Flavobacteria*: Description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* norn. rev. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 847-831, out 1994.

ZAPUN, A.; MORLOT, C.; TAHA, M. K. Resistance to β -Lactams in *Neisseria* ssp Due to Chromosomally Encoded Penicillin-Binding Proteins. **Antibiotics (Basel)**, v. 5, n. 4, set 2016.

ZEBA, B. et al. IND-6, a Highly Divergent IND-Type Metallo- β -Lactamase from *Chryseobacterium indologenes* Strain 597 Isolated in Burkina Faso. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 53, n. 10, p. 4320-4326, out 2009.

ZHOU, P.; ZHAO, J. Structure, inhibition, and regulation of essential lipid A enzymes. **Biochim Biophys Acta.**, dez 2016.

ZHOU, K. et al. Characterization of a CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak strain assigned to a novel sequence type (1427). **Frontiers in microbiology**, v. 6, nov 2015.

YAMAGUCHI, Y. Structure of metallo- β -lactamase IND-7 from a *Chryseobacterium indologenes* clinical isolate at 1.65-Å resolution. **J. Biochem.** v. 147, n. 6, p. 905–915, 2010.

YOTSUJI, A. et al. Properties of Novel β -Lactamase Produced by *Bacteroides fragilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 24, n. 6, p. 925-929, dez 1983.

WANG, L. et al. Prevalence of Resistant Gram-Negative Bacilli in Bloodstream Infection in Febrile Neutropenia Patients Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Single Center Retrospective Cohort Study. **Medicine**, v. 94, n. 45, nov 2015.

WANG, T. et al. Whole genome sequencing uncovers a novel IND-16

metallo- β -lactamase from an extensively drug-resistant *Chryseobacterium indologenes* strain J31. **Gut Pathog**, v.8, n. 47, 2016.

WANG, Y. G. et al. *Chryseobacterium indologenes* peritonitis in a patient with malignant ascites. **Int Med Case Rep J**, v.4, p. 13-15, jan 2011.

WHILEY, D. et al. Penicillinase-Producing Plasmid Types in *Neisseria gonorrhoeae* Clinical Isolates from Australia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7576 –7578, dez 2014.

ANEXOS

ANEXO 1 – EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Materiais Necessários

- Álcool 96-100%;
- Amostra para isolamento de DNA (veja o protocolo adequado para a quantidade da amostra de partida);
- Salina tamponada com fosfato (PBS) para lise de células de mamíferos;
- Lisozima e buffer de lisozima digestiva (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 1% Triton X-100) para lisado bacteriano;
- Tubos microcentrifugo livres de DNAase e estéreis;
- Banhos de água ou de blocos de calor e uma microcentrifuga capazes de centrifugação >10,000 x g;
- Componentes fornecidos com o kit*
- *PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer*
- *PureLink™ Genomic Digestion Buffer*
- Proteinase K (20 mg/ml) and RNase A (20 mg/ml)
- *PureLink™ Genomic Wash Buffers 1 e 2*
- *PureLink™ Genomic Elution Buffer*
- *PureLink™ Spin Columns in Collection Tubes*
- *PureLink™ Collection Tubes.*

Antes de começar

- Certifique-se que não há precipitados visíveis no *PureLink™ Genomic Digestion Buffer* ou *PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer*. Se qualquer precipitado for visível nos buffers, aqueça os buffers a 37°C por 3-5 minutos e misture bem para dissolver o precipitado antes do uso.
- Adicione álcool 96–100% ao *PureLink™ Genomic Wash Buffer 1* e *PureLink™ Genomic Wash Buffer 2* de acordo com as instruções em cada etiqueta. Misture bem. Marque nas etiquetas que o álcool foi adicionado. Armazene ambos os buffers de água com álcool em temperatura ambiente.

Protocolo de lise de celular de bactérias Gram-negativas

1. Preparar um banho-maria ou bloco aquecedor à temperatura de 55°C.
2. Coletar até 2×10^9 colônias bacterianas já cultivadas a 24 horas, por centrifugação.
3. Ressuspender o pellet celular em 180 µl do tampão de digestão *PureLink™ Genomic Digestion Buffer*. Adicionar 20 µl de Proteinase K para lisar as células. Homogeneizar bem através do vortex de forma breve.
4. Incubar o eppendorff de 1,5 mL a 55°C por 30 minutos a 4 horas, conforme a necessidade, com homogeneizações frequentes até completar a lise.
5. Adicionar 20µl de RNase A ao lisado, homogeneizar bem utilizando o vortex de forma rápida, e incubar à temperatura ambiente (TA) por 2 minutos.
6. Adicionar 200µl de *PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer* e homogeneizar bem utilizando o vortex até obter uma solução homogênea.
7. Adicione 200 µl de etanol 96-100% ao lisado. Homogeneizar bem utilizando o vortex por 5 segundos para obter uma solução homogênea.

8. Proceda imediatamente para o **Protocolo da Purificação**, abaixo.

Protocolo de Purificação

O procedimento de purificação foi feito para purificar DNA genômico usando um procedimento de centrifugação baseado em rotações de coluna *spin* em um tempo total de **10-15 minutos**.

1. Adicionar uma coluna *spin* *PureLink*TM em um tubo coletor.
2. Adicionar o lisado (~640 µl) preparado com *PureLink*TM *Genomic Lysis/Binding Buffer* e etanol para a coluna *spin*.
3. Centrifugue a coluna a 10,000 x g por 1 minuto em temperatura ambiente.

Nota: Se você estiver processando >200 µl de material de partida como sangue, você precisa fazer múltiplos carregamentos do lisado através da transferência de qualquer lisado remanescente para o mesmo *PureLink*TM *Spin Column* (acima) e centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto.

4. Descartar o tubo coletor e colocar a coluna *spin* em um tubo coletor limpo fornecido no kit.
5. Adicionar 500 µl de tampão de lavagem 1 (*Wash Buffer 1*) preparado com etanol para a coluna.
6. Centrifugar a coluna a 10,000 x g por 1 minuto em temperatura ambiente.
7. Descartar o tubo coletor e colocar a coluna *spin* em um tubo coletor limpo fornecido no kit.
8. Adicionar 500 µl de tampão de lavagem 2 (*Wash Buffer 2*) preparada com etanol na coluna.
9. Centrifugar a coluna na velocidade máxima por 3 minutos em temperatura ambiente. Descarte o tubo coletor.
10. Colocar a coluna de rotação em um tubo de microcentrífuga estéril de 1,5ml;
11. Adicionar 25-200 µl (~75µl) de tampão de eluição *Purelink* (*PureLink*TM *Genomic Elution Buffer*) na coluna. Escolher o volume de eluição conforme a sua necessidade (50-75µl).
12. Incubar a coluna em temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a coluna na velocidade máxima por 1 minuto em temperatura ambiente.
O tubo contém gDNA purificado.
13. Para recuperar mais DNA, realizar uma segunda eluição usando o mesmo volume do tampão de eluição do passo 11.
14. Centrifugar a coluna em velocidade máxima por 1,5 minutos à temperatura ambiente.
O tubo contém gDNA purificado. Remover e descartar a coluna.
15. Armazenar o DNA em temperatura -20°C.

ANEXO 2 – EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

PureLink™ Quick Plasmid DNA Miniprep Kits (Invitrogen)

Isolando o material do plasmídeo

1. **Retirar.** Obter por centrifugação a 1 a 5 ml de células a partir de um meio de cultura.
2. **Ressuspender.** Adicionar 250 µl do *Ressuspension Buffer* (R3) com RNAase para o pellet de células e ressuspender o pellet até que esteja homogêneo.
3. **Lisar.** Adicionar 250 µl do *Lysis Buffer* (L7). Misturar delicadamente, invertendo o tubo tampado cinco vezes. Não utilizar vortex. Incubar o tubo à temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. **Precipitar.** Adicionar 350 µl do *Precipitation Buffer* (N4). Misturar imediatamente invertendo o tubo, ou para grandes peletes, agitando vigorosamente o tubo, até que a mistura esteja homogênea. Não utilizar vortex. Centrifugar o lisado por >12.000x g durante 10 minutos.
5. **Inverter.** Retirar o sobrenadante a partir do Passo 4 em uma coluna spin de 2 ml em um tubo de lavagem, centrifugar a coluna por 12,000x g durante 1 minuto. Descartar o precipitado e colocar a coluna de volta para o tubo de lavagem.
6. **Lavar e remover o etanol.** Adicionar 700 µl do *Wash Buffer* (W9) com etanol para a coluna. Centrifugar a coluna por 12,000x g durante 1 minuto. Descartar o precipitado e colocar a coluna no tubo de lavagem. Centrifugar a coluna por 12,000x g durante 1 minuto. Descartar o tubo de lavagem com o precipitado.
7. **Eluir.** Colocar a coluna spin de 1,5 ml em um tubo de recuperação limpo. Adicionar 75 µl de *TE Buffer* (TE) pré-aquecido para o centro da coluna. Incubar a coluna durante 1 minuto à temperatura ambiente.
8. **Recuperar.** Centrifugar a coluna por 12,000xg durante 2 minutos. Armazenar o DNA do plasmídeo em 4° C ou em alíquotas à -20°C.

ANEXO 3 - PRECIPITAÇÃO DE PRODUTO DA PCR COM POLIETILENOGLICOL (PEG)

Antes de iniciar o procedimento:

- a. Armazene o etanol 80% a -20°C;
- b. Programe o banho-maria ou banho seco a 37°C.

Procedimento:

1. Transfira o volume da PCR para tubo de 1,5mL e adicione PEG (20%);

Observação 1: O volume de PEG a ser adicionado deve ser igual ao volume da PCR

Observação 2: Antes de transferir o PEG, homogeneizá-lo.

2. Agite suavemente em vórtex por 10 segundos e incube a 37°C por 15 minutos;
3. Após incubação, centrifugue a 6000 rpm por 20 minutos à temperatura ambiente;
4. Descarte o sobrenadante e adicione 125µL de etanol 80% gelado. Em seguida, centrifugue a 4500 rpm por 2 minutos;

Observação 3: O etanol não pode demorar muito tempo no tubo. Trabalhar imediatamente.

5. Descarte o sobrenadante, **bata bem o tubo no balcão** e deixe secando a 60°C por 10 minutos para remoção de resíduos de etanol; após descarte aguarde alguns momentos.
6. Certifique-se da ausência de resíduos de etanol e adicione água livre de nuclease, sendo adicionado o mesmo volume inicial da PCR.
7. Agite em vórtex por 10 segundos e armazene amostra a -20°C.

Observação 4: Antes do armazenamento da amostra a -20°C armazene a 4-5°C por algumas horas para uma melhor eluição do DNA.

**ANEXO 4 - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS TSAS DOS ISOLADOS 01 E 02
E OS PERFIS DAS ENZIMAS DESCRITAS NA LITERATURA**

Antibiótico	IND-3 (Isol. 1)	IND-8 (Isol. 2)	IND-1⁽¹⁾	IND-2⁽²⁾	IND-3⁽²⁾	IND-4⁽²⁾	IND-5⁽³⁾	IND-6⁽⁴⁾	IND-16⁽⁵⁾
Ampicilina	>32	>32	-	-	-	-	-	>64	>32
Ampicilina/sulbactam	>32	>32	-	-	-	-	-	-	≥32
Piperacilina/tazobactam	>128	>128	-	-	-	-	8	4	≥128
Cefuroxime	>64	>64	-	-	-	-	-	>64	-
Cefoxitina	32	32	8	16	8	16		16	-
Cefepime	32	4	1	2	0,5	1	0,5	1	≥64
Ceftazidime	32	16	32	8	8	8	1	8	≥64
Amicacina	>64	>64	-	-	-	-	-	-	≥64
Gentamicina	>16	>16	-	-	-	-	-	-	≥16
Imipenem	>16	>16	32	64	32	4	32	>64	≥16
Meropenem	>16	>16	32	32	32	16	16	8	-
Ciprofloxacina	1	2	-	-	-	-	-	-	≥4
Colistina	>16	>16	-	-	-	-	-	-	32

MICs dos isolados da pesquisa em comparação com os MICs descritos na literatura das diferentes enzimas identificadas do gene IND. Legenda: Isol. 1: Isolado 1; Isol. 2: Isolado 2. Fonte (1): Bellais et al. (1999); (2): Bellais et al. (2000); (3): Perilli et al. (2006); (4): Zeba et al. (2009); (5): Wang et al. (2016).