

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KEITE DA SILVA NOGUEIRA

PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BETA-LACTAMASES DE
ESPECTRO AMPLIADO (ESBL) EM ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS NO
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE CURITIBA

CURITIBA

2011

KEITE DA SILVA NOGUEIRA

PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BETA-LACTAMASES DE
ESPECTRO AMPLIADO (ESBL) EM ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS NO
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE CURITIBA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Iara Taborda Messias Reason.

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Libera Maria Dalla Costa.

CURITIBA

2011

Aos meus pais Marly e Sebastião, ao meu esposo Edson, aos meus avôs Geraldo (in memorian) e Francisca e a toda minha família que, com muito amor, me apoiaram nas longas caminhadas, me ajudaram a construir o que sou e a concretizar esse sonho.

Agradecimentos

Agradeço a DEUS pela sua presença constante em minha vida, pela força, pela fé e pela sabedoria que foram fundamentais não somente na realização desse trabalho, mas em todas as conquistas pessoais e profissionais.

Ao meu esposo Edson pela companhia, amor e ajuda na realização desse trabalho. Aos meus pais Marly e Sebastião, por tudo que me ensinaram, pelo exemplo de vida e pelo apoio incondicional. Aos meus irmãos Kelvin e Kleber e a toda minha família pelo amor e carinho.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade, e à minha orientadora, Dra. Iara Taborda Messias Reason, pela disponibilidade e pela acolhida ao orientar esse trabalho.

À minha co-orientadora Dra. Libera Maria Dalla Costa, pela ajuda, pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade e pela orientação.

Aos meus amigos, que compreenderam minha ausência, ouviram minhas reclamações e me incentivaram a continuar.

Às amigas Laura Lúcia Cogo, Alessandra Vale Daur, Jussara Kasuko Palmeiro, Daniele Conte, Fernanda Valverde, Andreia Conte e Giuliana Locatelli, pela grande e indispensável ajuda.

A toda equipe da Unidade de Apoio ao Diagnóstico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, especialmente aos colegas dos setores de Bacteriologia, Biologia Molecular e Preparo de Meios e Reativos, pela ajuda e apoio.

À Dra. Ana Cristina Gales e a toda equipe do Laboratório Alerta, especialmente Eloisa Campana, Renata Picão e Paula Barbosa, pela ajuda e disponibilidade.

Ao Dr. Marcio José da Silva (Unicamp), pela ajuda com os sequenciamentos.

A todos que contribuíram de alguma forma para meu crescimento e para a realização desse trabalho.

Nada há de melhor para o homem do que alegrar-se com o fruto de seus trabalhos.

(ECLE 3, 22)

RESUMO

A resistência em enterobactérias está aumentando de forma alarmante no mundo todo. Este trabalho avaliou a ocorrência de β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs) em 1827 amostras de enterobactérias isoladas de pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, no período de 2003 a 2008. A detecção de β -lactamases foi realizada por testes fenotípicos (duplo disco difusão, disco combinado, teste de Hodge) e genotípicos (reação em cadeia da polimerase e sequenciamento). A similaridade genética entre as cepas foi determinada por eletroforese em campo pulsado (PFGE) e a suscetibilidade aos antimicrobianos por microdiluição em ágar. Os fatores de risco e desfecho clínico associados com cepas produtoras de ESBL foram avaliados por um estudo de caso-controle. Entre as amostras testadas, 382 (20,9%) foram confirmadas como produtoras de ESBL, sendo o tipo CTX-M encontrado em 284 amostras (74,3% das ESBLs), o tipo SHV em 84 amostras (22,0%), o tipo CTX-M junto com SHV em dez amostras (2,6%), o tipo TEM em duas amostras (0,6%) e o tipo PER também em duas amostras (0,6%). Os micro-organismos produtores de ESBL apresentaram 99,3% de sensibilidade a imipenem, 98,2% a meropenem, 86,4% ao ertapenem e 90,3% a tigeciclina. Seguindo os novos critérios do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2010), 19,6% das amostras produtoras de ESBL seriam reportadas como sensíveis a ceftazidima, ; 4,3% a cefotaxima, 10,4% ao aztreonam e 12,14% ao cefepime, respectivamente. A detecção de ESBL em *Enterobacter* spp. apresentou melhor sensibilidade quando foi usado o cefepime como substrato ou quando inibidores de AmpC foram adicionados ao ágar. A disseminação das amostras produtoras de ESBL CTX-M foi predominantemente clonal em *Enterobacter aerogenes* e policlinal nas demais espécies, com alguns grupos de amostras relacionadas. A presença de ESBL em *Enterobacter* spp. causadores de bacteremias não aumentou a mortalidade, porém, aumentou o tempo de permanência dos pacientes no hospital. Não foram encontradas β -lactamases AmpC plasmídicas (pAmpC) ou carbapenemases nas amostras de 2003 a 2008. Essas β -lactamases foram encontradas apenas em 2010, sendo a pAmpC do tipo CMY-2 encontrada em três isolados de *E. coli* não relacionados e a carbapenemase do tipo KPC-2 encontrada em três isolados de *K. pneumoniae* altamente relacionados. Estudos epidemiológicos são importantes para determinar a prevalência e vias de transmissão das cepas produtoras de β -lactamases e, assim, fornecer dados para estabelecer protocolos de detecção laboratorial, terapia e intervenções para redução da disseminação da resistência.

Palavras-chave: Enterobacteriaceae. ESBL. Resistência bacteriana. β -lactamase.

ABSTRACT

The resistance in Enterobacteriaceae is increasing worldwide. This study has evaluated the occurrence of extended spectrum β -lactamases (ESBL) in 1827 samples of Enterobacteria isolated from patients at the Clinical Hospital, Federal University of Parana, during 2003 to 2008. The detection of β -lactamases was performed by phenotypic tests (double disc diffusion, combined disk, Hodge) and genotypic tests (polymerase chain reaction and sequencing). The genetic similarity among strains was determined by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and the antimicrobial susceptibility by agar microdilution. Risk factors and clinical outcomes associated with ESBL producing strains were evaluated by a case-control study. Among the samples tested, 382 (20.9%) were confirmed as ESBL producers and the CTX-M group found in 284 (74.3%) isolates, the SHV group in 84 (22.0%), the TEM group and the PER group in two isolates (0.6% each of them) and the CTX-M plus SHV group together in dez isolates (2.6%). The 99.3% of the ESBL producing organisms were imipenem susceptible, 98.2% meropenem, 86.4% ertapenem and 90.3% tigecycline susceptible. Following the new Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2010) breakpoints 19.6%, 4.3%, 10.4% and 12.14% of ESBL would be reported as ceftazidime, cefotaxime, aztreonam and cefepime susceptible respectively. The ESBL detection in *Enterobacter* spp. isolates has showed better sensitivity when cefepime was used as substrate or when AmpC inhibitors were added to the agar. The spread of the CTX-M ESBL-producing organisms was mainly clonal in *Enterobacter aerogenes* and polyclonal, with some groups of related strains, in other species. The ESBL production in *Enterobacter* spp. causing bacteremia has not increased the mortality, but has caused longer hospital stay. Plasmid AmpC and carbapenamases were not found in samples from 2003-2008, appearing only in strains isolated in 2010. The CMY-2 plasmid AmpC were found in three polyclonal strains of *E. coli* and KPC carbapenemase were found in three clone strains of *K. pneumoniae*. Epidemiological studies are important to determine the prevalence and routes of dissemination of β -lactamases producing strains, thus preventing the spread of resistance.

Key words: Enterobacteriaceae. ESBL. Antimicrobial resistance. β -lactamase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA BÁSICA DOS ANTIMICROBIANOS β -LACTÂMICOS.....	24
FIGURA 2 – MECANISMO DE AÇÃO DAS β -LACTAMASES COM SERINA NO SÍTIO ATIVO.	29
FIGURA 3 – SELEÇÃO DAS AMOSTRAS PARA PESQUISA DAS DIFERENTES β -LACTAMASES.	77
FIGURA 4 – TESTE POSITIVO PARA ESBL UTILIZANDO O MÉTODO DO DISCO COMBINADO (DC).....	97
FIGURA 5 – TESTE DE DUPLA DIFUSÃO (DDD) POSITIVO PARA ESBL.....	98
FIGURA 6 – AMOSTRAS POSITIVAS NA PESQUISA DO GENE <i>bla</i> _{TEM} POR PCR.	98
FIGURA 7 – AMOSTRAS POSITIVAS NA PESQUISA DO GENE <i>bla</i> _{SHV} POR PCR.	99
FIGURA 8 – AMOSTRAS POSITIVAS NA PESQUISA DOS GENES <i>bla</i> _{CTX-M-2} E <i>bla</i> _{CTX-M-9} POR PCR.....	99
FIGURA 9 – AMOSTRAS POSITIVAS NA PESQUISA DOS GENES <i>bla</i> _{CTX-M-2} E <i>bla</i> _{CTX-M-8} POR PCR.....	100
FIGURA 10 – AMOSTRAS POSITIVAS NA PESQUISA DOS GENES <i>bla</i> _{CTX-M-1} E <i>bla</i> _{CTX-M-2} POR PCR.....	100
FIGURA 11 – CURVA ROC OBTIDA PARA MÉTODO DE DISCO COMBINADO EM ÁGAR COM CLOXACILINA E SUBSTRATO CEFEPIME.....	109
FIGURA 12 – MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ESBL EM <i>Enterobacter</i> spp..	110
FIGURA 13 – DENDROGRAMA DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS DE AMOSTRAS DE <i>K. pneumoniae</i> PRODUTORAS DE ESBL DO TIPO CTX-M.	116
FIGURA 14 – DENDROGRAMA DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS DE AMOSTRAS DE <i>E. coli</i> PRODUTORAS DE ESBL DO TIPO CTX-M.	117
FIGURA 15 – DENDROGRAMA DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS DE AMOSTRAS DE <i>E. aerogenes</i> PRODUTORAS DE ESBL DO TIPO CTX-M.	118

FIGURA 16 – DENDROGRAMA DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS DE AMOSTRAS DE <i>E. cloacae</i> PRODUTORAS DE ESBL DO TIPO CTX-M.	119
FIGURA 17 – TESTE FENOTÍPICO POSITIVO PARA A ENZIMA AmpC EM <i>E. coli</i>	123
FIGURA 18 – TESTE DE HODGE POSITIVO.	126
FIGURA 19 – DENDROGRAMA OBTIDO A PARTIR DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS DE AMOSTRAS DE <i>E. cloacae</i> PRODUTORAS DE ESBL, TIPOS DE ESBL, CLÍNICA DE INTERNAMENTO E ANO DO ISOLAMENTO DO MICRO-ORGANISMO.	132
FIGURA 20 – DENDROGRAMA OBTIDO A PARTIR DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS EM PFGE DE AMOSTRAS DE <i>E. aerogenes</i> PRODUTORAS DE ESBL, TIPOS DE ESBL, CLÍNICA DE INTERNAMENTO E ANO DO ISOLAMENTO DO MICRO-ORGANISMO.	132

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO E PRINCIPAIS REPRESENTANTES DOS ANTIMICROBIANOS β -LACTÂMICOS.	24
QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DAS β -LACTAMASES.	33
QUADRO 3 – β -LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO MEDIADAS POR PLASMÍDEOS.	38
QUADRO 4 – PONTOS DE CORTE DO CLSI E EUCAST.	64
QUADRO 5 – RELAÇÃO DAS CEPAS CONTROLE USADAS NOS TESTES FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS.	75
QUADRO 6 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA PESQUISA DE ESBL E TAMANHO DOS PRODUTOS ESPERADOS.	80
QUADRO 7 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA PESQUISA DE AmpC PLASMIDIANA E TAMANHO DOS PRODUTOS ESPERADOS.	82
QUADRO 8 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA PESQUISA DE KPC E TAMANHO DOS PRODUTOS ESPERADOS.	83
QUADRO 9 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA PESQUISA DE M β L E TAMANHO DOS PRODUTOS ESPERADOS.	84

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – PERFIL DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>E. coli</i> NOS ANOS 2000 A 2010	91
GRÁFICO 2 – PERFIL DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>Klebsiella spp.</i> NOS ANOS 2000 A 2010.....	92
GRÁFICO 3 – PERFIL DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>Enterobacter spp.</i> NOS ANOS 2000 A 2010.....	93
GRÁFICO 4 – DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS PRODUTORES DE ESBL NOS SETORES DO HOSPITAL DE CLÍNICAS – UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.....	94
GRÁFICO 5 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS QUE APRESENTARAM ISOLADOS BACTERIANOS PRODUTORES DE ESBL.....	95
GRÁFICO 6 – DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE BACTEREMIA POR <i>Enterobacter spp.</i> ESBL E NÃO ESBL POR FAIXA ETÁRIA.....	129

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PREVALÊNCIA DE ESBL NAS DIFERENTES ESPÉCIES DE ENTEROBACTÉRIAS UTILIZANDO MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS.	101
TABELA 2 – DISTRIBUIÇÃO DOS TIPOS DE ESBL POR ESPÉCIE BACTERIANA.	102
TABELA 3 – POTÊNCIA (CIM ₅₀) E ATIVIDADE (CIM ₉₀) DOS ANTIMICROBIANOS CONTRA AMOSTRAS PRODUTORAS DE ESBL E SUSCETIBILIDADE USANDO PONTOS DE CORTE DO CLSI E EUCAST.....	106
TABELA 4 – SENSIBILIDADE DOS TESTES AVALIADOS NA DETECÇÃO DE ESBL EM <i>Enterobacter spp.</i>	111
TABELA 5 – SENSIBILIDADE DO MÉTODO DE DISCO COMBINADO EM ÁGAR CONTENDO CLOXACILINA, POR ESPÉCIE DE <i>Enterobacter</i> E TIPO DE ESBL.	112
TABELA 6 – FATORES DE RISCO E DESFECHO CLÍNICO DE <i>Enterobacter spp.</i> ESBL E NÃO ESBL.....	131
TABELA 7 – CORRELAÇÃO ENTRE PERMANÊNCIA HOSPITALAR E DESFECHO CLÍNICO COM INFECÇÃO POR <i>Enterobacter spp.</i> ESBL E NÃO ESBL.	131

LISTA DE SIGLAS

AC	Ácido Clavulânico
AmpC	Classe de β -lactamase (Cefalosporinase da Classe C)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APB	Ácido fenil borônico
ATM	Aztreonam
AUC	Área abaixo da curva
<i>bla</i>	Genes das β -lactamases
CAZ	Ceftazidima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CLX	Cloxacilina
CMT	Complexo TEM Mutantes
CPD	Cefpodoxima
CPM	Cefepime
CTX	Cefotaxima
DC	Disco Combinado
DDD	Duplo Disco Difusão
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Efeito Pós-Antimicrobiano
ESAC	AmpC de espectro ampliado
ESBL	β -lactamase de espectro ampliado
ESCMIC	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	European Commitee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and Drugs Administration
HC	Hospital de Clínicas
ICARE	Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology
IR	Resistentes a inibidores

IRT	TEM resistente a inibidores
M β L	Metalo- β -lactamase
MLST	Tipagem por sequenciamento multilocus
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
MYSTIC	Meropenem Yearly Susceptibility Test Information
PBP	Proteína Ligante de Penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pD	Farmacodinâmica
PFGE	Eletroforese em campo pulsado
pI	Ponto Isoelétrico
pK	Farmacocinética
PME	Proteínas da membrana externa
RAPD	Polimorfismo da amplificação randômica do DNA
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio
T	Tempo
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UPGMA	Grupo de pares com médias aritméticas não ponderadas
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VRE	<i>Enterococcus</i> Resistente a Vancomicina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBJETIVOS.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 ENTEROBACTÉRIAS.....	22
2.2 ANTIMICROBIANOS β -LACTÂMICOS.....	23
2.2.1 Classificação e estrutura química.....	23
2.2.2 Farmacocinética e farmacodinâmica.....	25
2.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS.....	27
2.4 β -LACTAMASES	28
2.4.1 Histórico das β -lactamases	30
2.4.2 Classificação das β -lactamases	31
2.5 β -LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO (ESBL).....	34
2.5.1 Origem e evolução	34
2.5.2 Definição de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL)	35
2.5.3 Tipos de ESBLs.....	37
2.5.3.1 ESBLs do tipo TEM	38
2.5.3.2 ESBLs do tipo SHV.....	39
2.5.3.3 ESBLs do tipo CTX-M.....	40
2.5.3.4 ESBLs do tipo PER.....	41
2.5.3.5 ESBLs do tipo OXA	43
2.5.3.6 ESBLs do tipo SFO-1	43
2.5.3.7 ESBLs do tipo BES.....	44
2.5.3.8 ESBLs do tipo BEL	44
2.5.3.9 ESBLs do tipo TLA	44
2.5.3.10 ESBLs do tipo VEB-1.....	45
2.5.3.11 ESBLs do tipo GES	46
2.6 OUTRAS β -LACTAMASES IMPORTANTES EM ENTEROBACTÉRIAS	46
2.6.1 β -lactamases do tipo AmpC	47

2.6.2 β -lactamases resistentes aos inibidores (IRT e CMT).....	48
2.6.3 Carbapenemases	49
2.6.3.1 Carbapenemases do tipo KPC	50
2.7 DISTRIBUIÇÃO DAS ESBLs ENTRE AS ESPÉCIES BACTERIANAS	51
2.8 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESBLs	52
2.9 DISTRIBUIÇÃO DAS ESBLs NO BRASIL	53
2.10 DISSEMINAÇÃO DOS GENES E DOS MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE ESBL	54
2.11 COEXISTÊNCIA COM OUTRAS β -LACTAMASES.....	56
2.12 ESBL E BARREIRA DE PERMEABILIDADE.....	56
2.13 ASSOCIAÇÃO DE RESISTÊNCIA A OUTROS ANTIMICROBIANOS	57
2.14 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DAS ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL	57
2.14.1 Infecções comunitárias por micro-organismos produtores de ESBL.....	58
2.14.2 Infecções nosocomiais por micro-organismos produtores de ESBL	59
2.15 TRATAMENTOS DAS INFECÇÕES POR ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL	60
2.16 PONTOS DE CORTE PARA β -LACTÂMICOS EM ENTEROBACTÉRIAS....	63
2.17 MEDIDAS DE CONTROLE.....	65
2.18 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ESBL.....	66
2.18.1 Técnicas microbiológicas	66
2.18.1.1 Pontos de corte indicativos da produção de ESBL	67
2.18.1.2 Teste de duplo disco difusão	68
2.18.1.3 Teste tridimensional.....	69
2.18.1.4 Teste de adição de ácido clavulânico	69
2.18.1.5 E-test®.....	70
2.18.1.6 Outros métodos fenotípicos	70
2.18.1.7 Detecção de ESBL em espécies diferentes de <i>E. coli</i> e <i>Klebsiella</i> spp.....	71
2.18.2 Métodos de detecção molecular.....	72

3 MATERIAL E MÉTODOS.....	74
3.1 APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA	74
3.2 CARACTERÍSTICAS DO HOSPITAL ESTUDADO	74
3.3 LINHAGENS BACTERIANAS.....	74
3.3.1 Amostras	74
3.3.2 Linhagens controle	75
3.4 TRIAGEM DE ISOLADOS PRODUTORES DE β -LACTAMASES.....	76
3.5 PESQUISA DE ESBL	77
3.5.1 Testes fenotípicos	77
3.5.1.1 Método do disco combinado.....	77
3.5.1.2 Duplo disco difusão	78
3.5.1.3 Disco combinado usando inibidores de AmpC no disco ou ágar	78
3.5.2 Detecção dos genes que codificam as ESBLs.....	79
3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM ÁGAR.....	80
3.7 PESQUISA DE AmpC PLASMIDIANA EM <i>Klebsiella</i> spp. E <i>E. coli</i>	81
3.7.1 Testes fenotípicos	81
3.7.1.1 Disco combinado com cloxacilina (CLX).....	81
3.7.1.2 Disco combinado com ácido fenil borônico (APB)	82
3.7.2 Detecção dos genes que codificam AmpC plasmidiana.....	82
3.8 PESQUISA DE CARBAPENEMASES	83
3.8.1 Método fenotípico (Teste de Hodge).....	83
3.8.2 Detecção dos genes que codificam carbapenemases	83
3.8.2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC)	83
3.8.2.2 Metalo β -lactamases (M β L)	84
3.9 ANÁLISE DA SIMILARIDADE GENÉTICA DAS AMOSTRAS.....	84
3.9.1 Preparo das amostras – confecção dos blocos com DNA	84
3.9.2 Clivagem do DNA e eletroforese	85
3.9.3 Análise dos fragmentos de restrição	85

3.10 SEQUENCIAMENTOS DOS PRODUTOS DA PCR.....	85
3.11 DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO (pI).....	86
3.12 AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA CLÍNICA DA DETECÇÃO DE ESBL EM <i>Enterobacter</i> spp.	87
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	88
3.13.1 Testes fenotípicos para detecção de ESBL em <i>Enterobacter</i> spp.	88
3.13.2 Estudo de caso controle.....	89
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
4.1 DADOS GERAIS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS	90
4.2 PREVALÊNCIA GERAL E DE TIPOS ESPECÍFICOS DE ESBL	97
4.3 SUSCETIBILIDADE DAS AMOSTRAS PRODUTORAS DE ESBL AOS ANTIMICROBIANOS	106
4.4 DETECÇÃO DE ESBL EM <i>Enterobacter</i> spp.	109
4.5 ESTUDO DOS SUBTIPOS de ESBL CTX-M e da SIMILARIDADE GENÉTICA	115
4.6 DETECÇÃO DE AmpC PLASMIDIANA.....	123
4.7 DETECÇÃO DE KPC.....	126
4.8 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE BACTEREMIAS POR <i>Enterobacter</i> spp. PRODUTOR DE ESBL	128
5 CONCLUSÃO.....	136
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138
ANEXOS	163
ANEXO 1 – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HC-UFPR	163
ANEXO 2 – PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA PESQUISA DE GENES DE β -LACTAMASES.....	164
ANEXO 3 – FLUXOGRAMA DA PESQUISA DE β -LACTAMASES EM ENTEROBACTÉRIAS	167

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos é um problema mundial de saúde pública. Nos últimos cinco anos, a Organização Mundial de Saúde, a Comissão da União Europeia, o Centro de Controle de Doenças e outras agências apresentaram relatórios sobre a dimensão desse problema (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2009). Esses relatórios mostraram que a resistência vem crescendo perceptivelmente no mundo todo e que os micro-organismos resistentes estão cada vez mais presentes em infecções adquiridas na comunidade. Isso tem preocupado os microbiologistas, infectologistas e demais profissionais da assistência à saúde, pois existem várias evidências de que a resistência antimicrobiana está associada a um aumento na mortalidade, no tempo de permanência nos hospitais e nos custos do tratamento (SCHWABER; CARMELI, 2007). Além disso, alguns autores vêm afirmando que está chegando a era das infecções não tratáveis. Infelizmente, para a Enterobacteriaceae, família que vem sofrendo grandes mudanças, isso pode realmente acontecer (LIVERMORE, 2009b).

As bactérias pertencentes a família Enterobacteriaceae são parte da microbiota intestinal e os agentes mais isolados em infecções humanas. A frequência e a diversidade de mecanismos de resistência a antimicrobianos apresentados por essa família têm mudado nos últimos anos. Até o ano 2000, a maioria dos produtores de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) eram *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., isoladas no ambiente hospitalar, decorrentes da mutação das enzimas TEM e SHV. Agora, as enzimas predominantes em enterobactérias são CTX-M, estão presentes em outras espécies, deixaram de ser exclusivamente hospitalares e passaram a ser encontradas em infecções comunitárias (LIVERMORE *et al.*, 2007).

Os carbapenêmicos, aceitos como a droga de escolha para tratamento de infecções graves causadas por produtores de ESBL, tiveram seu consumo aumentado. A pressão seletiva fez surgir a resistência aos carbapenêmicos que, embora ainda seja baixa em alguns locais, já é alarmante em outros. Nesse caso, os principais mecanismos envolvidos têm sido a produção de carbapenemases como *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), oxacilinases (OXA), metalo- β -lactamases (M β L) ou, ainda, associação entre outras β -lactamases (ESBL ou AmpC) e redução da permeabilidade aos antimicrobianos (LIVERMORE, 2009a). Esses

fatos associados a um grande aumento da resistência às fluorquinolonas e a outros antimicrobianos têm deixado poucas opções para o tratamento das infecções por enterobactérias (PATERSON, 2006).

Muitas pesquisas vêm sendo publicadas, relatando índices e mecanismos de resistência a antimicrobianos em diferentes países e instituições. Esses dados são importantes, pois o perfil de resistência dos micro-organismos varia de acordo com a complexidade do hospital, características dos pacientes atendidos, doenças subjacentes e o uso de antimicrobianos. Estatísticas nacionais e internacionais podem mostrar as tendências regionais e globais, mas, para o tratamento do paciente, dados locais são essenciais. Considerações a respeito da clínica mais afetada, do número de casos importados de outras instituições e sua similaridade genética podem direcionar as intervenções para reduzir a multirresistência (LIVERMORE; PEARSON, 2007).

Com essa finalidade, este trabalho estudou os mecanismos de resistência a β -lactâmicos em enterobactérias, isoladas a partir de amostras clínicas de pacientes internados em um hospital universitário de alta complexidade, com ênfase na pesquisa de β -lactamases de espectro ampliado. Para isso, foram estudados a prevalência de ESBL e os genes que as codificam, a similaridade genética dos micro-organismos e a suscetibilidade dos isolados aos antimicrobianos.

Foram avaliados, também, a importância clínica da detecção de ESBL em *Enterobacter* spp. e os métodos de detecção que podem ser usados com essa finalidade, já que pouco se sabe a respeito e não existe uma metodologia de detecção padronizada por órgãos oficiais.

E, por último, foi estudado o impacto das mudanças do CLSI 2010, que reduziu os pontos de corte para cefalosporinas em enterobactérias e passou a considerar a pesquisa de ESBL desnecessária, para alterar os resultados do antibiograma, deixando a detecção a critério das instituições, porém, apenas para fins epidemiológicos.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo geral

Determinar a prevalência e as características moleculares das β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) produzidas por enterobactérias isoladas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, no período de 2003 a 2008.

Objetivos específicos

- a) Determinar a suscetibilidade a antimicrobianos das enterobactérias produtoras de ESBL por microdiluição em ágar e avaliar o impacto das mudanças do CLSI 2010 na interpretação dos resultados.
- b) Verificar a acurácia dos métodos padronizados para *E. coli* e *Klebsiella* spp. na detecção de ESBL em *Enterobacter*.
- c) Investigar a presença de outras β -lactamases (AmpC plasmidiana e carbapenemases) nas enterobactérias estudadas.
- d) Determinar a similaridade genética das cepas pelo método de eletroforese em campo pulsado (PFGE) e, assim, elucidar as possíveis vias de disseminação das amostras produtoras de β -lactamases.
- e) Determinar se existe diferença dos fatores de risco e desfecho clínico entre as infecções causadas por *Enterobacter* spp.-ESBL e não ESBL.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENTEROBACTÉRIAS

A família Enterobacteriaceae envolve micro-organismos ubíquos e constituintes da microbiota intestinal normal da maioria dos animais, incluindo seres humanos. Os membros dessa família são bacilos Gram-negativos de tamanho médio (0,3 a 1,0 x 1,0 a 6,0 μm). Esses micro-organismos são móveis, dotados de flagelos peritríquios, ou imóveis, não formam esporos e podem crescer rapidamente em condições aeróbias ou anaeróbias, em uma variedade de meios de cultura. As enterobactérias possuem exigências nutricionais simples, fermentam glicose, reduzem o nitrato, são catalase-positivas e oxidase-negativas. A ausência da atividade de citocromo-oxidase constitui uma importante característica, visto que pode diferenciar as enterobactérias de outros bacilos Gram-negativos fermentadores ou não fermentadores (O'HARA C, 2005).

Essas bactérias causam uma série de doenças humanas, incluindo 30% a 35% de todos os casos de sepse, mais de 70% das infecções das vias urinárias e infecções intestinais. Algumas enterobactérias, como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Yersinia pestis*, estão sempre associadas a doenças em seres humanos, enquanto outras, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* são membros da microbiota normal e podem causar infecções oportunistas. As bactérias podem ser adquiridas a partir de um reservatório animal (a maioria das espécies de *Salmonella* e *Yersinia*), de um portador humano (*Shigella* e *Salmonella typhi*) ou, ainda, por disseminação endógena dos micro-organismos do próprio paciente, podendo afetar várias partes do corpo (FARMER *et al.*, 1985).

Os membros da família Enterobacteriaceae, presentes na microbiota normal dos seres humanos, são capazes de causar infecções em vários órgãos, o que os torna potenciais agentes de infecções hospitalares, sendo seu estudo importante nesse ambiente. Principalmente porque são capazes de adquirir e disseminar plasmídeos com múltiplos genes de resistência, o que complica o tratamento dessas infecções no ambiente hospitalar (JANDA *et al.*, 1994; SANDERS; SANDERS, 1997; PODSCHUN; ULLMANN, 1998; O'HARA; BRENNER; MILLER, 2000).

2.2 ANTIMICROBIANOS β -LACTÂMICOS

Os antimicrobianos β -lactâmicos constituem a mais numerosa família de antimicrobianos utilizada na prática clínica. Seu uso é extenso em infecções comunitárias ou hospitalares, devido ao seu amplo espectro de atividade e baixa toxicidade. Alguns aspectos importantes quanto aos antimicrobianos β -lactâmicos estão descritos a seguir.

2.2.1 Classificação e estrutura química

O anel β -lactâmico é a estrutura comum a todos os antimicrobianos dessa família. Além disso, é responsável pela atividade, pois é ele que se liga ao sítio ativo na célula bacteriana. Porém, para que tenha atividade, o anel β -lactâmico deve estar ligado a outro radical, geralmente outro anel. Os radicais e a estrutura formada pelos dois anéis básicos classificam os β -lactâmicos em penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e inibidores de β -lactamases. Dentro de cada grupo, pequenas alterações nas estruturas químicas modificam as características dos antimicrobianos, como espectro de atividade, afinidade por receptores, resistência às β -lactamases, entre outros (KONG; SCHNEPER; MATHEE, 2010). A estrutura básica de cada β -lactâmico pode ser observada na FIGURA 1 e os principais representantes de cada grupo no QUADRO 1, a seguir.

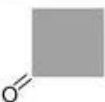
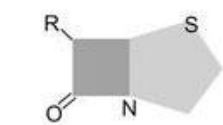
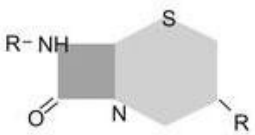
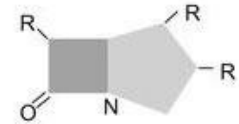
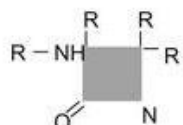
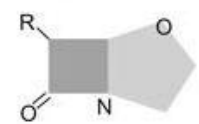
 Anel beta-lactâmico	Anel secundário	Núcleo beta-lactâmico	Grupo antibiótico
	Anel tiazolidina	Ácido 6-Aminopenicilânico	PENICILINAS
	Anel di-hidrotiazida	Ácido 7-Cefalosporânico	CEFALOSPORINAS
	Anel pirrolínico	Carbapenêmico	CARBAPENÊMICOS
	Nenhum	Monobactâmico	MONOBACTÂMICOS
	Anel oxazolidínico	Clavulânico	ÁCIDO CLAVULÂNICO

FIGURA 1 – CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA BÁSICA DOS ANTIMICROBIANOS β -LACTÂMICOS.
 FONTE: adaptado de SUAREZ; GUDIOL (2009).

Grupos	Características	Representantes
Penicilinas	Espectro reduzido	Benzilpenicilina, Fenoxibenzilpenicilina.
	Ativas contra enterobactérias	Ampicilina, Amoxicilina.
	Ativas contra <i>Pseudomonas</i>	Ureidopenicilinas (Piperacilina), Carboxipenicilinas (Ticarcilina, Carbenicilina).
	Antiestafilocócicas	Oxacilina
	Combinadas com inibidores de β -lactamase	Amoxicilina/Clavulonato, Piperacilina/Tazobactam, Ticarcilina/clavulonato, Ampicilina/sulbactam.
Cefalosporinas	Primeira geração	Cefazolina, Cefalotina, Cefalexina.
	Segunda geração	Cefaclor; Cefoxitina.
	Terceira geração	Ceftriaxona, Cefotaxima, Ceftazidima.
	Quarta geração	Cefepime.
Carbapenêmicos		Imipenem, Meropenem, Ertapenem.
Monobactâmicos		Aztreonam.

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO E PRINCIPAIS REPRESENTANTES DOS ANTIMICROBIANOS β -LACTÂMICOS.
 FONTE: adaptado de SUAREZ; GUDIOL (2009).

2.2.2 Farmacocinética e farmacodinâmica

As características farmacocinéticas (pK) variam de acordo com os compostos. De forma geral, a administração intravenosa alcança elevadas concentrações séricas com rapidez, mas o tempo de meia vida é baixo. Os β -lactâmicos com tempo de eliminação mais prolongado são ertapenem e ceftriaxona, mantendo concentrações estáveis por 24 horas. A benzilpenicilina libera o antimicrobiano aos poucos, permitindo administração a cada 24 horas ou até três semanas (SUAREZ; GUDIOL, 2009).

Os β -lactâmicos são pouco absorvidos por via oral, porque são degradados pelo ácido clorídrico presente no suco gástrico, sendo usados por essa via apenas alguns derivados semissintéticos das penicilinas e cefalosporinas. A ligação às proteínas plasmáticas é variável (15% a 100%), mas somente a forma livre é ativa. Tem distribuição corporal ampla, atingindo concentrações adequadas na maioria dos tecidos, incluindo bile, líquido sinovial, entre outros. Atravessa a barreira transplacentária, mas não atravessa a barreira hematoencefálica não inflamada. Quando há inflamação das meninges, a penetração aumenta de três a dez vezes, possibilitando o tratamento com alguns compostos como cloxacilina, ceftriaxona, ceftazidima e meropenem. Como são pouco lipofílicos, a penetração intracelular dos β -lactâmicos é escassa e nunca atinge mais que 25% a 50% da concentração sérica, sendo esses antimicrobianos pouco usados contra infecções intracelulares (ROBERTS; LIPMAN, 2007).

O metabolismo é praticamente nulo, sendo excretados pelos rins em sua forma ativa, por filtração glomerular ou excreção tubular. Alguns como cefoperazona e ceftriaxona são excretados predominantemente pela via biliar. Poucos β -lactâmicos são metabolizados antes da excreção, por desacetilação (cefalotina e cefotaxima) ou inativadas pelas hidroxipeptidases renais (imipenem) (SUAREZ; GUDIOL, 2009; ROBERTS; LIPMAN, 2007).

Quanto às características farmacodinâmicas (pD), os β -lactâmicos são antimicrobianos de atividade bactericida lenta, relativamente independente da concentração plasmática alcançada, sempre que essa excede a CIM. Para a maioria dos micro-organismos sensíveis, o β -lactâmico se comporta como bactericida porque a concentração bactericida mínima (CBM) é muito próxima da CIM. Nas cepas chamadas tolerantes (CBM 32 x maior que CIM), o β -lactâmico se comporta

como bacteriostático. A seleção de cepas resistentes durante o tratamento é muito maior quando a concentração atingida é maior que a CIM, porém menor que a CBM (SUAREZ; GUDIOL, 2009).

O índice farmacocinético e farmacodinâmico (pK/pD) que mais se relaciona com a eficácia clínica dos β -lactâmicos é o Tempo (T) que a concentração do antimicrobiano se mantém acima da CIM ($T > CIM$). O valor ótimo de $T > CIM$ varia com o antimicrobiano, com o micro-organismo e o paciente. Para a maioria das infecções, se considera ótimo $T > CIM = 40\%$ a 50% do tempo. No entanto, em pacientes neutropênicos, com meningite ou com micro-organismos intrinsecamente resistentes (como *Pseudomonas aeruginosa*), recomendam-se valores maiores que 60% , inclusive próximos a 100% . Os β -lactâmicos quase não apresentam efeito pós-antimicrobiano (EPA) (atividade com concentração menor que a CIM) em Gram-positivos (2 horas) e menor ainda em Gram-negativos, com exceção dos carbapenêmicos em infecções por *P. aeruginosa* (MOUTON; PUNT, 2001; MOUTON, 2002).

A ação dependente do tempo, característica dos antimicrobianos β -lactâmicos, junto à meia vida curta, define a posologia, que deve ser administrada várias vezes para manter a concentração ótima do antimicrobiano. Quanto maior a CIM do micro-organismo, mais difícil será manter a concentração acima da CIM pelo tempo necessário (ROBERTS *et al.*, 2007).

Assim, quando a CIM é baixa, os parâmetros farmacodinâmicos são atingidos com doses usuais do antimicrobiano, porém, com CIM mais elevadas, é difícil manter a concentração ideal. Nesse caso, a administração em infusão contínua ou prolongada é uma alternativa para atingir as concentrações pelo tempo necessário. Além disso, essa forma de administração pode reduzir a seleção das cepas resistentes. Muitos estudos vêm sendo publicados sobre a eficácia dessa forma de administração, principalmente em infecções por *P. aeruginosa* ou cepas produtoras de ESBL. Porém, os resultados clínicos obtidos nos estudos ainda são bastante controversos (MOUTON; VINKS, 2007; ROBERTS *et al.*, 2007; ROBERTS *et al.*, 2009).

Como os β -lactâmicos agem durante a divisão bacteriana, sua atividade bactericida é menor no tratamento de abscessos, em que muitos micro-organismos estão na fase estacionária. Também em infecções com grande inóculo bacteriano, especialmente por Gram-negativos, como pneumonias, o efeito dos β -lactâmicos

pode ser inferior e propiciar a seleção de cepas resistentes. A combinação com aminoglicosídeos pode ser sinérgica em Gram-positivos (estafilococos, estreptococos, enterococos) e Gram-negativos (especialmente *P. aeruginosa*), além de diminuir a seleção de resistentes. A questão do tratamento combinado ainda é controversa, e embora algumas indicações estejam bem estabelecidas (como para o tratamento de endocardites), outras são discutíveis, como a sepse grave e neutropenia febril (SUAREZ; GUDIOL, 2009).

2.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS

As bactérias podem desenvolver resistência aos β -lactâmicos basicamente por quatro mecanismos diferentes, que podem estar sozinhos ou associados entre si ou, ainda, associados a outros mecanismos de resistência a diferentes antimicrobianos (BABIC; HUJER; BONOMO, 2006; SHAHID *et al.*, 2009). São eles:

- a) produção de β -lactamases;
- b) modificações nas PBPs;
- c) alterações da permeabilidade;
- d) hiperexpressão de bombas de efluxo de antimicrobianos.

A produção de β -lactamases é o mecanismo de resistência mais comum e de maior importância em bactérias gram-negativas e será o foco deste trabalho.

As modificações em PBPs podem ser por mutações, hiperexpressão ou redução da afinidade. Todas essas modificações reduzem a atividade do antimicrobiano β -lactâmico na inibição da síntese da parede celular, conferindo resistência a esses agentes. É um mecanismo muito importante em Gram-positivos como *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina, e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Na maioria dos Gram-negativos a mutação em PBPs tem menor importância que os demais mecanismos (SAUVAGE *et al.*, 2008).

A redução da expressão de proteínas da membrana externa (PMEs) é outro mecanismo de resistência. Para acessar as PBPs no interior da membrana plasmática, os β -lactâmicos devem se difundir na parede (o que é muito difícil, já que são moléculas pouco lipofílicas) ou atravessar canais chamados de porinas. Algumas enterobactérias, por exemplo, *Enterobacter spp.*, *K. pneumoniae* e *E. coli*, apresentam resistência aos carbapenêmicos devido à perda destas PMEs. A perda de porinas também está associada à resistência ao imipenem e meropenem em

P. aeruginosa e *Acinetobacter baumannii* (LIVERMORE, 2001; JACOBY; MILLS; CHOW, 2004; BABIC; HUJER; BONOMO, 2006). As mutações pontuais ou a presença de sequências de inserção nos genes que codificam as porinas podem produzir proteínas com função diminuída e, portanto, resultar em menor permeabilidade aos antimicrobianos. Na maioria dos casos, no entanto, apenas a deficiência da porina não é suficiente para produzir o fenótipo de resistência, sendo normalmente encontrada combinada à produção de β -lactamases (POOLE, 2004b).

As bombas de efluxo são capazes de exportar uma grande variedade de substratos do periplasma para o meio ambiente. Essas bombas são um importante determinante da multirresistência em muitos micro-organismos Gram-negativos, especialmente *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.. Funcionam expulsando os antimicrobianos do espaço periplásmico para fora da célula, conferindo resistência à bactéria. As bombas de efluxo podem estar associadas a β -lactamases como a OXA-23, aumentando a resistência bacteriana (LIVERMORE, 2001; POOLE, 2004a; SHAHID *et al.*, 2009).

2.4 β -LACTAMASES

As β -lactamases são enzimas bacterianas que hidrolisam o anel β -lactâmico e inativam os antimicrobianos que contêm esse anel, antes que eles atinjam seu sítio de atividade, as PBPs (BABIC; HUJER; BONOMO, 2006). Elas foram designadas pelo Comitê de Nomenclatura Internacional em Bioquímica (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry*) como enzimas que hidrolisam amidas, amidinas ou outras pontes C-N, clivando as amidas cíclicas do anel β -lactâmico (LIVERMORE, 1995). O parentesco estrutural que as β -lactamases compartilham com as PBPs permite a essas enzimas ligar, acilar, hidrolisar e assim inativar os β -lactâmicos (BABIC; HUJER; BONOMO, 2006). Algumas β -lactamases possuem zinco no sítio ativo para realizar a reação, mas a maioria age via éster de serina, como o mecanismo representado na FIGURA 2.

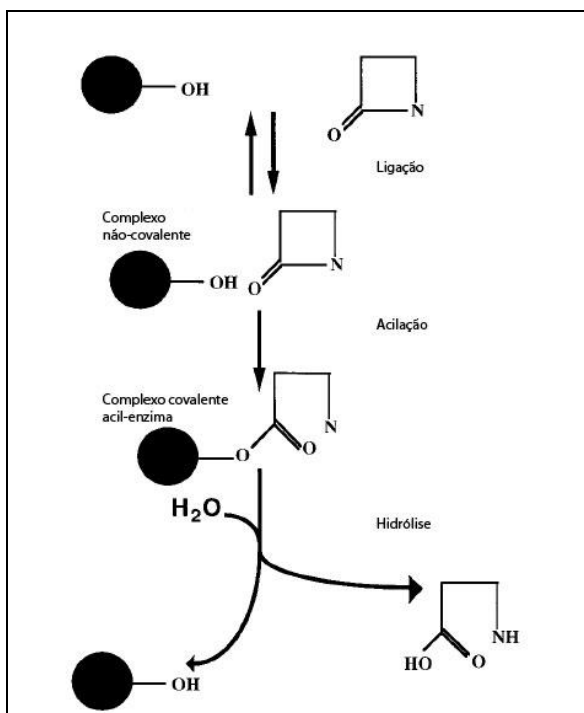


FIGURA 2 – MECANISMO DE AÇÃO DAS β -LACTAMASES COM SERINA NO SÍTIO ATIVO.
 FONTE: adaptado de LIVERMORE (1995).

Primeiramente, a enzima associa-se de forma não covalente ao anel β -lactâmico do antimicrobiano. Então, a radical hidroxila, livre do resíduo de serina presente no sítio ativo da enzima, ataca o anel β -lactâmico, formando uma ligação covalente acil-éster. A hidrólise do éster formado libera a enzima ativa e os antimicrobianos hidrolisados e inativos. No caso das metalo- β -lactamases, o ataque ao anel β -lactâmico é feito pelo zinco presente no sítio ativo da enzima (LIVERMORE, 1995).

As β -lactamases são codificadas por genes chamados *bla*, que podem estar presentes no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos. A expressão dos genes *bla* pode ser induzida pela presença dos β -lactâmicos ou estar continuamente ativada. Assim, as β -lactamases podem estar presentes de forma induzível ou constitutiva (LIVERMORE, 1995).

A atividade das β -lactamases e sua capacidade de conferir resistência a um determinado antimicrobiano dependem da localização da β -lactamase, da quantidade produzida, das condições do meio para atividade enzimática e também da velocidade com que degrada o antimicrobiano (cinética) (LIVERMORE, 1995).

2.4.1 Histórico das β -lactamases

As β -lactamases foram reconhecidas em 1940, antes do uso clínico da penicilina ter sido reconhecido, com a observação de que *E. coli* poderia inativar essa droga. O fato levou Fleming a pensar na possibilidade da emergência da resistência e pedir que o uso da penicilina fosse cauteloso, mas esse conselho foi esquecido com a euforia causada pela nova droga que revolucionou a medicina. Dessa forma, a penicilina foi usada imprudentemente em feridas, o que selecionou as primeiras cepas de *Staphylococcus* resistentes devido à produção de penicilinases (LIVERMORE, 2009a).

A primeira β -lactamase mediada por plasmídeos foi descrita em 1965 em uma cepa de *E. coli*, sendo chamada TEM (ANDERSON; DATTA, 1965). A localização desses genes em plasmídeos e transposons facilitou sua disseminação entre diferentes espécies de enterobactérias, além de *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (HEDGES; MATTHEW, 1979; MATTHEW, 1979). Muitas β -lactamases cromossômicas de algumas espécies começaram a aparecer em plasmídeos de outras espécies bacterianas, como a SHV-1 de *K. pneumoniae*, que pode estar presente em plasmídeo de *E. coli*, mostrando a grande capacidade de mobilização desses genes (DE CHAMPS *et al.*, 1989).

Com isso, a indústria farmacêutica passou a desenvolver novos antimicrobianos β -lactâmicos, que não fossem inativados pelas β -lactamases. Com essa finalidade três estratégias principais foram utilizadas:

- a) adição de grupos que impediam a hidrólise por β -lactamases;
- b) descoberta de outros grupos com atividade semelhante, mas que não fossem hidrolisados;
- c) o uso de inibidores de β -lactamases associados aos β -lactâmicos (LIVERMORE, 2009a).

Porém, com o uso abusivo desses novos β -lactâmicos, novas β -lactamases emergiram, e por serem a principal causa de resistência em micro-organismos Gram-negativos, foram alvo de extensos estudos microbiológicos, genéticos e bioquímicos. Hoje, já são conhecidas mais de 900 β -lactamases (<<http://www.lahey.org/studies/>>) e para facilitar o estudo várias classificações foram propostas, sendo duas delas mais importantes e descritas a seguir.

2.4.2 Classificação das β -lactamases

Devido à diversidade de características enzimáticas e do grande número de β -lactamases descobertas, várias tentativas foram feitas para categorizá-las desde o final de 1960. As classificações envolvem duas abordagens principais, características bioquímicas e funcionais ou estrutura molecular da enzima. Na classificação funcional, vários critérios são utilizados, inclusive o espectro de substratos, inibição da enzima, perfil de velocidade de hidrólise (V_{max}), afinidade de ligação (K_m), focalização isoelétrica (pI), composição de aminoácidos e peso molecular (BUSH, 1989a). A classificação molecular de β -lactamases baseia-se nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos dessas enzimas (AMBLER, 1980).

A classificação molecular foi proposta por Ambler em 1980 e inclui todas as β -lactamases descritas em quatro grupos, denominados A, B, C e D. Pode ser correlacionada com a classificação funcional e a principal diferença entre os grupos é que as classes A, C e D agem por um mecanismo baseado em serina, enquanto a classe B ou metalo- β -lactamases usam um átomo de zinco para sua ação. Alguns autores propuseram a subdivisão das metalo- β -lactamases (grupo B) devido às diferenças estruturais encontradas (FRERE *et al.*, 2005; HALL; BARLOW, 2005).

A primeira classificação funcional foi proposta por Jack e Richmond em 1970 (JACK; RICHMOND, 1970) e expandida por Richmond e Sykes em 1973 (RICHMOND; SYKES, 1973). Esse esquema foi baseado na velocidade de hidrólise da penicilina e da cefaloridina, e inibição da atividade por cloxacilina e/ou p-cloromercuribenzoato. Em 1989, uma nova e maior reorganização foi proposta por Bush (BUSH, 1989c; b), a mesma foi atualizada por Bush, Jacoby e Medeiros em 1995 (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995) e reatualizada por Bush e Jacoby em 2009 (BUSH; JACOBY, 2010). Essa classificação é a mais utilizada e está representada no QUADRO 2.

Nessa classificação, o grupo 1 é o grupo das cefalosporinas. As enzimas desse grupo pertencem à classe molecular C e são codificadas nos cromossomos de muitas Enterobacteriaceae e alguns outros micro-organismos. São mais ativas contra cefalosporinas que contra a benzilpenicilina, geralmente são resistentes à inibição por ácido clavulânico e são ativas contra cefamicinas, como a cefoxitina. No subgrupo 1c estão variantes com maior atividade contra ceftazidima e outros oximino- β -lactâmicos como resultado de mutações. Essas variantes foram

denominadas β -lactamases AmpC de espectro ampliado (ESAC) (BUSH; JACOBY, 2010).

No grupo 2 estão classificadas as serina β -lactamases das classes moleculares A e D, que representam o maior grupo de β -lactamases. O subgrupo 2a corresponde às penicilinases com um espectro limitado de hidrólise, que são o tipo predominante em cocos Gram-positivos. As penicilinases são inibidas por ácido clavulânico e podem ser cromossômicas ou codificadas em plasmídeos. O subgrupo 2b corresponde às β -lactamases que hidrolisam penicilinas e cefalosporinas, são fortemente inibidas por ácido clavulânico e mediadas por plasmídeos. O subgrupo 2be compreende as ESBLs. Essas enzimas de amplo espectro mantêm a atividade contra as penicilinas e cefalosporinas do subgrupo 2b e, além disso, hidrolisam um ou mais oximino- β -lactâmico, como a ceftazidima, cefotaxima e aztreonam. Permanecem sensíveis à inibição por ácido clavulânico, um recurso usado na detecção por laboratórios de análises clínicas (BUSH; JACOBY, 2010).

A β -lactamase cromossômica de *Klebsiella oxytoca*, pertencente à classe A (*bla_{OXY}*), foi classificada no grupo 2be na classificação de 1995 (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995), mas não foi incluída na classificação atual (BUSH; JACOBY, 2010). Essa β -lactamase, primeiramente chamada de K1 ou KOXY, é constitutivamente expressa em baixos níveis, que conferem resistência a amino e carboxipenicilinas, permanecendo sensíveis a outros β -lactâmicos como cefalosporinas, monobactâmicos e combinações com inibidores de β -lactamases. No entanto, a hiperprodução de OXY, que geralmente é devida a mutações na região promotora do gene, confere resistência a todas as penicilinas (exceto temocilina), combinações de penicilinas e ácido clavulânico, cefalosporinas de espectro restrito, aztreonam e, ainda, sensibilidade reduzida à cefotaxima e ceftriaxona, sem afetar a ceftazidima (FEVRE *et al.*, 2005). Também já foi encontrada em plasmídeos obtidos de amostras de *K. oxytoca* e *K. pneumoniae* (GONZALES-LOPEZ *et al.*, 2009).

O subgrupo 2br é composto por β -lactamases de espectro restrito, resistentes ao ácido clavulânico e inibidores relacionados. O subgrupo 2ber são β -lactamases de amplo espectro que adquiriram resistência aos inibidores (BABIC; HUJER; BONOMO, 2006).

As enzimas do subgrupo 2c são caracterizadas por sua capacidade de hidrolisar carbenicilina ou ticarcilina tão rapidamente quanto benzilpenicilina, enquanto que a cloxacilina ou oxacilina são hidrolisadas a taxas inferiores a metade

da observada para benzilpenicilina. Essas penicilinas são geralmente inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam. O subgrupo 2ce contém β -lactamases descritas recentemente, com a expansão de atividade contra cefepime e cefpiroma (POTRON *et al.*, 2009; BUSH; JACOBY, 2010).

Grupo funcional	Classe molecular	Substratos	Inibido AC/ TZB	Inibido EDTA	Características	Enzimas
1	C	CEF	Não	Não	Hidrólise CEF>PEN. Hidrólise de cefamicinas	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1c	C	CEF	Não	Não	Maior hidrólise de CAZ e outras AE-CEF	GC1, CMY-37
2a	A	PEN	Sim	Não	Hidrólise de PEN>CEF	PC1
2b	A	PEN; CEF	Sim	Não	Hidrólise CEF=PEN	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	AE-CEF, MBT	Sim	Não	Maior hidrólise de AE-CEF e MBT	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	PEN	Não	Não	Resistente a AC, SUB, TZB	TEM-30, SHV-10
2ber	A	AE-CEF, MBT	Não	Não	Maior hidrólise de AE-CEF e MBT. Resistente a AC, SUB, TZB	TEM-50
2c	A	CAR	Sim	Não	Maior hidrólise de CAR	PSE-1, CARB-3
2ce	A	CAR, FEP	Sim	Não	Maior hidrólise de CAR e FEP	RTG-4
2d	D	CLX	V	Não	Maior hidrólise de CLX e OXA	OXA-1, OXA-10
2de	D	AE-CEF	V	Não	Hidrólise de CLX, OXA e AE-CEF	OXA-11, OXA-15
2df	D	CAR	V	Não	Hidrólise de CLX, OXA e CAR	OXA-23, OXA-48
2e	A	AE-CEF	Sim	Não	Hidrólise AE-CEF, mas não MBT. Inibido por AC	CepA
2f	A	CRB	V	Não	Maior hidrólise de CRB, AE-CEF e cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B(B1) B(B3)	CRB	Não	Sim	Hidrólise de AE-CEF e CRB, não MBT	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B(B2)	CRB	Não	Sim	CRB	CphA, Sfh-1
NI	NC					

QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DAS β -LACTAMASES.

FONTE: adaptado de BUSH; JACOBY (2010).

NOTA: CEF = cefalosporinas; AE-CEF = cefalosporinas de amplo espectro; PEN = penicilinas; CAR = carbenicilina; CLX = cloxacilina; MBT = monobactâmicos; CAZ = ceftadizima; FEP = cefepime; CRB = carbapenêmicos; OXA = oxacilina; AC = ácido clavulânico; TZB = tazobactam; SUB = subactam.

O subgrupo 2d inclui β -lactamases que possuem capacidade de hidrolisar cloxacilina ou oxacilina melhor que a benzilpenicilina e, portanto, são conhecidas como enzimas OXA. No subgrupo 2de estão as novas oxacilinases com um espectro ampliado, que inclui oximino- β -lactâmicos, mas não carbapenêmicos. O novo subgrupo 2df de β -lactamases são enzimas OXA que hidrolisam carbapenêmicos e que foram divididas em nove grupos de acordo com a homologia de aminoácidos (BUSH; JACOBY, 2010).

O subgrupo 2e corresponde às cefalosporinases que possuem a capacidade de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro e são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam. A cefalosporinases cromossômicas induzíveis, presentes em Proteae, pertencem a esse subgrupo. Elas podem ser confundidas com o grupo AmpC ou com ESBLs, porque elas podem ser encontradas nos mesmos micro-organismos e apresentar perfis de resistência comparáveis. O subgrupo 2f representa carbapenemases da classe molecular A e os carbapenêmicos são os substratos distintivos. Essas enzimas podem ser melhor inibidas pelo tazobactam do que pelo ácido clavulânico (BUSH; JACOBY, 2010).

No grupo 3 estão as metalo- β -lactamases (M β LS). Diferem estruturalmente das outras β -lactamases pela presença de um íon de zinco no sítio ativo. As M β LS têm uma fraca afinidade pelos monobactâmicos e não são inibidas pelo ácido clavulânico ou tazobactam. Em vez disso, eles são inibidas por quelantes de íons metálicos, tais como ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Podem ser subdivididos com base na estrutura em subclasses B1, B2 e B3, ou com base na função em subgrupos 3a, 3b e 3c. Devido à similaridade o grupo 3c foi incluído no 3a pelos autores da classificação atual (BUSH; JACOBY, 2010).

2.5 β -LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO (ESBL)

2.5.1 Origem e evolução

O primeiro isolado clínico, expressando ESBL, foi identificado por Knothe, na Alemanha, em 1983 (KNOTHE *et al.*, 1983). A prevalência, assim como os tipos de ESBL, aumentou no decorrer dos anos. Atualmente, o número de ESBLs caracterizadas já passa de 250, sendo que as pesquisas têm origem em mais de 30

países do mundo, o que demonstra a ampla distribuição dessas enzimas (PATERSON; BONOMO, 2005; GNIADKOWSKI, 2008).

As primeiras ESBLs descritas eram derivadas de β -lactamases do tipo TEM e SHV, a partir de mutações em seu sítio ativo. Essas β -lactamases eram importantes apenas no ambiente hospitalar (BRADFORD, 2001). Da mesma forma, as ESBLs do tipo OXA são derivadas de OXA não ESBLs por mutações (NAAS; NORDMANN, 1999).

Há alguns anos, aumentou a importância do grupo CTX-M que, ao contrário das primeiras ESBLs descritas, não são derivadas de β -lactamases de espectro restrito (LIVERMORE *et al.*, 2007). Além dos grupos principais citados anteriormente, outros foram descritos com menor frequência, como PER, VEB, GES, TLA, BES (NAAS; POIREL; NORDMANN, 2008). O grupo das ESBLs foi o grupo de β -lactamases que teve maior número de novas enzimas descritas nos últimos anos (BUSH; JACOBY, 2010).

Além da disseminação de novos tipos, as ESBLs atualmente são encontradas com frequência cada vez maior em infecções comunitárias (LIVERMORE *et al.*, 2007).

A pressão seletiva que favorece a evolução das ESBLs tem sido atribuída ao intenso uso de oximino-cefalosporinas. As ESBLs, frequentemente, demonstram preferência por diferentes oximino-cefalosporinas, sendo a seleção de uma variante em um hospital atribuída ao padrão específico do uso de antimicrobianos nessa instituição (GNIADKOWSKI, 2008).

2.5.2 Definição de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL)

A maioria das ESBLs pertence à classe molecular A de Ambler (AMBLER, 1980). As enzimas da classe A são caracterizadas por possuírem serina no sítio ativo e terem massa molecular de aproximadamente 29 KDa.

Na classificação funcional de Bush e Jacoby, a maioria das ESBLs situa-se no grupo 2be. São capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas (incluindo as de amplo espectro) e monobactâmicos. As mutações no sítio ativo, que as tornam capazes de degradar antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro, fazem com que não sejam tão eficientes na hidrólise de penicilinas quanto as enzimas originais. Além disso, essas mutações resultam no aumento da suscetibilidade dessas

enzimas aos inibidores de β -lactamases. As ESBLs não são ativas contra cefamicinas, e muitas cepas são suscetíveis à cefoxitina e cefotetan. No entanto, cepas produtoras de ESBL podem ser resistentes a cefamicinas quando a permeabilidade estiver diminuída, devido à menor quantidade de porinas na membrana. Também não são capazes de degradar carbapenêmicos, permanecendo suscetíveis a esse grupo de antimicrobianos, a não ser que possua outro mecanismo de resistência associado (BUSH; JACOBY, 2010).

A propriedade que diferencia as ESBLs das β -lactamases do tipo AmpC (grupo 1), encontradas em algumas enterobactérias, como *Enterobacter cloacae* e que também hidrolisam cefalosporinas de terceira geração, é a inibição por ácido clavulânico. Além disso, as ESBLs hidrolisam cefalosporinas de quarta geração, enquanto que as β -lactamases AmpC, em geral, não o fazem (PATERSON; BONOMO, 2005).

Existem também outros grupos de β -lactamases com características comuns às ESBLs, como 2d, 2e e 2f, que hidrolisam cefalosporinas e são inibidas por ácido clavulânico. No entanto, o grupo 2e (por exemplo, cefalosporinase induzível de *Proteus vulgaris*) hidrolisa cefotaxima, mas não tem boa atividade contra penicilina e aztreonam. Já o grupo 2f (por exemplo, *Sme* de *Serratia marcescens*) tem atividade contra carbapenêmicos e é fracamente inibido pelo ácido clavulânico (PATERSON; BONOMO, 2005). Mas, apesar das diferenças citadas e da classificação funcional em grupos distintos entre as ESBLs e outras β -lactamases, todas possuem o espectro de atividade estendido, sendo capazes de hidrolizar β -lactâmicos de amplo espectro. Na verdade, aproximadamente 1/3 das β -lactamases identificadas são hábeis em hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam (GISKE *et al.*, 2009).

Com isso, a definição de ESBL vem sendo discutida nos últimos 20 anos. Nenhuma definição é perfeita, mas tentando deixar mais compreensível e menos pragmática, uma definição foi proposta durante a conferência ESCMIC (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*):

ESBL é uma β -lactamase, ordinariamente adquirida e não inerente às espécies, que podem hidrolisar rapidamente, ou conferir resistência a oximino-cefalosporinas (não carbapenêmicos) ou, uma β -lactamase mutante, dentro de uma família que tenha habilidade em fazê-lo (LIVERMORE, 2008).

Por outro lado, a classificação atual de β -lactamases, com alto nível de complexidade e subdivisões propostas pelos pesquisadores, tem tornado esse conhecimento inacessível aos clínicos e aos profissionais de controle de infecção hospitalar. Dessa forma, alguns pesquisadores têm proposto uma classificação mais simples, para facilitar a compreensão das diversas β -lactamases de importância clínica. A nova classificação propõe a expansão da definição de ESBL a outras β -lactamases adquiridas com importância clínica e com atividade contra cefalosporinas de amplo espectro e/ou carbapenêmicos. Assim, as ESBLs clássicas do grupo A seriam classificadas como ESBL_A, as β -lactamases do tipo AmpC e OXA seriam classificadas como ESBL miscelâneas, ou seja, ESBL_M. Por último, as carbapenemases seriam designadas ESBL_{CARBA}. Os autores da nova classificação acreditam que essa simplificação encorajaria o estudo e contribuiria na redução da disseminação dessas β -lactamases (GISKE *et al.*, 2009).

2.5.3 Tipos de ESBLs

Muitas ESBLs são derivadas dos tipos TEM ou SHV, porém, recentemente, uma grande expansão de ESBLs do tipo CTX-M transformou esse tipo no mais amplamente distribuído, como também no tipo predominante em muitas regiões do mundo (LIVERMORE, 2008). Outras ESBLs menos frequentes incluem os tipos SFO, BES, BEL, TLA, GES, PER e VEB. Essas ESBLs, assim como o grupo CTX-M, não são originadas de outras β -lactamases já conhecidas, por mutações ponto. Além disso, as ESBLs apresentam ampla distribuição geográfica, como pode ser observado no QUADRO 3 (NAAS; POIREL; NORDMANN, 2008).

β -lactamase	Ano descrição	Número de variantes ESBLs	Origem do nome
“Primeiras ESBLs” Tipo SHV Tipo TEM	1983 1985	>45 >100	Sulphhydryl variable Temoniera (nome do paciente)
“Nova ESBL” Tipo CTX-M	1989	103	Cefotaximase – Munich
“ESBLs infrequentes” SFO-1 TLA-1 PER VEB BES-1 GES BEL-1 TLA-2	1988 1991 1991 1996 1996 1998 2005 2005	1 1 7 7 1 17 1 1	Serratia fonticola Tlahuicas (tribo Indiana) <i>Pseudomas</i> resistência estendida Vietnam espectro ampliado Brasileira ESBL Guiana ESBL Belgica ESBL 51% similar TLA-1
“OXA ESBLs” OXA	1991	18	Hidrólise oxacilina > penicilina

QUADRO 3 – B-LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO MEDIADAS POR PLASMÍDEOS.

Fonte: adaptado de NAAS; POIREL; NORDMANN (2008).

Nota: número de variantes atualizado de acordo com <<http://www.lahey.org/studies>> em 07/01/2011.

2.5.3.1 ESBLs do tipo TEM

As ESBLs do tipo TEM são derivadas de TEM-1 e TEM-2. TEM-1 foi a primeira enzima do grupo a ser descrita, em Atenas, na Grécia, e recebeu esse nome por ter sido isolada de uma paciente chamada Temoniera (DATTA; KONTOMICHALOU, 1965). Mutações na sequência de aminoácidos da enzima TEM-1 levaram ao surgimento de muitas variantes e, atualmente, mais de 180 β -lactamases do tipo TEM foram identificadas, a maioria delas com fenótipo ESBL (aproximadamente 110). As outras variantes de TEM apresentam-se como β -lactamases do grupo 2b, do grupo 2br ou, ainda, resistentes à ação de inibidores, também chamadas IRT (*inhibitor resistant TEM*) (<<http://www.lahey.org/studies/>>). As substituições de aminoácidos são variadas, mas ocorrem em número limitado de posições. As combinações dessas trocas de aminoácidos resultam em várias alterações sutis nos fenótipos das ESBLs, como a habilidade de hidrolisar oximino-cefalosporinas específicas, como cefotaxima e ceftazidima, ou mudanças no ponto isoelétrico que varia entre 5,2 e 6,5 (BRADFORD, 2001; GNIADKOWSKI, 2008).

Apesar de β -lactamases do tipo TEM serem encontradas com maior frequência em *E. coli* e *K. pneumoniae*, também já foram descritas em várias

espécies de Gram-negativos, inclusive não enterobactérias, como *P. aeruginosa* (GALDBART *et al.*, 2000; PAGANI *et al.*, 2002; BERTRAND *et al.*, 2003).

Os genes *bla*_{TEM} podem se disseminar por três tipos de transposons já identificados, Tn1, Tn2 e Tn3 (PARTRIDGE; HALL, 2005). Nunca foram identificados dentro de integrons, provavelmente por não estarem associados a características compatíveis com a formação de um gene cassete (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2008).

2.5.3.2 ESBLs do tipo SHV

Os nomes dessas enzimas provêm de um experimento em que a inibição da atividade da enzima pelo p-cloromercuriobenzoato variava de acordo com o substrato usado, sendo a enzima chamada de sulfidril-variável. Porém, o experimento nunca foi confirmado com o extrato purificado da enzima. O tipo SHV-1 é o mais comum em *K. pneumoniae*, sendo o principal responsável pela resistência intrínseca à ampicilina nessa espécie (PATERSON; BONOMO, 2005).

O tipo SHV possui mais de 130 variantes, sendo aproximadamente 50 já definidas como ESBLs. As mutações que originam as variantes ocorrem em poucas posições nos genes estruturais (<<http://www.lahey.org/studies/>>). Algumas substituições são essenciais para a hidrólise de ceftazidima e outras para a hidrólise de cefotaxima (GNIADKOWSKI, 2008).

A maioria das enzimas do tipo SHV é encontrada em cepas de *K. pneumoniae* (CORKILL *et al.*, 2001). No entanto, também podem ser encontradas em outras enterobactérias e *P. aeruginosa* (BRADFORD, 2001; WU *et al.*, 2003).

Poucos estudos têm investigado a aquisição genética dos genes *bla*_{SHV}, apesar do conhecimento de que esses genes originam-se a partir do cromossomo de *K. pneumoniae* e são comuns em bactérias gram-negativas, espalhadas em todo o mundo. Como as ESBLs SHV são resultantes de mutações de ponto no gene original, não é surpreendente que alguns fragmentos de DNA originários do cromossomo de *K. pneumoniae* sejam encontrados nas proximidades dos genes *bla*_{SHV} (MIRIAGOU *et al.*, 2005). Em vários isolados de enterobactérias e *P. aeruginosa*, apenas um único elemento IS26 foi identificado a montante do gene *bla*_{SHV}, sendo provável que IS26 seja um elemento-chave na aquisição de genes

bla_{SHV} (POIREL; NAAS; FORD; AVISON, 2004; NORDMANN, 2008). Como acontece com os genes *bla_{TEM}*, o gene *bla_{SHV}* nunca foi identificado no interior de integrons (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2008).

2.5.3.3 ESBLs do tipo CTX-M

As β -lactamases CTX-M foram inicialmente reportadas na segunda metade dos anos 80 do século XX como enzimas, não TEM e não SHV, capazes de hidrolizar cefalosporinas de amplo espectro (ESBL) e que, por apresentarem alto nível de resistência à cefotaxima, maior que ceftazidima, foi chamada CTX-M (MATSUMOTO *et al.*, 1988). Rapidamente surgiram variantes dessas ESBLs na França, Japão e Argentina (BARTHELEMY *et al.*, 1992; BERNARD *et al.*, 1992; GNIADKOWSKI; SCHNEIDER *et al.*, 1998) e sua disseminação entre as espécies bacterianas e entre os diferentes países tem aumentado dramaticamente desde 1995 (BONNET, 2004).

Elas existem em espécies do ambiente do gênero *Kluyvera* (HUMENIUK *et al.*, 2002; POIREL; GNIADKOWSKI; NORDMANN, 2002) e o aumento no uso de ceftriaxona e cefotaxima tem sido proposto como a razão para emergência de enzimas CTX-M. Atualmente, foram descritas mais de 100 ESBLs do tipo CTX-M, que são agora endêmicas em muitos países, com emergência hospitalar e comunitária (LIVERMORE *et al.*, 2007). A diversidade de enzimas CTX-M é notada especialmente na Europa Oriental e Ocidental, Oriente (Japão) e América do Sul. Alguns estudos mostram que já é a ESBL prevalente no mundo. A emergência de novas ESBLs do tipo CTX-M em muitos países é oposta à transferência de CTX-M entre países, e sugere surgimento de novas enzimas (GOVINDEN; MOCKTAR, 2007).

As enzimas CTX-M podem ser subclassificadas com base em sua sequência de aminoácidos. Estudos filogenéticos revelam seis grupos maiores de enzimas CTX-M (os membros de cada grupo mostram identidade > 94 entre si e < 90% entre os grupos), sendo o nome de cada grupo definido de acordo com a primeira enzima descrita, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 e CTX-M-45 (ROSSOLINI; D'ANDREA; MUGNAIOLI, 2008).

Enzimas CTX-M naturais contém 291 resíduos aminoácidos e massa molecular em torno de 28 KDa, com exceção das enzimas Toho-2, que possuem dois resíduos de aminoácidos a menos. O ponto isoelétrico varia entre 7,4 e 9,0 e as constantes cinéticas (K_{cat} e K_m) das enzimas CTX-M purificadas variam muito com o substrato (BONNET, 2004; ROSSOLINI; D'ANDREA; MUGNAIOLI, 2008). São menos eficientes contra penicilinas e a maior atividade hidrolítica é obtida contra cefalosporinas de menor espectro. A atividade contra cefotaxima é geralmente 35 vezes maior quando as enzimas são comparadas à ceftazidima, e exibem atividade hidrolítica significativa contra cefepime e cefpirome. São sensíveis aos inibidores de β -lactamases, sendo o tazobactam mais ativo que o ácido clavulânico (BONNET, 2004).

Em isolados clínicos, genes que codificam CTX-M são comumente localizados em plasmídeos, cujo tamanho varia de 7 a 160 kb. Genes bla_{TEM-1} frequentemente coexistem no mesmo plasmídeo que bla_{CTX-M} e associações de bla_{CTX-M} com bla_{TEM-2} , bla_{OXA-1} e bla_{SHV} também podem ser encontradas (BONNET, 2004).

Genes bla_{CTX-M} idênticos foram encontrados em suporte genético diferente, em isolados bacterianos de uma mesma região geográfica e tempo, o que sugere que os genes bla_{CTX-M} têm mobilidade entre plasmídeos e plasmídeo-cromossomo (BONNET *et al.*, 2000b). Sequências de inserção $ISEcp1$ ou semelhantes a $ISEcp1$ podem ser repetidamente observadas de 42 a 266 bp a montante das ORFs que codificam CTX-M-1; CTX-M-2; CTX-M-3; CTX-M-9; CTX-M-13; CTX-M-14; CTX-M-15; CTX-M-17; CTX-M-19; CTX-M-20; CTX-M-21 (BONNET, 2004).

2.5.3.4 ESBLs do tipo PER

A ESBL do tipo PER-1 foi inicialmente detectada em 1993, em uma cepa de *P. aeruginosa* isolada na França em um paciente da Turquia (NORDMANN *et al.*, 1993). Essa enzima é pouco relacionada com outras ESBLs e confere resistência às penicilinas, cefotaxima, ceftazidima e aztreonam, mas poupa carbapenêmicos e cefamicinas. A sua atividade pode ser inibida por clavulonato, sulbactam e tazobactam. Muitas enzimas, com diferenças significativas na sequência (40%), foram identificadas como pertencentes à “família semelhante à PER”, como PER-2,

VEB-1, TLA-1 e CME-1 cromossômica de *Cryseobacterium meningosepticum* (TRANIER *et al.*, 2000).

Os organismos expressando PER-1 têm sido encontrados predominantemente na Turquia (KOLAYLI *et al.*, 2005), mas ocorreram também na Itália (DOCQUIER *et al.*, 2001; PAGANI *et al.*, 2004), França, Espanha e Japão, podendo ser encontradas em não fermentadores e enterobactérias (NAAS; POIREL; NORDMANN, 2008).

Uma enzima relacionada, PER-2, que tem 86% de homologia com PER-1, foi encontrada em *Salmonella enterica serovar Typhimurium* isolada na Argentina, em 1996 (BAUERNFEIND *et al.*, 1996b), e depois em outras bactérias gram-negativas, incluindo *Salmonella enterica serovar Sftenberger*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Vibrio cholerae*, e recentemente *A. baumannii* (QUINTEROS *et al.*, 2003; VIGNOLI *et al.*, 2005; CELENZA *et al.*, 2006; PASTERAN *et al.*, 2006). Elas são restritas, por enquanto, à América do Sul, tendo sido identificadas também no Chile, Uruguai e Bolívia, porém, ainda não relatadas no Brasil (NAAS; POIREL; NORDMANN, 2008).

Mais ESBLs do tipo PER foram descritas na França e Coreia (PARK *et al.*, 2009; GIRLICH; POIREL; NORDMANN, 2010), existindo, hoje, sete enzimas do tipo PER descritas (<<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>>).

A análise das sequências dos genes *bla*_{PER-1}, em vários Gram-negativos, revelou que essa β -lactamase era parte de um transposon composto chamado Tn1213 (POIREL *et al.*, 2005b). Estudos com PER-2 sugeriram um mecanismo de mobilização semelhante àquele deduzido para *bla*_{PER-1} em continentes distantes (América do Sul *versus* Europa e Ásia). Curiosamente, o gene que codifica *bla*_{PER-3} (com uma única mudança de aminoácidos em comparação a PER-1), identificado em um isolado de *Aeromonas punctata* na França, foi identificado em associação com elementos ISCR1, dentro de integron sul1-tipo In39. Esse achado pode indicar outro meio de propagação de genes *bla*_{PER}, reforçando, assim, o seu potencial de difusão e ressaltando a grande capacidade de elementos ISCR1 na propagação dos genes de resistência aos antimicrobianos (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2008).

2.5.3.5 ESBLs do tipo OXA

Apesar da definição de ESBL ser frequentemente restrita a β -lactamases da classe A, muitas oxacilinases com amplo espectro de atividade podem ser incluídas na definição e serem chamadas de OXA ESBLs, sendo que, na nova classificação de Bush e Jacoby, foram situadas no grupo 2de (BRADFORD, 2001; BUSH; JACOBY, 2010). As OXA β -lactamases receberam esse nome porque hidrolisam oxacilina e cloxacilina 50% melhor que benzilpenicilina (NAAS; NORDMANN, 1999). Elas ocorrem de forma predominante em *P. aeruginosa*, mas já foram detectadas em outras bactérias gram-negativas, incluindo Enterobacteriaceae (PATERSON; BONOMO, 2005).

Muitas β -lactamases do tipo OXA não hidrolisam de forma significativa cefalosporinas de amplo espectro, sugerindo a evolução das OXA ESBLs a partir de precursores com menor espectro de atividade. Elas exibem apreciável diversidade genética e grande heterogenicidade no espectro de hidrólise, sendo algumas resistentes aos inibidores de β -lactamases e outras inibidas por clavulonato. As β -lactamases do tipo OXA adquiridas estão relacionadas a integrons de classe 1 ou a sequências de inserção (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010).

2.5.3.6 ESBLs do tipo SFO-1

A β -lactamase SFO-1 foi encontrada em um único isolado de *E. cloacae* no Japão, em 1988 (MATSUMOTO; INOUE, 1999), e hidrolisa eficientemente cefotaxima, com menor eficiência à ceftazidima, e poupa cefamicinas e carbapenêmicos, sendo a atividade inibida por clavulonato. A sequência de aminoácidos é fortemente relacionada à sequência da β -lactamase de classe A de *S. fonticola*, e encontra-se em um plasmídeo transferível, sendo a produção da β -lactamase altamente induzível por imipenem (PEDUZZI *et al.*, 1997).

O plasmídeo possui um sistema regulatório com gene *ampR*, que sofre regulação semelhante a das β -lactamases da classe C. No entanto, é diferenciada de enzimas da classe C por não hidrolizar cefamicinas e por ser inibida por clavulonato (NAAS; POIREL; NORDMANN, 2008).

2.5.3.7 ESBLs do tipo BES

A ESBL do tipo BES-1 foi descrita em uma cepa de *Serratia marcescens*, isolada em um hospital no Rio de Janeiro (Brasil), em 1996. Essa enzima confere alto nível de resistência a aztreonam, cefotaxima e ceftazidima. Sua atividade contra cefotaxima é semelhante a CTX-M, no entanto, é mais ativa contra ceftazidima e tem afinidade 1000 vezes maior pelo aztreonam (BONNET *et al.*, 2000a).

O gene *bla*_{BES-1} é codificado em um plasmídeo e seu produto pertence à classe 2be, com 48% de sua sequência de aminoácidos idêntica ao grupo CTX-M. BES-1 é inibida por clavulonato, enquanto tazobactam é um fraco inibidor (BONNET *et al.*, 2000a).

2.5.3.8 ESBLs do tipo BEL

A ESBL do tipo BEL-1 foi identificada em uma cepa de *P. aeruginosa* isolada na Bélgica, em 2004, em uma amostra com sinergismo entre clavulonato e ceftazidima no teste de disco difusão, indicando presença de uma ESBL. BEL-1 é relacionada a outras β -lactamases da classe A de Ambler (50% de identidade com GES-1, 40% com CTX-M do grupo 8 e 36% com BES-1) e possui significativa eficácia em hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam, mas não cefoxitina e imipenem. Sua atividade é inibida por clavulonato, mas pouco inibida por tazobactam (POIREL *et al.*, 2005a).

O gene *bla*_{BEL-1} é localizado no cromossomo, dentro de um integron de classe 1, contendo três genes cassetes. Trabalhos recentes sugerem que o gene *bla*_{BEL-1} pode estar disseminado na Bélgica em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (BOGAERTS *et al.*, 2007).

2.5.3.9 ESBLs do tipo TLA

A ESBL do tipo TLA-1 foi identificada em um isolado de *E. coli* de um paciente no México, em 1993 (SILVA *et al.*, 2000). Essa enzima hidrolisa cefalosporinas de amplo espectro, incluindo cefotaxima, ceftazidima, aztreonam e

cefepime, mas não imipenem e cefoxitina. É fortemente inibida por tazobactam e menos por clavulonato e sulbactam. O gene *bla*_{TLA-1} é localizado em um plasmídeo transferível. Sua sequência de aminoácidos possui 50% de identidade com CME-1, uma β -lactamase cromossômica da classe A de *C. meningosepticum*, e 40% de homologia com enzimas PER e VEB mediadas por plasmídeos. Bacteremias hospitalares e infecções do trato urinário causadas por *K. pneumoniae* com plasmídeos carreando SHV-5 e TLA-1 foram recentemente descritas no México (ALCANTAR-CURIEL *et al.*, 2004), único local em que foi reportada (NAAS; POIREL; NORDMANN, 2008).

A ESBL TLA-2 foi descrita em um plasmídeo de 47 kb, encontrada em uma cepa bacteriana não identificada, obtida no lodo de um compartimento da estação de tratamento de água na Alemanha, em 2002 (GIRLICH *et al.*, 2005). TLA-2 é uma β -lactamase da classe A de Ambler, que mostra somente 51% com TLA-1 de *E. coli*. Tem boa eficiência catalítica contra muitas cefalosporinas, mas não contra penicilinas, e carecem de sensibilidade aos inibidores de β -lactamases. Ainda não existe nenhuma evidência da difusão dessa enzima em espécimes clínicas, mas o fato de poder degradar cefalosporinas e estar localizada em um plasmídeo indica que pode ter relevância clínica no futuro (NAAS; POIREL; NORDMANN, 2008).

2.5.3.10 ESBLs do tipo VEB-1

O gene VEB-1 foi descrito pela primeira vez em uma cepa de *E. coli* isolada em um paciente vietnamita, fazendo parte de integron localizado em um plasmídeo. A enzima VEB-1 tem elevada similaridade de aminoácidos com PER-1 e PER-2 (38%) e confere alto nível de resistência a ceftazidima, cefotaxima e aztreonam, sendo igualmente inibida por clavulonato, sulbactam e tazobactam (POIREL *et al.*, 1999). No Vietnã e na Tailândia, estudos epidemiológicos enfatizam a ampla distribuição de VEB-1 (CHANAWONG *et al.*, 2001; CAO *et al.*, 2002). Quatro mutações ponto derivadas de VEB-1 (VEB-2 a 5) foram descritas (<<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>>). Além disso, isolados produzindo VEB foram detectados em *P. aeruginosa* no Kuwait, China, Índia e Bangladesh; em *A. baumannii* na França, Bélgica e Argentina; em *Providencia stuartii* na Argélia; em

E. cloacae e *Achromobacter xylosoxidans* na França e em *E. coli* no Canadá (NAAS; POIREL; NORDMANN, 2008).

Os genes *bla*_{VEB-1} foram caracterizados em um típico integron da classe 1, situado em um transposon *Tn2000*. Outros trabalhos mostraram que os genes *bla*_{VEB} podem ser encontrados também em diferentes estruturas genéticas móveis (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2008).

2.5.3.11 ESBLs do tipo GES

ESBLs do tipo GES (Guiana β -lactamase de espectro ampliado), também chamadas de IBC, estão aumentando em bacilos Gram-negativos, incluindo *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. GES-1 foi inicialmente caracterizada em um isolado de *K. pneumoniae*, obtido de uma criança que foi transferida para a França a partir de um hospital da Guiana Francesa. O gene *bla*_{GES-1} estava localizado em um plasmídeo, dentro de um integron (POIREL *et al.*, 2000). GES-2 foi descrita na África do Sul, GES-5, GES-6, GES-7 e GES-8 foram descritas na Grécia e GES-3 e GES-4 foram descritas no Japão. GES-5 também foi encontrada recentemente na Coreia, China e Brasil (DA FONSECA *et al.*, 2007; NAAS; POIREL; NORDMANN, 2008). A nomenclatura pode ser verificada no site da Lahey clinical (<<http://www.lahey.org/studies/webt.html>>).

Algumas β -lactamases do tipo GES são carbapenemases e podem representar o passo intermediário entre ESBL e carbapenemases da classe A, como KPC (NAAS; POIREL; NORDMANN, 2008). O gene *bla*_{GES-1} foi inicialmente identificado como parte de um gene cassete, truncado, mas com um sítio de recombinação em um integron de classe 1, assim como a maioria dos genes *bla*_{GES} (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2008).

2.6 OUTRAS β -LACTAMASES IMPORTANTES EM ENTEROBACTÉRIAS

As ESBLs são, sem dúvida, as β -lactamases adquiridas com maior prevalência em enterobactérias. Apesar disso, outras β -lactamases adquiridas tem tido um aumento em sua importância nos últimos tempos, especialmente as

β -lactamases resistentes a inibidores, as AmpC plasmidíadas e as carbapenemases da classe A. Essas β -lactamases serão brevemente descritas a seguir.

2.6.1 β -lactamases do tipo AmpC

A primeira enzima bacteriana reportada como capaz de destruir a penicilina foi uma β -lactamase AmpC de *E. coli*, embora não tenha sido assim denominada em 1940. O nome AmpC surgiu em 1965, quando investigadores suecos iniciaram um estudo sistemático sobre a genética da resistência à penicilina em *E. coli*. Nesse estudo, as mutações com resistência à ampicilina eram chamadas de ampA e ampB, quando uma mutação de uma estirpe ampA que resultou na redução da resistência foi designada ampC. A maioria dos nomes tem mudado ao longo dos anos, mas a designação ampC tem persistido. A sequência do gene *ampC* de *E. coli* foi relatado em 1981 (JACOBY, 2009).

Na classificação estrutural de Ambler, as β -lactamases AmpC pertencem à classe C, enquanto na classificação funcional foram atribuídos ao grupo 1, que são definidas como cefalosporinas, resistentes à inibição pelo ácido clavulânico e ativos contra cefamicinas. Apresentam elevada afinidade com o aztreonam e geralmente não hidrolisam o cefepime (BUSH; JACOBY, 2010).

As β -lactamases AmpC estão presentes no cromossomo de muitas enterobactérias, como *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Morganella morganii*, *S. marcescens*, *P. stuartii*, *Shigella* spp., *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, entre outras espécies (LIVERMORE; BROWN, 2001).

Na família Enterobacteriaceae, a expressão da AmpC é baixa, mas pode ser induzida durante exposição aos β -lactâmicos. O mecanismo de indução é complexo, acontece quando a síntese da mureína é inibida pelos β -lactâmicos, levando ao acúmulo de produtos de degradação da mureína, chamados muramilpeptídeos. Em condições normais, na ausência de β -lactâmicos, esses produtos são formados pelo processo normal de alongamento e divisão celular. Os muramilpeptídeos são, então, transportados para o periplasma através da porina AmpG. Esses muramilpeptídeos são transformados novamente em precursores da síntese de mureína pela AmpD, uma amidase citoplasmática. Nesse caso, o gene *ampC* é mantido ao nível basal por um regulador transcricional (*ampR*) suprimido. Na presença de β -lactâmicos, a homeostase é perturbada pela degradação excessiva e acúmulo dos

muramilpeptídeos no periplasma e citoplasma. O acúmulo de muramilpeptídeos ativa *ampR*, que induz a produção de β -lactamase AmpC. Mutações em *ampD* ou *ampR* levam à hiperexpressão de *ampC* (JACOBY, 2009; KONG; SCHNEPER; MATHEE, 2010).

As β -lactamases AmpC plasmídicas são conhecidas desde 1989 e têm sido relatadas no mundo todo em isolados bacterianos hospitalares e não hospitalares, porém, com frequência menor que as ESBLs, podendo ser mais facilmente identificadas em espécies sem AmpC cromossômica. As AmpC identificadas em plasmídeos pertencem às famílias CMY, FOX, ACC, LAT, MIR, IAC, MOX, e DHA. Algumas dessas variedades são derivadas de genes cromossômicos, possíveis progenitores das AmpC plasmídicas (PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002; JACOBY, 2009). Algumas como ACT-1, DHA-1, DHA-2 e CMY são ligadas a genes *ampR* e são induzíveis, enquanto as demais não são (JACOBY, 2009).

No Brasil, existe apenas um relato de *E. coli* resistente a carbapenêmicos, produtora de AmpC plasmídica CMY-2, mas acredita-se que a presença de AmpC é subestimada nos hospitais brasileiros (PAVEZ *et al.*, 2008).

A detecção fenotípica das AmpC plasmídicas pode ser realizada usando inibidores de AmpC associados a cefalosporinas, pela avaliação da redução da resistência a cefalosporinas na presença do inibidor (COUDRON, 2005; TAN *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2009). A detecção molecular pode ser realizada por PCR (reação em cadeia da polimerase) multiplex, que é capaz de detectar os principais genes envolvidos (PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002).

2.6.2 β -lactamases resistentes aos inibidores (IRT e CMT)

As β -lactamases resistentes aos inibidores estão classificadas no subgrupo 2br de Bush e Jacoby (2010). A maioria pertence à família TEM e são chamadas de enzimas IRT (TEM resistentes a inibidores), que emergiram do tipo TEM-1 e TEM-2 por mutações que afetam a afinidade pelos inibidores de β -lactamases. São isolados com maior frequência em pacientes ambulatoriais, causando infecções urinárias. A prevalência é variável, dependendo da área geográfica e pressão seletiva (CANTON *et al.*, 2008a). As β -lactamases do tipo SHV também podem apresentar resistência a inibidores (BABIC; HUJER; BONOMO, 2006).

Outro grupo importante é o grupo das β -lactamases de amplo espectro resistente a inibidores. Essas enzimas estão no subgrupo 2ber de Bush e Jacoby e envolvem os complexos mutantes de TEM (CMT), que também conferem resistência a cefalosporinas de amplo espectro (CANTON *et al.*, 2008a).

Novos estudos com enzimas IRT e CMT, incluindo estudos estruturais, associações com virulência, dispersão em plasmídeos e detecção fenotípica são necessários (CANTON *et al.*, 2008a). Enzimas CTX-M com fenótipo IR (resistentes a inibidores) ainda não foram descritas.

2.6.3 Carbapenemases

Vários tipos de carbapenemases podem ser encontradas em enterobactérias. Para facilitar o estudo, pode-se dividi-las em serina carbapenemases, que correspondem às classes A e D de Ambler, e metalo- β -lactamases que correspondem à classe B (QUEENAN; BUSH, 2007).

A classe A corresponde a carbapenemases cromossômicas, que ocorrem raramente em *S. marcescens* (SME-1), *E. cloacae* (IMI-1, NMC-a) e carbapenemases medidas por plasmídeos GES e KPC (BABIC; HUJER; BONOMO, 2006). As carbapenemases do tipo GES foram discutidas juntos com as GES ESBLs, e as carbapenemases KPC serão mais bem definidas em uma seção a parte, devido à sua importância.

As carbapenemases do tipo OXA são mais comuns em não fermentadores, especialmente *A. baumannii*, tendo menor importância em enterobactérias. Assim como GES, já foram definidas junto com as OXA ESBLs (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010).

As metalo- β -lactamases são carbapenemases com zinco no sítio ativo. Não são inibidos por ácido clavulânico, mas por quelantes do zinco como o EDTA. Têm sido descritas em enterobactérias, porém com baixa frequência. São importantes em não fermentadores, podendo ser intrínsecas (*Stenotrophomonas maltophilia*) ou adquiridas (*P. aeruginosa*). As principais famílias são IMP, VIM, GIM, NDM, e no Brasil SPM (QUEENAN; BUSH, 2007).

2.6.3.1 Carbapenemases do tipo KPC

O primeiro membro da família KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) foi identificado através do projeto de vigilância denominado ICARE (*Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology*), em um isolado clínico de *K. pneumoniae*. A amostra foi isolada de um paciente hospitalizado na Carolina do Norte, Estados Unidos, em 1996. O gene bla_{KPC-1} está contido na região de codificação de 879 pb, que codifica uma proteína de 293 aminoácidos. A proteína contém as sequências características de β -lactamases da classe A e identidade de 45% a SME-1, 44% a NMC-A e 43% a IMI-1, sugerindo que KPC-1 é derivada de um ancestral diferente dessas outras β -lactamases (YIGIT *et al.*, 2001). A descoberta de KPC-1 foi seguida por inúmeros relatos de uma variante, KPC-2, na costa leste dos Estados Unidos, (QUEENAN; BUSH, 2007), que depois descobriram se tratar da mesma enzima.

Após a rápida expansão de KPC na costa leste dos Estados Unidos, a detecção da enzima foi documentada em vários outros países, como China (WEI *et al.*, 2007), Israel (NAVON-VENEZIA *et al.*, 2006), Colômbia (VILLEGAS *et al.*, 2006), Reino Unido (WOODFORD *et al.*, 2008) e Brasil (MONTEIRO *et al.*, 2009), entre outros. Já foi detectada em outras Enterobactérias como *C. freundii* e *Enterobacter* spp. (MARCHAIM *et al.*, 2008) e também em *P. aeruginosa* (VILLEGAS *et al.*, 2007).

No Brasil, as primeiras KPC foram isoladas no Recife, em 2006 (MONTEIRO *et al.*, 2009). Foram isoladas também no Rio de Janeiro em amostras dos anos 2007-2008 (PEIRANO *et al.*, 2009). Ainda no ano de 2008, três outros grupos reportaram, em diferentes encontros internacionais, a ocorrência de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2, em São Paulo e no Rio de Janeiro (PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009). Atualmente, apesar de nem todos os casos serem publicados, sabe-se que a KPC está disseminada por todo Brasil, e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicou recomendações quanto ao método de detecção e notificação dos casos (ANVISA, 2010).

Entre os métodos fenotípicos para detecção de KPC está o teste de Hodge modificado, que detecta a produção de carbapenemases, mas não da KPC especificamente (ANDERSON *et al.*, 2007; CARVALHAES *et al.*, 2010). Testes usando inibidores como ácido borônico têm sido avaliados (DOI *et al.*, 2008), devido à possível interferência da presença de AmpC. Porém, quando existe a suspeita de

uma carbapenemase, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é a maneira mais rápida para determinar a família de β -lactamase presente (QUEENAN; BUSH, 2007).

Um isolado que é suscetível aos carbapenêmicos pelos pontos de corte atuais pode ser produtor de carbapenemase. Nesse caso, a carbapenemase é difícil de ser detectada na rotina laboratorial, e uma vez detectada não se sabe ao certo como reportá-la. Até o momento, não há dados suficientes de conduta terapêutica que recomendem que esses isolados sejam relatados como resistentes aos carbapenêmicos (QUEENAN; BUSH, 2007). Porém, os clínicos devem ficar atentos a essa possibilidade, até que mais estudos sejam realizados.

2.7 DISTRIBUIÇÃO DAS ESBLs ENTRE AS ESPÉCIES BACTERIANAS

As ESBLs são encontradas principalmente em *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, consideradas espécies tipicamente produtoras dessas enzimas, para as quais foram padronizadas as metodologias de detecção (BRADFORD, 2001). A predileção das ESBLs por *Klebsiella* spp. nunca foi bem explicada. Uma das teorias é que os plasmídeos grandes, que normalmente carregam as ESBLs, são mais comuns em *Klebsiella* spp. que em *E. coli* ou outra espécie de Enterobactéria. Além disso, *K. pneumoniae* é mais adaptada ao ambiente hospitalar, sobrevivendo por mais tempo em superfícies que as demais espécies, o que facilita a contaminação cruzada (PATERSON; BONOMO, 2005).

As ESBLs já foram descritas, também, em muitas outras espécies de enterobactérias como *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *Enterobacter gergoviae*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Shigella sonnei*, *C. freundii*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter farmeri*, *Citrobacter amalonaticus*, *Klebsiella ornithinolytica*, *M. organii*, *S. marcescens*, *Salmonella typhimurium*, entre outras (MHAND *et al.*, 1999; DE CHAMPS *et al.*, 2000; GALDBART *et al.*, 2000; PAI *et al.*, 2001; VARELA *et al.*, 2001; PAGANI *et al.*, 2002; BERTRAND *et al.*, 2003; MULVEY *et al.*, 2003; NAVON-VENEZIA *et al.*, 2003; PAGANI *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2006; MINARINI *et al.*, 2007; GARCIA; DE LA GANDARA; GARCIA, 2010; KIRATISIN; HENPRASERT, 2010).

As espécies não *E. coli* e não *Klebsiella* spp. mais descritas como produtoras de ESBL são *Enterobacter* spp., *P. mirabilis* e *Salmonella enterica* (GARCIA; DE LA GANDARA; GARCIA, 2010). A produção de ESBLs em espécies

não enterobactérias é rara, mas pode ocorrer principalmente em *P. aeruginosa*. Nesse micro-organismo, os tipos mais comuns são OXA-derivados. Contudo, isolados de *P. aeruginosa* produzindo CTX-M, TEM, SHV e PER têm sido identificados em muitos países. As ESBLs também já foram detectadas em *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes faecalis* e *Burkholderia cepacia* (GNIADKOWSKI, 2001; JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005; PICAIO *et al.*, 2009b).

Apesar da incidência em outras espécies não *E.coli* e não *Klebsiella*, a maioria dos estudos epidemiológicos das infecções por ESBLs foram feitas apenas com esses micro-organismos. Talvez porque, por muitos anos, o *Clinical Laboratories Standards Institute* (CLSI) recomendou a pesquisa de ESBL e padronizou a metodologia de detecção apenas para essas espécies, incluindo a espécie *P. mirabilis*, em 2005 (CLSI, 2005).

Por esse motivo, acredita-se que a presença de ESBL em outras espécies seja subestimada. Além disso, existe a dificuldade da detecção de ESBL em espécies produtoras de AmpC cromossômica, para as quais não existe ainda uma metodologia ideal (KIRATISIN; HENPRASERT, 2010).

2.8 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESBLs

As cepas produtoras de ESBL disseminaram-se rapidamente por todo o mundo e, quando estabelecidas em uma região, frequentemente passam a ser o mecanismo de resistência prevalente. A frequência, assim como o tipo predominante, varia de região para região, e mesmo entre instituições da mesma região (PATERSON; BONOMO, 2005).

A América do Norte apresenta os menores índices mundiais, sendo a prevalência no Canadá menor que nos Estados Unidos da América (BUSH, 2008). Dados do *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information* (MYSTIC), de 2001 a 2004, mostram que a prevalência varia de 2,4 a 4,4% em *K. pneumoniae* e é menor que 1,5% em *E. coli* (GOOSSENS; GRABEIN, 2005).

Outro trabalho realizado de 2001 a 2002 nos EUA encontrou índices um pouco maiores, 11,3% em *K. pneumoniae* e 2,6% em *E. coli*, porém, ainda menores que os encontrados em outros locais (MOLAND *et al.*, 2006). Nos EUA e Canadá, o tipo SHV é o mais frequente, seguido de alguns isolados TEM. O tipo CTX-M apresenta poucos relatos, alguns relacionados a surtos (BUSH, 2008).

A Europa apresenta prevalência de ESBL maior do que nos EUA e menor do que Ásia e América do Sul, sendo que a prevalência varia muito entre os países (CANTON *et al.*, 2008b). Um estudo do MYSTIC de 2001 a 2004 encontrou 10,8% em *E. coli*, 13,6% em *K. pneumoniae* e < 4% em *Enterobacter spp.*, *C. freundii* e *P. mirabilis* (GOOSSENS; GRABEIN, 2005). Outro estudo encontrou 1,3% em *E. coli*, 18,4% em *K. pneumoniae* e 5,3% em *P. mirabilis* (NIJSSEN *et al.*, 2004). Um aumento na ocorrência de ESBL tem sido descrito na França, Itália, Espanha, Bélgica e Polônia (CANTON *et al.*, 2008b). Além disso, mudanças na epidemiologia das ESBLs vêm sendo relatadas. A primeira mudança diz respeito aos tipos de ESBLs prevalentes, que antes eram TEM e SHV e agora é CTX-M. As outras ESBLs continuam raras e são encontradas principalmente em *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Outras mudanças incluem a elevada frequência em infecções adquiridas na comunidade e a prevalência em *E. coli* maior que em *K. pneumoniae* em alguns locais (LIVERMORE *et al.*, 2007).

Na Ásia, a frequência também varia entre os países. Um estudo do *Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY), de 1998 a 2002, encontrou 35,6% de *K. pneumoniae* ESBL em Singapura, 30,7% na China, 10% no Japão e 24,5% de *E. coli* ESBL na China, 14,3% em Hong Kong e 11,3% em Singapura (HIRAKATA *et al.*, 2005). Os tipos de ESBL predominantes são CTX-M e SHV (HAWKEY, 2008).

Não existem muitos dados sobre ESBLs na África e Austrália. Um trabalho que avaliou a região do Pacífico relatou 10% de *K. pneumoniae* ESBL na Austrália e 28,1% na África do Sul (HIRAKATA *et al.*, 2005).

Na América do Sul encontra-se a maior prevalência do mundo. Dados do MYSTIC, de 1999, relatam prevalência de 45,4% – 51,9% em *K. pneumoniae* e 8,5% - 18,1% em *E. coli* (TURNER *et al.*, 1999), havendo assim como na Ásia e Europa, variação entre os países (VILLEGAS *et al.*, 2008). O tipo de ESBL mais frequente é o tipo CTX-M, com poucos isolados do tipo TEM e SHV. O tipo PER-2, exclusivo da América do Sul, é o segundo tipo mais isolado na Argentina e tem sido encontrado com frequência no Uruguai, Chile e Bolívia (VILLEGAS *et al.*, 2008).

2.9 DISTRIBUIÇÃO DAS ESBLs NO BRASIL

Os dados brasileiros sobre a prevalência de ESBL são escassos, havendo apenas publicações de estudo locais. Um levantamento em Passo Fundo, Rio

Grande do Sul, encontrou ESBL em 24,8% dos isolados de enterobactérias estudados (LAGO; FUENTEFRIA; FUENTEFRIA, 2010). Um trabalho realizado em Curitiba também encontrou ESBL em 24% dos isolados, e uma prevalência de 57,4% em *K. pneumoniae*, 21,4% em *K. oxytoca* e 7,2% em *E. coli* (NOGUEIRA *et al.*, 2006).

Outros estudos brasileiros avaliaram a presença de ESBL em pacientes com infecções comunitárias, encontrando esse mecanismo de resistência em 1,48% das enterobactérias testadas (MINARINI *et al.*, 2007). Em infecções em pés diabéticos, foi encontrada ESBL em 6% das enterobactérias isoladas (MOTTA *et al.*, 2003).

O tipo de ESBL predominante no Brasil é o tipo CTX-M. A enzima CTX-M-2 é relatada com maior frequência, juntamente com as variantes CTX-M-59, CTX-M-15 (TOLLENTINO *et al.*, 2010) e CTX-M-8, descrita pela primeira vez no Brasil (BONNET *et al.*, 2000b). Também foram encontradas ESBLs do tipo SHV-12, SHV-31, SHV-38 (TOLLENTINO *et al.*, 2010) e SHV-5 (MINARINI *et al.*, 2007). Além de ESBL do tipo GES em *P. aeruginosa* (PICAO *et al.*, 2009a) e uma nova ESBL descrita no Brasil, a BES (ESBL Brasileira) (BONNET *et al.*, 2000a).

2.10 DISSEMINAÇÃO DOS GENES E DOS MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE ESBL

A literatura relata muitos casos em que se tem notado rápido aumento no número de micro-organismos carreando ESBL em hospitais, além de disseminação intra-hospitalar ou entre hospitais vizinhos (WINOKUR *et al.*, 2000). A transmissão pelas mãos dos profissionais é relevante, sendo o trato gastrointestinal dos pacientes um importante reservatório (VON DOLINGER BRITO *et al.*, 1999; WINOKUR *et al.*, 2000; PATERSON; BONOMO, 2005). Para cada paciente infectado, ao menos mais um é colonizado na mesma unidade. Os profissionais da saúde também podem ter o trato gastrointestinal e pele colonizados, principalmente portadores de dermatite crônica (PATERSON; BONOMO, 2005). Alguns surtos foram resultantes de contaminação de aparelhos e insumos diagnósticos, como termômetros, broncoscópios e gel usado em ultrassonografia (GNIADKOWSKI, 2001).

Além da transmissão das cepas resistentes, ocorre também a aquisição de resistência por cepas suscetíveis (RAHAL, 2000; SILVA *et al.*, 2001; BERTRAND *et*

al., 2003). A transmissão horizontal do gene de resistência é facilitada por ele estar codificado em plasmídeos, os quais podem ser facilmente transferidos entre as cepas (PAI *et al.*, 1999; SZABO *et al.*, 1999; GALDBART *et al.*, 2000; GALANI *et al.*, 2002; MULVEY *et al.*, 2003; PAGANI *et al.*, 2003; CARATTOLI, 2009).

A maioria dos estudos de epidemiologia molecular foi realizada com *K. pneumoniae* e demonstrou que as vias de disseminação podem ser variáveis (PATERSON; BONOMO, 2005). Alguns surtos descritos foram causados pela disseminação de um único clone (GAILLOT *et al.*, 1998). Além disso, sabe-se que um clone pode persistir por até três anos no ambiente hospitalar (BRANGER *et al.*, 1997). Porém, na grande maioria dos casos, a disseminação é policlonal. Existe um relato da disseminação de cinco clones diferentes, na mesma unidade, ao mesmo tempo (FIETT *et al.*, 2000). Ocorre também de uma mesma cepa carrear plasmídeos diferentes, contendo ESBL, e de cepas não relacionadas conterem plasmídeos idênticos. Isso implica que a evolução ocorre de forma independente, via pressão seletiva pelo uso de antimicrobianos, ou por plasmídeos transferidos entre os micro-organismos (PATERSON; BONOMO, 2005).

O melhor método para determinar a relação entre os micro-organismos produtores de ESBL é a análise de fragmentos de DNA cromossômico gerados por enzimas de restrição de baixa frequência de clivagem, através da eletroforese em campo pulsado (PFGE). A enzima usada normalmente é *Sfi* para *Proteus* spp. e *XbaI* para as demais espécies. Outras técnicas também podem ser usadas como análise do DNA Plasmidiano, Ribotipagem, Polimorfismo da amplificação randômica do DNA (RAPD), Restrição de fragmentos de PCR, entre outros (TENOVER *et al.*, 1999; PATERSON; BONOMO, 2005).

Para comparar isolados em regiões e países diferentes, tem sido usado o MLST (tipagem por sequenciamento de multilocus). Através dessa metodologia, foi possível identificar uma cepa de *E. coli* produtora de CTX-M-15, disseminada em vários países como Espanha, França, Canadá, Portugal, Líbano, Índia, Kuwait e Coreia, no período de 2000 a 2006, chamada ST131. Os autores consideram comida e água como fonte provável e/ou a importação das cepas através dos viajantes (COQUE *et al.*, 2008; NICOLAS-CHANOINE *et al.*, 2008).

2.11 COEXISTÊNCIA COM OUTRAS β -LACTAMASES

Os organismos produtores de ESBL, frequentemente, carregam genes para produção de outras β -lactamases, como TEM e SHV não ESBLs, ou AmpC no mesmo plasmídeo. É comum, ainda, a produção de ESBL associada à produção de β -lactamases cromossômicas, como SHV-1 de *K. pneumoniae*, K1 de *K. oxytoca*, AmpC em *Enterobacter* spp., entre outras (CARATTOLI, 2009; KIRATISIN; HENPRASERT, 2010). Os micro-organismos contendo essas combinações de β -lactamases podem ser resistentes aos inibidores de β -lactamases, cefamicinas e até carbapenêmicos (BRADFORD, 2001).

2.12 ESBL E BARREIRA DE PERMEABILIDADE

A membrana externa de bactérias gram-negativas representam uma barreira para penetração de compostos hidrofílicos. A perda de porinas (canais proteicos hidrofílicos) contribui para resistência a antimicrobianos, particularmente quando mecanismos adicionais de resistência são expressos (MARTINEZ-MARTINEZ, 2008). Muitos estudos sobre a estrutura e regulação de porinas em *E. coli* K-12 são descritos, mas existe pouca informação sobre isolados clínicos dessa espécie (NIKAIDO, 2003). Em *K. pneumoniae*, duas porinas maiores, OMPK35 e OMPK36 são produzidas, mas muitos isolados de *Klebsiella* spp. produtoras de ESBL não expressam OMP35. A perda das duas porinas OMP35 e OMP36 em *K. pneumoniae* causa resistência à cefoxitina, aumenta a resistência às cefalosporinas de amplo espectro e reduz a sensibilidade a carbapenêmicos, particularmente a ertapenem. A perda de porinas também reduz a sensibilidade a outros antimicrobianos não β -lactâmicos, como fluoroquinolonas, em organismos produtores de ESBL (HERNANDEZ-ALLES *et al.*, 2000; CONEJO; HERNANDEZ; PASCUAL, 2008; MARTINEZ-MARTINEZ, 2008; HERNANDEZ; CONEJO; PASCUAL, 2010).

Em *E. coli*, as proteínas OMPF e OMPC equivalem à OMP35 e OMP36 de *K. pneumoniae*, respectivamente. O gênero *Enterobacter* possui genes análogos à OMPF e OMPC e, ainda, um gene para OMPD. *Proteus*, *Providencia* e *Morganella* ainda não foram bem estudados quanto à permeabilidade, mas talvez possuam uma porina inespecífica. Outras porinas que podem ser expressas em enterobactérias: NMPC, OMPN, OMP37 e OMPSR (NIKAIDO, 2003; MARTINEZ-MARTINEZ, 2008).

A perda ou mutação de porinas é difícil de ser detectada e a pesquisa não se aplica a laboratórios clínicos, sendo realizada apenas em laboratórios especializados. Os métodos usados são: eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), espectrometria, pesquisa do plasmídeo com gene defeituoso (MARTINEZ-MARTINEZ, 2008).

2.13 ASSOCIAÇÃO DE RESISTÊNCIA A OUTROS ANTIMICROBIANOS

Além da associação com outras β -lactamases, existe alta associação de ESBL e genes de resistência a outros antimicrobianos como ciprofloxacino (PENA *et al.*, 2001; BERTRAND *et al.*, 2003; JONES; PFALLER, 2003; PAGANI *et al.*, 2003), gentamicina (SZABO *et al.*, 1999; CORKILL *et al.*, 2001; PENA *et al.*, 2001; GALANI *et al.*, 2002; DAOUD; HAKIME, 2003; PAGANI *et al.*, 2003), sulfametoxazol (SZABO *et al.*, 1999; DE CHAMPS *et al.*, 2000; WINOKUR *et al.*, 2000; GALANI *et al.*, 2002), piperacilina-tazobactam e outras combinações com inibidores (DAOUD; HAKIME, 2003; JONES; PFALLER, 2003).

Isso ocorre porque as ESBLs são mediadas por plasmídeos que podem conter uma grande variedade de genes de resistência a diferentes antimicrobianos (CARATTOLI, 2009). Alguns genes são descritos com frequência em plasmídeos contendo ESBL, por exemplo, genes chamados *qnr*, responsáveis pela resistência adquirida às quinolonas (PATERSON, 2006; WANG *et al.*, 2008a; MULLER *et al.*, 2010). Outro exemplo atual é o gene que codifica para uma rRNA metilase, responsável pela resistência a aminoglicosídeos (KANG *et al.*, 2009).

2.14 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DAS ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL

As infecções por enterobactérias produtoras de ESBL deixaram de ser um problema exclusivamente hospitalar e passaram a ter relevância na saúde pública, devido ao aumento das infecções comunitárias associadas a esses microorganismos.

2.14.1 Infecções comunitárias por micro-organismos produtores de ESBL

Os organismos produtores de ESBL são considerados uma causa emergente de infecções em pacientes ambulatoriais em muitas áreas do mundo. Entre as infecções adquiridas na comunidade, existe prevalência de infecção urinária por *E. coli* produtora de CTX-M (HERNANDEZ *et al.*, 2003). Também podem causar outras infecções como bacteremia pós-infecção do trato urinário ou infecções intra-abdominais (RODRIGUEZ-BANO; NAVARRO, 2008). No Brasil, enterobactérias produtoras de ESBL foram detectadas em feridas de pés diabéticos, infecções urinárias e em outras infecções adquiridas na comunidade (MOTTA *et al.*, 2003; MINARINI *et al.*, 2007; MINARINI *et al.*, 2009). Pacientes com essas infecções têm uma probabilidade aumentada de receber tratamento empírico inadequado. Além disso, alternativas orais para antimicrobianos β -lactâmicos e quinolonas são limitadas (RODRIGUEZ-BANO; NAVARRO, 2008).

Os fatores de risco associados às infecções comunitárias por ESBL são *diabetes mellitus*, as infecções urinárias recorrentes, a hospitalização prévia, o uso prévio de antimicrobianos (cefalosporinas, penicilinas ou quinolonas) e a idade avançada (COLODNER *et al.*, 2004; RODRIGUEZ-BANO *et al.*, 2004).

Existem também relatos de cepas produtoras de ESBL circulantes em pessoas que moram em asilos (WIENER *et al.*, 1999), que têm se mostrado como um importante reservatório desses micro-organismos (RAHAL, 2000). A primeira descrição de ESBL em casas de repouso foi há dez anos, e novos relatos ocorrem até hoje. Estudos de vigilância em Paris notaram que 80%, em 1995, e 45%, em 2001, das amostras de enterobactérias isoladas, eram positivas para ESBL. Essas amostras eram principalmente clonais e o tipo de enzima predominante nessas cepas era CTX-M (NICOLAS-CHANOINE; JARLIER, 2008).

Alguns autores sugerem que a transmissão se deva potencialmente ao consumo de alimentos de origem animal e à transmissão pessoa-pessoa, mas ainda são necessários estudos adicionais. Uma observação importante é que a disseminação nos hospitais pode ser maior em função da disseminação na comunidade e casas de repouso (RODRIGUEZ-BANO; NAVARRO, 2008).

2.14.2 Infecções nosocomiais por micro-organismos produtores de ESBL

As infecções por organismos produtores de ESBL adquiridas em hospitais têm sido extensivamente estudadas. A maioria dos estudos clínicos refere-se a *K. pneumoniae* e as síndromes clínicas estudadas são infecções respiratórias, infecções do trato urinário, infecções de ferida, infecções de corrente sanguínea ou infecções intra-abdominais (FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009).

Os fatores de risco para a infecção ou colonização por enterobactérias produtoras de ESBL são semelhantes àquelas observadas para os demais micro-organismos multirresistentes. O principal fator de risco ao paciente é a longa permanência em hospitais, principalmente em unidades de terapia intensiva (UTI), alas cirúrgicas, pediatria e alas de pacientes crônicos (DE CHAMPS *et al.*, 1989; SHEHABI *et al.*, 2000; BRADFORD, 2001; PENA *et al.*, 2001; BERTRAND *et al.*, 2003; HERNANDEZ *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2003). Também são fatores importantes a severidade da doença, neutropenia (JONES; PFALLER, 2003), exposição a procedimentos invasivos como entubação e ventilação mecânica, cateter arterial e sonda urinária (BRADFORD, 2001; PENA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2001) e uso prévio de antimicrobianos como oximino-cefalosporinas e quinolonas (JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005). As UTIs neonatais são particularmente suscetíveis a surtos, sendo considerados fatores de risco predisponentes o baixo peso, tempo de permanência em incubadora, exposição a antimicrobianos, tempo de hospitalização (mais de sete dias) e prematuridade (SZABO *et al.*, 1999; VON DOLINGER BRITO *et al.*, 1999; SINGH *et al.*, 2002).

O impacto clínico da infecção por ESBL é mais bem estudada em pacientes hospitalizados com bacteremia por *E. coli* e *K. pneumoniae*. Tem sido observado que as infecções por ESBL *versus* não ESBL estão associadas ao atraso na adoção de antibioticoterapia correta, ao aumento da mortalidade, da permanência nos hospitais e nos custos do tratamento (SCHWABER; CARMELI, 2007; FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009; PITOUT). Quanto a *Enterobacter spp.* e outras enterobactérias, existem poucos estudos sobre os problemas relacionados ao impacto clínico da produção de ESBL. Esse dado é importante porque a pesquisa de ESBL geralmente não é realizada nessas espécies pela dificuldade em se padronizar uma metodologia, devido à produção de enzimas do tipo AmpC (TOWNE *et al.*, 2010).

2.15 TRATAMENTOS DAS INFECÇÕES POR ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL

A presença de ESBL dificulta a terapia antimicrobiana, especialmente em pacientes com infecções sérias, como bacteremia. A razão é que bactérias produtoras de ESBL são frequentemente multirresistentes (FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009). Antimicrobianos, como as cefalosporinas de terceira geração, que são usados frequentemente na terapia empírica em infecções, não são ativos contra ESBL, e a principal causa da maior mortalidade associada a esses micro-organismos é a demora na introdução da antibioticoterapia correta (PITOUT *et al.*, 2003; SCHWABER; CARMELI, 2007).

Além disso, em infecções por micro-organismos produtores de ESBL, nem todos os agentes antimicrobianos que apresentam sensibilidade *in vitro*, possuem boa atividade *in vivo* (PITOUT, 2010). Isso ocorre com alguns β -lactâmicos, combinações com inibidores de β -lactamases e em frequência menor com quinolonas (PETERSON, 2008). A causa mais estudada para essa observação é chamada de efeito inóculo e baseia-se no fato da CIM aumentar na presença de inóculos bacterianos maiores que os padronizados (LOPEZ-CERERO *et al.*, 2009). Alguns pesquisadores acreditam que isso corresponde ao que ocorre no sítio da infecção, em que a concentração bacteriana e, portanto, de β -lactamase é elevada (THOMSON; MOLAND, 2001). Outros autores, no entanto, acreditam que não passa de um artefato produzido no laboratório (PFALLER; SEGRETI, 2006).

O uso de cefalosporinas no tratamento de infecções por produtores de ESBLs não tem sido recomendado, pois os pacientes acometidos com infecções causadas por esses micro-organismos têm um elevado risco de falha no tratamento, mesmo quando apresenta suscetibilidade no antibiograma (THOMSON, 2010). Apesar da redução dos pontos de corte das cefalosporinas e resultados dos estudos de pK/pD indicarem a possibilidade de uso desses antimicrobianos quando a CIM é baixa, esse assunto ainda é controverso, pois existem relatos de falha terapêutica em infecções por micro-organismos produtores de ESBL com CIM inferior a 2 $\mu\text{g/ml}$ para cefepime (PATERSON *et al.*, 2001) e de 0,75 $\mu\text{g/ml}$ para cefotaxima (KARAS *et al.*, 1996).

As cefamicinas não são hidrolisadas por ESBLs, no entanto, mecanismos como perda de porinas podem estar associados, conferindo resistência. Seu uso não é recomendado por ser um forte indutor de resistência (PITOUT, 2010).

O uso das combinações β -lactâmicos/inibidor de β -lactamase é questionado, apesar de ocorrer a inibição *in vitro* das ESBLs. O aumento na resistência dos produtores de ESBL à piperacilina-tazobactam tem restringido seu uso, sendo que o mais reconhecido é o da amoxicilina/clavulonato no tratamento de infecções urinárias por micro-organismos produtores de ESBL adquiridos na comunidade (FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009).

As fluoroquinolonas podem ser usadas quando sensíveis, porém, a efetividade é menor que a dos carbapenêmicos (FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009). A amicacina também apresenta boa atividade, quando sensível, mas seu uso é restrito devido à toxicidade (PENA *et al.*, 2001; DAOUD; HAKIME, 2003).

O tratamento de escolha, em geral, são os carbapenêmicos. Cepas produtoras de ESBL são sensíveis a esses antimicrobianos (PITOUT, 2010), exceto quando outros mecanismos de resistência, como redução da permeabilidade, estão associados (DOUMITH *et al.*, 2009; LEAVITT *et al.*, 2009). O uso de carbapenêmicos no tratamento precoce de bacteremia por micro-organismos produtores de ESBL tem sido indicado como um fator associado à menor mortalidade (FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009).

Entre os carbapenêmicos, o mais utilizado para enterobactérias é o imipenem. Contudo, estudos têm demonstrado que o ertapenem, um novo carbapenêmico com longo tempo de meia vida, é altamente potente contra bactérias produtoras de ESBL (KOHLENER *et al.*, 1999; LIVERMORE *et al.*, 2001). Assim como o imipenem, o ertapenem não apresenta variações consideráveis na CIM quando testado frente a um elevado inóculo bacteriano. Isso demonstra que o ertapenem não é suscetível à hidrólise por essas enzimas, mesmo quando ela encontra-se em concentrações elevadas (KOHLENER *et al.*, 1999). Entre as vantagens do uso do ertapenem, deve-se ressaltar a possibilidade de administração em dose única via intramuscular, o que permite o uso não hospitalar. Além disso, a sua reduzida atividade contra bacilos Gram-negativos não fermentadores não contribui para a seleção de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos (LIVERMORE *et al.*, 2001).

Por outro lado, a não atividade contra não fermentadores limita o uso como terapia empírica em infecções hospitalares. Além disso, estudos mostram que o ertapenem tem menor probabilidade de atingir $T > CIM > 40\%$, necessário para atividade dos demais carbapenêmicos, limitando o uso contra produtores de ESBL em infecções graves (ZHANEL *et al.*, 2007; BAUGHMAN, 2009). O Doripenem, novo carbapenêmico aprovado em 2007 para uso em infecções urinárias complicadas, infecções intra-abdominais e, recentemente, pneumonia associada à ventilação, demonstrou ser eficaz contra enterobactérias produtoras de ESBL (ALVAREZ-LERMA; GRAU; FERRANDEZ, 2009; PATERSON; DEPESTEL, 2009).

Outra opção terapêutica é um novo antimicrobiano da família das glicilciclinas, a tigeciclina, que tem se mostrado ativa contra enterobactérias, inclusive as produtoras de AmpC e de ESBL (MOROSINI *et al.*, 2006). Os dados clínicos sobre a efetividade da tigeciclina, porém, ainda são limitados, e os dados farmacodinâmicos e farmacocinéticos desse agente causam dúvida quanto ao potencial de atividade em infecções urinárias ou bacteremias. O órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso da tigeciclina para tratamento de infecções intra-abdominais, infecções de pele e tecidos moles e pneumonias adquiridas na comunidade, enquanto a *European Medicines Agency* (EMA) aprovou apenas os dois primeiros usos citados. Outros usos vêm sendo propostos e avaliados, no entanto, ainda não possuem indicação pelos órgãos oficiais, o que faz com o uso da tigeciclina ainda seja restrito (KELESIDIS *et al.*, 2008; FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS; DIMOPOULOS, 2009; BASSETTI *et al.*, 2010; SEPUTIENE *et al.*, 2010).

Outros agentes que podem ser úteis no tratamento de infecções por ESBL são polimixina, fosfomicina e nitrofurantoína. A polimixina é efetiva contra produtores de ESBL, porém, dados quanto ao tratamento de infecções por esses microrganismos são escassos. Também se deve considerar a elevada nefrotoxicidade da polimixina e a resistência intrínseca de algumas espécies de enterobactérias a esse antimicrobiano (PITOUT *et al.*, 2003; FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009; VAARA, 2010).

A resistência à fosfomicina em isolados de infecções urinárias ainda é baixo, e esse antimicrobiano vem sendo usado no tratamento de infecções urinárias comunitárias por ESBL com sucesso. A nitrofurantoína também vem sendo utilizada no tratamento de infecções urinárias não complicadas, devendo ser observada a

sensibilidade a esse antimicrobiano (FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009; PITOUT, 2010).

2.16 PONTOS DE CORTE PARA β -LACTÂMICOS EM ENTEROBACTÉRIAS

Há alguns anos, era de conhecimento geral que os pontos de corte usados em países europeus e nos EUA falhavam em detectar ESBL em enterobactérias. Com isso, comitês como o CLSI (*Committee Laboratory Standards Institute*) e o EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) instituíram que os laboratórios de microbiologia deveriam realizar não somente testes de sensibilidade regulares às cefalosporinas, mas também testes especiais para detecção de ESBL. Esses comitês recomendavam, ainda, que todas as enterobactérias produtoras de ESBL fossem reportadas como resistentes a todas as cefalosporinas, incluindo as de quarta geração, independente do resultado obtido no antibiograma (MACGOWAN, 2008; CLSI, 2009).

Essas recomendações se baseavam em estudos que relatavam falha terapêutica de cefalosporinas no tratamento de infecções por micro-organismos produtores de ESBL, mesmo quando a concentração inibitória mínima (CIM) das cefalosporinas eram valores definidos como suscetíveis (PATERSON *et al.*, 2001; ZANETTI *et al.*, 2003; KOTAPATI *et al.*, 2005). Essas discrepâncias foram atribuídas principalmente ao efeito do inóculo no sítio de infecção (SZABO *et al.*, 2001; THOMSON; MOLAND, 2001).

Porém, os métodos de detecção de ESBL incluem um passo a mais na rotina laboratorial durante a elaboração do antibiograma e, ainda, possuem limitações quanto à sensibilidade e especificidade, em especial quando outros mecanismos de resistência a β -lactâmicos estão presentes, o que impõe dificuldades na implantação por alguns laboratórios (HOPE *et al.*, 2007). Além disso, a prevalência de ESBL cresceu muito, inclusive para outras espécies de enterobactérias, nas quais a detecção é ainda mais difícil (CANTON *et al.*, 2008b; VILLEGAS *et al.*, 2008). Pensando em melhorar a confiabilidade dos resultados, instituições responsáveis pela padronização dos testes de sensibilidade como CLSI e EUCAST passaram a pensar na possibilidade de mudar o parâmetro de avaliação para cefalosporinas em enterobactérias, de forma que não fosse mais necessária a

pesquisa de ESBL e, ao mesmo tempo, melhorasse a correlação dos resultados dos testes com os observados *in vivo* (ANDES; CRAIG, 2005; JONES *et al.*, 2005).

Novos estudos mostraram que, para cefalosporinas, os dados farmacocinéticos podem prever a eficácia terapêutica melhor que a CIM isolada e ainda ajudar na adequação da dose (MAGLIO *et al.*, 2004). Para cefalosporinas, o tempo que a concentração sérica do antimicrobiano se mantém acima da CIM nos intervalos entre as doses ($T > CIM$) é o parâmetro mais utilizado. Porém, os valores encontrados em diferentes estudos variam. Enquanto alguns consideram o $T > CIM$ acima de 50% necessário para eficácia terapêutica (LEE; KUTI; NICOLAU, 2007), outros indicam ser necessário concentração de 3 a 4 vezes a CIM por 83 a 95% do tempo, respectivamente (TAM *et al.*, 2002), ou ainda, $T > CIM = 100\%$ (MCKINNON; PALADINO; SCHENTAG, 2008). Para o cefepime, outros parâmetros foram estudados, com boa correlação com cura clínica ou erradicação bacteriológica, são eles: área abaixo da curva de concentração do antimicrobiano x tempo (AUC) < 250 (MCKINNON; PALADINO; SCHENTAG, 2008); razão entre AUC e a CIM (AUC/CIM) > 1654 , ou ainda, razão entre concentração mínima e CIM (C_{min}/CIM) $> 7,6$ (LEE; KUTI; NICOLAU, 2007).

Com isso, novos pontos de corte passaram a ser avaliados para cefalosporinas, baseados nos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos. O EUCAST foi o primeiro a mudar os pontos de corte de suscetibilidade das cefalosporinas e a padronizar a liberação dos resultados como encontrados, independente da produção de ESBL (KAHLMETER, 2008). Em 2010, o CLSI lançou modificações semelhantes, descritas no QUADRO 4.

Antimicrobiano	CLSI M100-S19 - 2009			CLSI M100-S20 - 2010			EUCAST - 2011	
	S	I	R	S	I	R	S	R
Cefotaxima	≤8	16-32	≥64	≤1	2	≥4	≤1	>2
Ceftriaxona	≤8	16-32	≥64	≤1	2	≥4	≤1	>2
Ceftazidima	≤8	16	≥32	≤4	8	≥16	≤1	>4
Aztreonam	≤8	16	≥32	≤4	8	≥16	≤1	>4
Cefepime	≤8	16	≥32	≤8	16	≥32	≤1	>4

QUADRO 4 – PONTOS DE CORTE DO CLSI E EUCAST.
 FONTE: CLSI (2009; 2010) e EUCAST (2011).

Os dois comitês consideram que, com os novos pontos de corte, a pesquisa de ESBL não é mais necessária para fins de sensibilidade a antimicrobianos, mas deve ser realizada a critério das instituições para fins epidemiológicos e de controle de infecção por esses micro-organismos (CLSI, 2010; EUCAST, 2010).

Alguns autores consideram a decisão de não pesquisar ESBL precipitada, devido ao grande impacto clínico que ela representa e aos riscos da terapia inapropriada, já que os resultados clínicos obtidos na terapia com cefalosporinas nesses pacientes ainda é muito controverso (THOMSON, 2010).

Com a disseminação das carbapenemases em enterobactérias, estudos semelhantes foram feitos para carbapenêmicos e no suplemento de junho de 2010, o CLSI alterou também os pontos de corte dos carbapenêmicos. Para meropenem ou imipenem, os pontos de corte que eram sensível ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ e resistente ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ e mudaram para sensível ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ e resistente ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$, enquanto para o ertapenem que tinha os pontos de corte sensível ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ e resistente ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ os mesmos mudaram para sensível $\leq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$ e resistente ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ (CLSI, 2010b). No EUCAST os pontos de corte são sensível ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ e resistente ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ para meropenem ou imipenem e sensível $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ e resistente ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ para ertapenem (EUCAST, 2011).

2.17 MEDIDAS DE CONTROLE

Muitos hospitais têm relatado a ocorrência de surtos por micro-organismos produtores de ESBL. Esses surtos são, frequentemente, decorrentes da transferência de pacientes entre unidades e entre hospitais. Os aspectos gerais do controle de enterobactérias-ESBL são similares àqueles aplicados para outros Gram-negativos hospitalares e devem evitar a transmissão paciente-paciente dos micro-organismos, incluindo transmissão via colonização do ambiente, dos equipamentos hospitalares e das mãos da equipe de atendimento hospitalar (FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009).

Dentre os métodos de controle descritos na literatura estão as pesquisas de colonização, detecção de ESBL pré-admissão, estabelecimento de barreiras de contato (BERTRAND *et al.*, 2003), isolamento de pacientes com ESBL, higiene (GRUTEKE *et al.*, 2003) e cultura para pesquisa em objetos inanimados (SZABO *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2001).

Além disso, o controle do uso de antimicrobianos pode reduzir a pressão seletiva, contribuindo para a redução da incidência de cepas produtoras de ESBL. Uma forte correlação entre o uso de cefalosporinas de terceira geração, como a ceftazidima, e a resistência aos antimicrobianos em *K. pneumoniae*, tem sido repetidamente demonstrada. Assim como um declínio na prevalência de *K. pneumoniae* ESBL positiva tem sido documentado em instituições que racionalizaram o uso de outras drogas de amplo espectro (PATERSON *et al.*, 2001).

2.18 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ESBL

2.18.1 Técnicas microbiológicas

Os testes microbiológicos baseiam-se na redução da sensibilidade às oximino-cefalosporinas, como ceftazidima ou cefotaxima, e/ou monobactâmicos, como o aztreonam e empregam um inibidor de β -lactamase, usualmente clavulonato, que inibe as ESBLs e reduz o nível de resistência à cefalosporina, indicando sua presença (BRADFORD, 2001; DRIEUX *et al.*, 2008).

Muitos dos testes propostos para detecção de ESBL são baseados na metodologia de disco difusão ou Kirby-Bauer (BAUER *et al.*, 1966a). Um dos primeiros descritos foi o teste de duplo disco difusão (JARLIER *et al.*, 1988). Alguns anos depois, o teste tridimensional foi proposto por Thomsom e Sanders (THOMSON; SANDERS, 1992). O teste de adição do ácido clavulânico, realizado com discos, tiras de E-test® e métodos de diluição manuais ou automatizados como o Vitek® e Microscan®, tem sido amplamente utilizados, e muitos trabalhos comparando sensibilidade e especificidade dos métodos têm sido realizados (TENOVER *et al.*, 1999; CARTER *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2001; PITOUT *et al.*, 2003).

Os vários métodos para detecção de ESBL podem falhar na presença concomitante de outros mecanismos de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos e fornecer resultados falsos negativos. A diminuição na permeabilidade da bactéria aos antimicrobianos e a produção de outras β -lactamases, em especial as cromossômicas induzíveis presentes em várias espécies, podem mascarar a presença de ESBL (TENOVER *et al.*, 1999; GALDBART *et al.*, 2000; THOMSON, 2001; VARELA *et al.*, 2001; SCHWABER *et al.*, 2004).

Resultados falsos positivos podem ser observados com β -lactamases que apresentem o mesmo efeito com ácido clavulânico, como algumas β -lactamases cromossômicas de *K. oxytoca*, *P. vulgaris*, *E. cloacae* e *S. marcescens*, que podem ser capazes de reduzir a suscetibilidade às cefalosporinas de terceira geração e ao aztreonam (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; LIVERMORE; BROWN, 2001; SCHWABER *et al.*, 2004). Hiperprodução de β -lactamases de espectro restrito, inibidas por ácido clavulânico, como a SHV-1, também pode conferir resistência a cefalosporinas de terceira geração (RAWAT; NAIR, 2010). As carbapenemases mediadas por plasmídeos do tipo KPC, também são inibidas por ácido clavulânico e podem ser confundidas com ESBL nos testes fenotípicos (THOMSON, 2010).

A enzima K1 de *K. oxytoca* (OXY) pode ser diferenciada por não conferir resistência à ceftazidima, diferente da maioria das ESBLs. Além disso, a resistência às cefalosporinas de terceira geração só ocorre quando a enzima está presente em altas concentrações, não sendo o ácido clavulânico, presente nos testes utilizados, suficientes para inibi-la de forma eficaz. A enzima cromossômica de *P. vulgaris* pertence à classe molecular A e, quando produzida em grande quantidade, pode também conferir resistência às cefalosporinas de terceira geração, mas não ao aztreonam, ao contrário das ESBL. As enzimas pertencentes ao grupo 2f, encontradas em *E. cloacae* e *S. marcescens*, assim como as KPC, são enzimas capazes de degradar penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; LIVERMORE, 1995; BUSH, 2001; GARCIA; DE LA GANDARA; GARCIA, 2010).

2.18.1.1 Pontos de corte indicativos da produção de ESBL

Utilizando os métodos de disco difusão, microdiluição ou E-test®, a diminuição de suscetibilidade a alguns antimicrobianos β -lactâmicos é um indício da produção de ESBL. Segundo o CLSI (2009), amostras que apresentem CIM ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ ceftazidima, cefpodoxima, aztreonam, cefotaxima ou ceftriaxona, por testes dilucionais, devem ser consideradas possíveis produtoras de ESBL.

Nos testes de disco difusão, os pontos de corte são halos de inibição ≤ 22 mm para ceftazidima, ≤ 17 mm para cefpodoxima, ≤ 27 mm para aztreonam, ≤ 27 mm para cefotaxima, ou ≤ 25 mm para ceftriaxona para *E. coli* e *Klebsiella* spp.;

e \leq 22mm para cefpodoxima, ceftazidima ou cefotaxima para *P. mirabilis*. Porém, em todos esses casos, o CLSI sugere a realização de um teste confirmatório (CLSI, 2009).

Outra opção para triagem dos micro-organismos produtores de ESBL é o uso de ágar cromogênico. Esses produtos têm sido elaborados por várias indústrias e baseiam-se na inclusão de cefalosporina na composição do ágar, associado a um substrato cromogênico que facilite a detecção. Outra opção é a utilização de meios como MacConkey suplementados com ceftazidima ou cefotaxima (1 μ g/ml) (PATERSON; BONOMO, 2005; GLUPCZYNSKI *et al.*, 2007; RANDALL *et al.*, 2009).

De modo geral, os métodos de triagem se baseiam no padrão de suscetibilidade das cepas às oximino-cefalosporinas e ao aztreonam, sendo que a sensibilidade e especificidade dos testes variam com o antimicrobiano testado. Algumas investigações têm sugerido que ambos os testes de diluição ou disco difusão, usando cefpodoxima, detectam mais ESBL que outras cefalosporinas como ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona (CARTER *et al.*, 2000). No entanto, estudos posteriores sugerem que teste de suscetibilidade usando cefpodoxima pode elevar o número de falsos positivos quando os critérios do CLSI são aplicados (LEE *et al.*, 2001). Também quando outras padronizações, como a Britânica (*British Society for Antimicrobial Chemoterapy* – BCSA) são utilizadas, são obtidos melhores resultados quando se utilizam dois substratos – ceftazidima e ceftriaxona – e a cefpodoxima sozinha apresenta muitos resultados falsos positivos (HOPE *et al.*, 2007).

Diferenças na habilidade de detecção de ESBL das diversas cefalosporinas podem ocorrer em regiões diferentes, devido ao tipo de enzima predominante. Isso demonstra a importância de se adaptar os testes de detecção de ESBL para as áreas geográficas, hospitais e gêneros bacterianos particulares. Além disso, esses testes devem ser avaliados periodicamente, monitorando, assim, a introdução de novas enzimas (NAVON-VENEZIA *et al.*, 2003).

2.18.1.2 Teste de duplo disco difusão

Método idealizado por Jalier *et al.* (JARLIER *et al.*, 1988), também é denominado teste de disco aproximação. O teste consiste na colocação de discos de cefalosporinas de amplo espectro como ceftazidima, cefuroxima, cefotaxima e

aztreonam, distantes 30 mm (centro a centro) de um disco que contenha um inibidor de β -lactamase, de preferência ácido clavulânico. A produção de ESBL é indicada por uma deformação (aumento) nos halos de inibição ao redor dos discos dos β -lactâmicos. No entanto, em algumas amostras, o espaço de 30 mm pode não ser adequado para o teste. Dessa maneira, o teste deverá ser repetido, utilizando distâncias mais apropriadas, que variam entre 20-30 mm. Por outro lado, a interpretação dos resultados é altamente subjetiva e requer experiência por parte do técnico que a realiza (LIVERMORE; BROWN, 2001).

2.18.1.3 Teste tridimensional

O teste tridimensional é uma modificação do teste de disco difusão, com um passo adicional que envolve a aplicação de um inóculo bacteriano padrão em uma fenda circular no ágar, localizado a 3 mm do local de aplicação dos discos em direção ao interior da placa. As cepas ESBL apresentam distorções na zona de inibição. Essa modificação tem a vantagem da determinação simultânea da suscetibilidade aos antimicrobianos e do perfil de atividade da β -lactamase (THOMSON; SANDERS, 1992).

2.18.1.4 Teste de adição de ácido clavulânico

O método consiste em adicionar inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico ou sulbactam, a antimicrobianos como cefuroxima, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona ou aztreonam. Quando se usa discos combinados (30 μ g de cefpodoxima, ceftazidima ou cefotaxima versus 30 μ g de cefpodoxima, ceftazidima ou cefotaxima mais 10 μ g de ácido clavulânico), um aumento do diâmetro dos halos de inibição ≥ 5 mm na presença do inibidor – em comparação aos halos dos discos não adicionados de ácido clavulânico – é evidência presuntiva da produção de ESBL (CLSI, 2009).

Em métodos dilucionais, pode-se comparar a CIM das cefalosporinas isoladas e associadas a 2 μ g/ml de ácido clavulânico. Uma diminuição ≥ 3 diluições na presença do inibidor é indicativa da produção de ESBL (CLSI, 2009).

2.18.1.5 E-test®

A metodologia do E-test® para a detecção de ESBL, avaliada por Cormican *et al.* (CORMICAN; MARSHALL; JONES, 1996), utiliza uma fita especial de E-test®. Em uma extremidade, a fita contém concentrações crescentes de ceftazidima, cefotaxima ou cefepime, enquanto na outra, o mesmo antimicrobiano associado a uma concentração fixa (2 µg/ml) de ácido clavulânico. Assim, é possível determinar a CIM do antimicrobiano sozinho e associado a um inibidor. Quando a razão entre ceftazidima e ceftazidima mais ácido clavulânico, cefotaxima e cefotaxima mais ácido clavulânico ou cefepime e cefepime mais ácido clavulânico for ≥ 8 , presume-se que há produção de ESBL.

2.18.1.6 Outros métodos fenotípicos

Entre os métodos automatizados o Vitek 2® (bioMérieux Vitek, França) é o mais utilizado. O cartão apresenta os antimicrobianos cefepime (1,0 µg/ml), ceftazidima (0,5 µg/ml) e cefotaxima (0,5 µg/ml) sozinhos e associados ao ácido clavulânico na concentração de 4 µg/ml. A redução no crescimento da amostra bacteriana na cavidade que contém a associação do antimicrobiano β -lactâmico, com o inibidor de β -lactamases, quando comparada com o nível de crescimento da cavidade que contém somente o antimicrobiano, é indicativa da presença de ESBL. A análise é realizada por um sistema chamado *Advanced Expert System* (SANDERS *et al.*, 1996; DRIEUX *et al.*, 2008).

O sistema automatizado Phoenix® (Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA) usa cinco testes, incluindo cefalosporinas e combinações para pesquisa de ESBL. São eles: cefpodoxima, ceftazidima, ceftazidima com ácido clavulânico, cefotaxima, cefotaxima com ácido clavulânico. Os resultados, assim como no Vitek, são interpretados por um módulo computadorizado (DRIEUX *et al.*, 2008).

O sistema automatizado Walk-away® (Dade Behring, CA, EUA) determina o sinergismo com clavulanato a partir da concentração inibitória mínima obtida no painel MicroScan ESBL plus, no qual são testados aztreonam (0.5–16 µg/ml); cefepime (1–32 µg/ml); cefotetan (1–32 µg/ml); cefpodoxima (0.5–64 µg/ml); cefotaxima (0.5–128 µg/ml); cefotaxima/clavulanato (0.125/4–16/4 µg/ml); cefoxitina

(2–32 µg/ml); ceftazidima (0.5–128 µg/ml); ceftazidima/clavulanato (0.125/4–16/4 µg/ml); ceftriaxona (1–64 µg/ml). Uma diferença ≥ 3 diluições entre a CIM obtida com a cefalosporina sozinha, comparada a cefalosporina com ácido clavulânico é considerada positiva para ESBL (STURENBURG *et al.*, 2004).

2.18.1.7 Detecção de ESBL em espécies diferentes de *E. coli* e *Klebsiella* spp.

A busca da melhora na detecção de ESBL em outros micro-organismos não *Klebsiella* spp. e não *E. coli* não tem recebido muita atenção. Métodos baseados na ação de inibidores fornecem melhores resultados em bactérias que não produzem outras β -lactamases resistentes aos inibidores como o tipo AmpC, porque altos níveis de AmpC podem não permitir o reconhecimento de ESBL. Esse problema é maior em bactérias que possuem β -lactamases cromossômicas induzíveis, como *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Aeromonas* spp., *M. morgani*, *C. freundii*, *Hafnia alvei* e *P. aeruginosa*.

Para detectar ESBL nessas espécies, são necessárias algumas modificações nos testes fenotípicos. Algumas das modificações sugeridas estão descritas abaixo:

- a) Usar tazobactam ou sulbactam como inibidor de ESBL no lugar de ácido clavulânico. Nesses micro-organismos, o clavulonato pode ser um forte indutor da produção de AmpC, produzindo um resultado falso negativo para produção de ESBL. Como tazobactam e sulbactam são menos indutores, devem ser preferidos ao clavulonato nos testes para esses micro-organismos (THOMSON, 2001);
- b) Incluir o cefepime no teste de triagem e nos testes confirmatórios. Altos níveis de expressão de AmpC têm efeito mínimo na atividade de cefepime, o que faz dessa droga um agente de detecção de ESBL na presença de AmpC (THOMSON, 2001; GARCIA; DE LA GANDARA; GARCIA, 2010);
- c) Reduzir a distância entre os discos no teste de duplo disco difusão para 20 mm (PITOUT *et al.*, 2003);
- d) Incluir inibidores de AmpC, como cloxacilina, ácido borônico, ou outro, que podem ser incluídos no ágar Mueller Hinton ou no disco de cefalosporina com

ácido clavulânico. O objetivo é inibir a AmpC e favorecer a detecção de ESBL (GARCIA; DE LA GANDARA; GARCIA, 2009).

Mesmo com essas sugestões, ainda não existe uma metodologia recomendada para detecção de ESBL nessas espécies.

2.18.2 Métodos de detecção molecular

Os métodos moleculares permitem detectar e definir o tipo de ESBL presente. O estudo do ponto isoelétrico (pI) tem sido bastante útil na detecção da presença de β -lactamases, além de sugerir o tipo enzimático presente. Porém, várias enzimas do tipo TEM, que correspondem a mais de 100 tipos, possuem pI idênticos, o que torna a determinação do tipo de ESBL somente pelo pI impossível. Uma situação semelhante é encontrada em enzimas do tipo SHV, CTX-M e OXA (BRADFORD, 2001; GARCIA; DE LA GANDARA; GARCIA, 2010).

Uma detecção precoce de genes de β -lactamases pode ser feita usando-se sondas para enzimas específicas, como TEM e SHV. Contudo, o uso dessas sondas aumenta o trabalho laboratorial, sem resultados satisfatórios (MABILAT; COURVALIN, 1990). O método molecular mais simples e mais utilizado para detectar as enzimas é a PCR, usando iniciadores específicos para os genes de β -lactamases. As sequências podem ser escolhidas usando sequências publicadas no Genbank. Esses iniciadores são escolhidos de forma a se hibridizar com regiões mais estáveis, que geralmente não sofrem mutações (SHAH *et al.*, 2004). No entanto, a PCR não discrimina entre os diferentes tipos de TEM, SHV ou CTX. Muitos métodos adicionais para detecção e diferenciação sem sequenciamento têm sido sugeridos, por exemplo: PCR-RFLP (*Restriction Fragment Leng Polymorphism*) (ARLET *et al.*, 1995) e PCR-SSCP (*Single-Strand Conformational Polymorphism*) (SPELDOOREN *et al.*, 1998). Mas, o método padrão continua sendo o sequenciamento da cadeia específica dos nucleotídeos dos genes das β -lactamases (BRADFORD, 2001; BUSH; JACOBY, 2010; GARCIA; DE LA GANDARA; GARCIA, 2010; KIRATISIN; HENPRASERT, 2010).

Alguns métodos moleculares para pesquisa dos múltiplos genes ESBL têm sido propostos para auxiliar o diagnóstico laboratorial, como PCR multiplex para TEM, SHV e CTX-M, PCR em tempo real, pirosequenciamento, microarranjo, entre

outros (BROLUND *et al.*, 2010; COHEN STUART *et al.*, 2010; ENDIMIANI *et al.*, 2010; NAAS *et al.*, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

O presente estudo foi submetido à avaliação pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos do Hospital de Clínicas da UFPR e aprovado com os números de registro CAAE: 0207.0.208.000-10 e CEP:2288.182/2010-07, conforme documento em anexo (ver ANEXO 1).

3.2 CARACTERÍSTICAS DO HOSPITAL ESTUDADO

Para um levantamento das características do hospital foram realizadas consultas ao Sistema de Informação Hospitalar (SIH), por meio do serviço de administração e marketing e do serviço de informática do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR), relativas ao período de 2000-2010. Os dados pesquisados foram: número de leitos, número de atendimentos e internamentos, número de cirurgias e permanência hospitalar. Foi realizado também um levantamento sobre o perfil de resistência das enterobactérias isoladas no HC/UFPR nesse período e, ainda, número total de hemoculturas positivas e hemoculturas positivas com *Enterobacter* spp.. Os dados obtidos foram utilizados para a avaliação da importância clínica da detecção de ESBL em *Enterobacter* spp. (no modelo caso controle), descrita no item 3.12.

3.3 LINHAGENS BACTERIANAS

3.3.1 Amostras

Foram estudadas 1827 amostras de enterobactérias isoladas de pacientes internados no HC-UFPR, no período de agosto de 2003 a março de 2008. A identificação foi realizada pelo sistema automatizado Vitek® (bioMérieux) e confirmada por uma bateria de provas bioquímicas específicas (JANDA *et al.*, 1994; SANDERS; SANDERS, 1997; PODSCHUN; ULLMANN, 1998; O'HARA C, 2005).

Após o período escolhido para coleta de amostras, houve vigilância contínua do perfil de sensibilidade das enterobactérias isoladas no hospital. Nesse período

(março 2008 a dezembro de 2010), seis amostras com perfil de resistência compatíveis com a produção de outras β -lactamases (não ESBLs) foram incluídas no trabalho.

3.3.2 Linhagens controle

As linhagens controle utilizadas nas provas fenotípicas e nas reações de PCR estão descritas no QUADRO 5.

Cepa	Características
<i>E. coli</i> RJ-15317 ^a	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{CTX-M-2}
<i>E. coli</i> RJ-694 ^a ,	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{CTX-M-9}
<i>E. aerogenes</i> RJ-159835 ^a	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{CTX-M-8}
<i>E. cloacae</i> RJ-36546 ^a	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{CTX-M-8}
<i>K. pneumoniae</i> TEM-3 SP ^b	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{TEM}
<i>K. pneumoniae</i> SHV-5 SP ^c	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{SHV} e ponto isoelétrico
<i>K. pneumoniae</i> FOX 190 ^b	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{FOX} e ponto isoelétrico
<i>K. pneumoniae</i> LAT-1 462 ^b	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{LAT} e testes fenotípicos para AmpC
<i>K. pneumoniae</i> ACC 346 ^b	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{ACC} e testes fenotípicos para AmpC
<i>K. pneumoniae</i> DHA 405 ^b	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{DHA} e testes fenotípicos para AmpC
<i>E. coli</i> MIR 302 e TEM-1 ^b	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{MIR} e ponto isoelétrico
<i>P. aeruginosa</i> GES-5 SP ^b	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{GES} e ponto isoelétrico
<i>S. marcescens</i> BES-1 RJ ^a	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{BES}
<i>A. baumannii</i> OXA-23 PR ^c	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{OXA}
<i>E. cloacae</i> 532 PR ^c	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{PER-2}
<i>P. aeruginosa</i> P1088 ^b	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{SPM}
<i>A.baumannii</i> 17-4 ^b	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{IMP}
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA1705 ^d	Controle positivo PCR <i>bla</i> _{KPC} e Teste de Hodge
<i>E. coli</i> ATCC 25922 ^d	Controle dos testes de sensibilidade
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 70063 ^d	Controle positivo fenótipo ESBL

QUADRO 5 – RELAÇÃO DAS CEPAS CONTROLE USADAS NOS TESTES FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: Procedência das cepas controles: ^a Doada por Dr. Jorge Sampaio (Laboratório Fleury); ^b Doada por Dra. Ana C. Gales (Laboratório Alerta-LEMC), ^c Obtida nesse estudo, caracterizada por sequenciamento do gene de resistência; ^d Obtida comercialmente.

3.4 TRIAGEM DE ISOLADOS PRODUTORES DE β -LACTAMASES

As amostras foram submetidas primeiramente ao teste de suscetibilidade a antimicrobianos, para seleção das amostras com sensibilidade reduzida a cefalosporinas de terceira geração e/ou aztreonam, cefoxitina e carbapenêmicos.

O antibiograma foi realizado através do método descrito por Bauer *et al.* (BAUER *et al.*, 1966b), conforme padronização da CLSI 2009, usando discos de ceftazidima, cefotaxima, cefpodoxima, cefepime, aztreonam, cefoxitina, imipenem, meropenem (Newprov[®], Pinhais, Brasil) e ertapenem (Oxoid[®], Cambridge, UK).

A suspensão do inóculo foi preparada com colônias puras, em fase log de crescimento, em diluição 0,5 da escala de MacFarland. Essa suspensão foi semeada com auxílio de *swab* em placas de ágar Mueller Hinton (MHA) (Oxoid[®], Cambridge, UK) e os discos contendo antimicrobianos foram colocados em seguida. As placas foram incubadas a 37°C/18-24 horas e após esse período foi realizada a leitura.

Amostras de enterobactérias que apresentaram os halos de inibição de ≤ 17 mm para cefpodoxima (CPD) (exceto *P. mirabilis*, para o qual foram utilizados pontos de corte ≤ 22 mm para CPD), ≤ 22 mm para ceftazidima (CAZ), ≤ 25 mm para ceftriaxona (CRO), ≤ 27 mm para cefotaxima (CTX), 27 mm para aztreonam (ATM) para um ou mais β -lactâmicos foram selecionadas para pesquisa de ESBL (CLSI, 2009).

As amostras de *E. coli*, *P. mirabilis* e *Klebsiella* spp. com o mesmo perfil acima e, ainda, halo ≤ 17 mm para cefoxitina (CFO) foram selecionadas também para pesquisa de AmpC plasmidiana (CLSI, 2010). As amostras que apresentaram juntamente com a redução de suscetibilidade às cefalosporinas, halo ≤ 21 mm para ertapenem (ERT) e/ou imipenem (IPM) e/ou meropenem (MER) foram selecionadas também para pesquisa de carbapenemases (CLSI, 2009b), de acordo com o fluxograma representado na FIGURA 3.

Colônias puras e isoladas em ágar não seletivo foram transferidas para criotubos contendo caldo infusão cérebro coração (BHI) (Oxoid[®], Cambridge, UK) com 15% de glicerol até obter uma suspensão densa, que foi armazenada em freezer a -80° C até a realização dos demais testes.



FIGURA 3 – SELEÇÃO DAS AMOSTRAS PARA PESQUISA DAS DIFERENTES β -LACTAMASES. FONTE: O autor (2010).

NOTA: * exceto *P. mirabilis* para o qual foi usado o ponto de corte ≤ 22 .

3.5 PESQUISA DE ESBL

3.5.1 Testes fenotípicos

Foram realizados para as amostras selecionadas como possíveis produtoras de ESBL, segundo os critérios estabelecidos no item 3.3 (FIGURA 3 – perfil 1).

3.5.1.1 Método do disco combinado

O teste foi realizado pelo método de disco difusão, utilizando a técnica padronizada pelo CLSI. Foram testados discos de ceftazidima (30 μ g), cefotaxima (30 μ g), cefpodoxima (10 μ g), e esses mesmos discos contendo ácido clavulânico (10 μ g) (Himedia [®], Mumbai, Índia). O aumento do diâmetro do halo de suscetibilidade (≥ 5 mm) na presença do inibidor em comparação aos halos das cefalosporinas não adicionados de ácido clavulânico foi considerado evidência da produção de ESBL (CLSI, 2009).

3.5.1.2 Duplo disco difusão

O teste foi realizado pelo método de disco difusão, segundo técnica descrita por Jalier e colaboradores (JARLIER *et al.*, 1988) e modificada por Pitout e colaboradores (PITOUT *et al.*, 2003), colocando-se um disco de amoxicilina/clavulonato no centro e discos de aztreonam, cefepime, ceftazidima e cefotaxima a uma distância de 20 mm centro a centro. Uma deformação do halo de inibição ou aparecimento de zona fantasma entre o disco de qualquer β -lactâmico e o de amoxicilina/clavulonato foi considerada evidência da produção de ESBL.

3.5.1.3 Disco combinado usando inibidores de AmpC no disco ou ágar

Os testes foram realizados pelo método de disco difusão, descrito no CLSI 2009, com as modificações descritas a seguir. As modificações dos testes de detecção de ESBL, utilizando inibidores de AmpC nos discos e nos meios, a fim de melhorar a sensibilidade em produtores de AmpC induzíveis, foram realizadas conforme sugestões de vários autores (SONG *et al.*, 2007a; SONG *et al.*, 2007b; JEONG *et al.*, 2008; JACOBY, 2009; JEONG *et al.*, 2009; GARCIA; DE LA GANDARA; GARCIA, 2010).

Foram testadas 90 amostras, sendo elas 83 *Enterobacter* spp. ESBL (47 *E. cloacae*, 36 *E. aerogenes* e 1 *E. gergoviae*) e 7 *Enterobacter* spp. não-ESBL (4 *E. cloacae* e 3 *E. aerogenes*). As amostras foram caracterizadas como ESBL ou não ESBL, pelas técnicas de PCR e sequenciamento, como descritas nos itens 3.4.2 e 3.9. Foram avaliadas as quatro modificações no teste de disco combinado, descritas abaixo:

- a) **Disco combinado com ácido clavulânico (AC) e ácido fenil borônico (APB)**: foram preparadas soluções estoque de APB 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e AC 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, que foram conservadas a -80°C até o uso. A solução de APB (10 μL) foi adicionada aos discos de cefepime (CPM), ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX), 30 minutos antes da realização do teste. Da mesma forma, as soluções de AC (10 μL) mais APB (10 μL) foram adicionadas a outros discos de CPM, CAZ e CTX. Os halos de inibição obtidos das cefalosporinas

combinadas ao APB (300 µg) e AC (10 µg) foi comparada com as cefalosporinas combinada ao APB (300 µg).

- b) Disco combinado com ácido clavulânico e cloxacilina (CLX):** foram preparadas soluções estoque de cloxacilina 50 µg/µL e ácido clavulânico 1 µg/µL e a mesmas foram conservadas a – 80°C até o uso. A solução de CLX (10 µL) foi adicionada aos discos de CPM, CAZ e CTX, 30 minutos antes da realização do teste. Da mesma forma, as soluções de AC (10 µL) mais CLX (10 µL) foram adicionadas a outros discos de CPM, CAZ e CTX. Os halos de inibição obtidos das cefalosporinas combinadas ao CLX (500 µg) e AC (10 µg) foi comparada com as cefalosporinas combinada ao CLX (500 µg).
- c) Disco combinado com ácido clavulânico em ágar Mueller Hinton (MHA) com APB:** foi preparada uma solução estoque de APB (15 mg/ml) e a mesma foi conservada a – 80°C até o uso. O MHA foi preparado e esterelizado segundo recomendações do fabricante e 1 ml de APB foi adicionado assepticamente a 49 ml de MHA, para confecção de cada placa (150 mm) utilizada na realização dos testes. O teste foi executado como no método de disco combinado com ácido clavulânico, mas em MHA com APB (300 µg/ml). Foi comparado o halo de inibição entre as cefalosporinas e as cefalosporinas combinadas com AC.
- d) Disco combinado com ácido clavulânico em ágar Mueller Hinton (MHA) com CLX:** foi preparada uma solução estoque de CLX (25 mg/ml), que foi conservada a – 80°C até o uso. O MHA foi preparado e esterelizado segundo recomendações do fabricante e 1 ml de CLX foi adicionado assepticamente a 49 ml de MHA para confecção de cada placa (150 mm) utilizada na realização dos testes. O teste foi realizado como no método de disco combinado com ácido clavulânico, mas em MHA com CLX (500 µg/ml). Foi comparado o halo de inibição entre as cefalosporinas e as cefalosporinas combinadas ao AC.

3.5.2 Detecção dos genes que codificam as ESBLs

Todas as amostras com sensibilidade reduzida a cefalosporinas de terceira geração foram testadas por PCR para pesquisa dos genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}. (ítem 3.3, FIGURA 3, perfil 1). As que foram negativas para ESBL após PCR e sequenciamento dos três primeiros genes foram testadas também para *bla*_{PER},

*bla*_{OXA}, *bla*_{GES}, *bla*_{BES}. Os oligonucleotídios iniciadores (do inglês *primers*) utilizados e o peso molecular dos produtos obtidos estão descritos no QUADRO 6. Os reagentes utilizados, as condições de amplificação e o método de detecção dos produtos de PCR estão descritos no ANEXO 2.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Produto (pb)	Fonte
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	F AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC R AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT	415	(WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006)
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	F CGA CGC TAC CCC TGC TAT T R CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG	552	(WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006)
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	F TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC R AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	666	(WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006)
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	F CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG R ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC	205	(WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006)
<i>bla</i> _{CTX-M-25}	F GCA CGA TGA CAT TCG GG R AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	327	(WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006)
<i>bla</i> _{TEM}	F ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG R CCA ATG CTT AAT TCA GTG ACG	840	(THOMSOM, 1998)
<i>bla</i> _{SHV}	F TCA GCG AAA AAC ACC TTG R TCC CGC AGA TAA ATC ACC A	500	(THOMSOM, 1998)
<i>bla</i> _{PER}	F TGTGTTTTTCACCGCTTCTGCTCTG R AGCTCAAAGTATAAGCCGCTTG	540	(QUINTEROS <i>et al.</i> , 2003)
<i>bla</i> _{OXA-51}	F TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG R TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG	353	(WOODFORD <i>et al.</i> , 2006)
<i>bla</i> _{OXA-23}	F GAT CGG ATT GGA GAA CCA GA R ATT TCT GAC CGC ATT TCC AT	501	(WOODFORD <i>et al.</i> , 2006)
<i>bla</i> _{OXA-24}	F GGT TAG TTG GCC CCC TTA AA R AGT TGA GCG AAA AGG GGA TT	246	(WOODFORD <i>et al.</i> , 2006)
<i>bla</i> _{OXA-58}	F AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG R CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC	599	(WOODFORD <i>et al.</i> , 2006)
<i>bla</i> _{GES}	F ATGCGCTTCATTACGCA R CTATTTGTCCGTGCTCAGG	860	(POIREL <i>et al.</i> , 2000)
<i>bla</i> _{BES}	F GTG GTT GCT GGT GGT GAT AG R CGG GCT GGG TAA AGT AGA TG	766	Este estudo

QUADRO 6 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA PESQUISA DE ESBL E TAMANHO DOS PRODUTOS ESPERADOS.

NOTA: F = Forward ou iniciador sense; R = reverse ou iniciador antissense.

3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM ÁGAR

Todas as amostras produtoras de ESBL foram testadas para os seguintes antimicrobianos: aztreonam, cefepime, cefoxitina, ceftriaxona, ceftazidima, (Sigma Chemical CO – Louis, USA), imipenem, ertapenem (Merk Sharp & Dohme

Farmacêutica Ltda- Campinas, Brasil), meropenem (AstraZeneca – UK) e tigeciclina (Wyeth – USA).

Os antimicrobianos liofilizados foram diluídos em água ultrapura em concentração 50 vezes a maior concentração a ser utilizada. Diluições seriadas dos antimicrobianos foram incorporadas ao ágar Mueller Hinton na proporção 1 ml do antimicrobiano e 49 ml de ágar. O inóculo bacteriano foi preparado na diluição igual à escala 0,5 de MacFarland e diluído 1:10, de forma que uma quantidade igual a 10.000 UFC (1-2 µL da suspensão bacteriana) foi depositada na superfície da placa, usando um multi-inoculador. As placas inoculadas contendo as várias concentrações de antimicrobianos foram incubadas a 37°C/18-24 horas e após esse período foi realizada a leitura. Foi considerada como concentração inibitória mínima (CIM) a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento da bactéria (CLSI, 2009a).

3.7 PESQUISA DE AmpC PLASMIDIANA EM *Klebsiella* spp. E *E. coli*

Foi realizada para amostras de *E. coli* e *Klebsiella* spp. selecionadas no teste de triagem (item 3.3, FIGURA 3, perfil 2) e para 3 amostras com o mesmo perfil isoladas em 2010.

3.7.1 Testes fenotípicos

3.7.1.1 Disco combinado com cloxacilina (CLX)

Foi preparada uma solução estoque de cloxacilina 50 µg/µL e a mesma foi conservada a – 80°C até o uso. A solução (10 µL) foi adicionada aos discos de cefoxitina (CFO), ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX), 30 minutos antes da realização do teste. O teste foi realizado pela metodologia de disco difusão (CLSI, 2009), usando os discos CFO (30 µg), CAZ (30 µg), CTX (30 µg) e os mesmos discos combinados a 500 µg de CLX. Foram consideradas positivas amostras nas quais o halo da cefalosporina associada à cloxacilina foi 5 mm maior que o halos da cefalosporina sozinha (DOI; PATERSON, 2007).

3.7.1.2 Disco combinado com ácido fenil borônico (APB)

Foi preparada uma solução estoque de ácido fenil borônico 30 µg/µL e a mesma foi conservada a – 80°C até o uso. A solução (10 µL) foi adicionada aos discos de cefoxitina (CFO), ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX), 30 minutos antes da realização do teste. O teste foi realizado pela metodologia de disco difusão (CLSI, 2009), usando os discos CFO (30 µg), CAZ (30 µg), CTX (30 µg) e os mesmos discos adicionados combinados a 300 µg da solução de APB. Foram consideradas positivas amostras nas quais o halo da cefalosporina associada ao APB foi 5 mm maior do que os halos da cefalosporina sozinha (SONG *et al.*, 2007b).

3.7.2 Detecção dos genes que codificam AmpC plasmidiana

Foi usada uma técnica de PCR multiplex com oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada um dos seguintes grupos de enzimas MOX, CMY, LAT, BIL, DHA, ACC, MIR, ACT e FOX (PEREZ-PEREZ; HANSON, 2002). A sequência dos iniciadores e tamanho do produto esperado encontram-se no QUADRO 7. Os reagentes utilizados, as condições de amplificação e o método de detecção dos produtos de PCR estão descritos no ANEXO 2.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Produto (pb)
<i>bla</i> _{MOX-1} ; <i>bla</i> _{MOX-2} <i>bla</i> _{CMY-1} ; <i>bla</i> _{CMY-8} a <i>bla</i> _{CMY-11}	F GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT R CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	520
<i>bla</i> _{LAT-1} a <i>bla</i> _{LAT-4} <i>bla</i> _{CMY-2} a <i>bla</i> _{CMY-7} ; <i>bla</i> _{BIL-1}	F TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA R TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	462
<i>bla</i> _{DHA-1} ; <i>bla</i> _{DHA-2}	F AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T R CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	405
<i>bla</i> _{ACC}	F AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T R TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	346
<i>bla</i> _{MIR-1} ; <i>bla</i> _{ACT-1}	F TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG R TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG	302
<i>bla</i> _{FOX-1} a <i>bla</i> _{FOX-5}	F AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G R CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	190

QUADRO 7 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA PESQUISA DE AmpC PLASMIDIANA E TAMANHO DOS PRODUTOS ESPERADOS.

FONTE: PEREZ-PEREZ; HANSON (2002).

NOTA: F = Forward ou iniciador sense; R = reverse ou iniciador antissense.

3.8 PESQUISA DE CARBAPENEMASES

Foram pesquisadas carbapenemases em todas as amostras selecionadas, segundo critérios estabelecidos (item 3.3, FIGURA 3, perfil 3) e para 3 amostras de *K. pneumoniae* triadas usando os mesmos critérios, isoladas em 2010.

3.8.1 Método fenotípico (Teste de Hodge)

Foi realizado segundo CLSI 2009, inoculando-se *E. coli* ATCC 25922, em suspensão na escala 0,5 de MacFarland, diluída 1:10, em uma placa de ágar Mueller Hinton, colocando-se um disco de meropenem no centro da placa e amostras, controle positivo e controle negativo como estrias do disco até a borda. Foram consideradas produtoras de carbapenemase amostras que favoreceram o crescimento da *E. coli* ATCC próximo ao disco do carbapenêmico (CLSI, 2009).

3.8.2 Detecção dos genes que codificam carbapenemases

3.8.2.1 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)

Foram pesquisados utilizando a técnica de PCR com oligonucleotídeos iniciadores descritos no QUADRO 8. Os reagentes utilizados, as condições de amplificação e o método de detecção dos produtos de PCR estão descritos no ANEXO 2.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Produto (pb)
<i>bla_{KPC}</i>	F CTGTCTTGTCTCATGGCC R CCTCGCTGTGCTTGTCATCC	680

QUADRO 8 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA PESQUISA DE KPC E TAMANHO DOS PRODUTOS ESPERADOS

FONTE: NAAS *et al.*, 2008.

NOTA: F = Forward ou iniciador sense; R = reverse ou iniciador antissense.

3.8.2.2 Metalo β -lactamases (M β L)

Os genes para produção de M β L foram pesquisados utilizando-se a técnica de PCR com oligonucleotídeos iniciadores descritos no QUADRO 9. Os reagentes utilizados, as condições de amplificação e o método de detecção dos produtos de PCR estão descritos no ANEXO 2.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Produto (pb)
<i>bla_{IMP}</i>	F GAATAGGATGGCTTAATTCTC R CCAAACACTACTACGTTATC	188
<i>bla_{SPM}</i>	F CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG R CCTTTTCCGCGACCTTGATC	798

QUADRO 9 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NA PESQUISA DE M β L E TAMANHO DOS PRODUTOS ESPERADOS

FONTE: MENDES *et al.*, 2007).

NOTA: F = Forward ou iniciador sense; R= reverse ou iniciador anti sense

3.9 ANÁLISE DA SIMILARIDADE GENÉTICA DAS AMOSTRAS

Foi realizada a técnica de eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE) em todas as amostras positivas para CTX-M, grupo de ESBL prevalente no hospital. Essa técnica foi utilizada, também, para as amostras de *Enterobacter* spp.-ESBL isolados de hemocultura e para as amostras positivas para KPC e para AmpC plasmidiana.

3.9.1 Preparo das amostras – confecção dos blocos com DNA

No preparo das amostras, foram utilizadas suspensões bacterianas em tampão SE (75mM NaCl e 25mM EDTA) a uma turvação da escala 3 de MacFarland. Foi misturado igual volume da suspensão bacteriana e de agarose de baixo ponto de fusão (2%), e essa mistura foi dispensada em um molde de acrílico, que foi levado à geladeira por 30 minutos. Transcorrido esse tempo, os blocos foram transferidos para um frasco contendo 3 ml de tampão de lise para Gram-negativos (1% m/v N-lauril sarcosina, 0,5M EDTA pH 9,5), contendo proteinase K (500 μ g/ml), e incubados a 56° C por uma noite. No dia seguinte, o tampão de lise com proteinase K foi trocado e repetiu-se a incubação. Após a segunda noite de incubação, os

blocos foram lavados cinco vezes em tampão TE (10mM TRIS e 10mM EDTA) e guardados em geladeira na mesma solução até o uso.

3.9.2 Clivagem do DNA e eletroforese

Um fragmento de aproximadamente 2 mm do bloco de DNA foi colocado em um tubo de reação, coberto com 100µl de tampão da enzima de restrição e incubado a 4-8° C por 30 minutos. A seguir, trocou-se o tampão por tampão fresco adicionado de 20-30U da enzima *XbaI* (Invitrogen, Carlsbad, USA) e incubou-se os tubos de reação por no mínimo 8 horas, a 37° C. Após a digestão, os blocos e o padrão de peso molecular concatêmeros de lambda (Invitrogen, Carlsbad, USA) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão 0,5 X TBE (44,5 mM TRIS + 44,5 mM de ácido bórico + 1 mM EDTA). A eletroforese foi realizada em uma cuba e fonte CHEF – Driii (Laboratórios Bio-Rad, EUA) por 24 horas a 6 V/cm a 12° C, rampa de pulso de 5-35 segundos. Após esse período, o gel foi corado com brometo de etídio a 1µg/mL por 1 hora e fotografado sob luz ultravioleta.

3.9.3 Análise dos fragmentos de restrição

O perfil de bandas foi analisado comparativamente ao padrão de PM pelo programa Gel-Pro Analyzer 4.0 e software NTSYS 2.02. A similaridade entre as cepas foi calculada utilizando o coeficiente de similaridade de Dice e o método de grupo de pares com médias aritméticas não ponderadas (UPGMA) foi utilizado na construção dos dendogramas. Os critérios usados na análise foram os propostos por Tenover *et al.* e as adaptações propostas por Grothes e Tummler (TENOVER *et al.*, 1995; GROTHUES; TUMMLER, 1991).

3.10 SEQUENCIAMENTOS DOS PRODUTOS DA PCR

As amostras com PCR positiva para quaisquer dos genes testados tiveram os genes novamente amplificados, usando Taq polimerase *pfu* (Invitrogen, Carlsbad, USA). Os fragmentos obtidos por reação de amplificação foram sequenciados para

determinar o subtipo de β -lactamase presente. Os iniciadores, reativos e condições de amplificação foram os mesmos que na PCR para detecção do gene, com exceção dos iniciadores para amplificação das β -lactamases do tipo CTX-M, para as quais foram usados os iniciadores descritos no QUADRO 10.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Produto (pb)
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	F TGT TAG GAA GTG TGC CGC TG R GAC GGC TTT CTG CCT TAG GTT G	800
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	F ATG TTA ACG GTG ATG GCG AC R GCA TCA GAA ACC GTG GGT TAC	800
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	F TTC GCT GTT GCT GGG GAG TG R GGT GAC GAT TTT CGC GGC AG	800
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	F GAG TGC AAC GGA TGA TGT TC R CAG CCC TTC GGC GAT GAT TC	800

QUADRO 10 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DAS ESBLs DO TIPO CTX-M.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: F = forward ou iniciador sense; R = reverse ou iniciador antissense

Os produtos amplificados foram purificados com o kit de purificação GFX-TM PCR (Amershan Biosciences, Suécia) antes de realizar o sequenciamento. Para a amplificação foram usados 300 ng de DNA, 1,25 μ L do rimer, 4,0 μ L da solução GT Dye Terminator (Amershan Biosciences, Suécia) e água w-3500 (Sigma, Estados Unidos). O ciclo de amplificação foi 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 minuto e 20 segundos a 60° C, e foi repetido 30 vezes. O produto foi precipitado com acetato de amônio 7,5 M e etanol 95% e sequenciado no MegaBACE (Amershan Biosciences, Suécia) (ABI PERKIN ELMER). Esse procedimento foi realizado na Universidade de Campinas (Unicamp) com auxílio do professor Marcio José da Silva. As sequências obtidas foram analisadas nos programas ChomasPro versão 1.33 (Technelysium Pty LTs, Austrália), ClustalW (<<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>>) e, em seguida, comparadas às sequências disponíveis no banco de dados do geneBank (<<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>>).

3.11 DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO (pI)

Foi realizada a determinação do ponto isoelétrico (pI) para 31 amostras que tinham PCR positivas para os três genes testados, com a finalidade de verificar se os três genes eram expressos simultaneamente. Foi feita também para 24 amostras que possuíam teste fenotípico para ESBL positivo, porém, PCR negativa para os

genes mais comuns, a fim de verificar a presença de β -lactamases e deduzir, a partir do pl, a qual grupo pertencem (MATTHEW *et al.*, 1975).

A técnica da determinação do pl foi realizada no Laboratório Alerta, da Universidade Federal de Sao Paulo/Escola Paulista de Medicina (Unifesp/EPM), sob a supervisão da Dra. Ana Cristina Gales, conforme descrito a seguir.

As amostras foram preparadas a partir da suspensão de 10 colônias em tubos contendo 10 ml de TSB, acrescidos de ampicilina, em uma concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incubados a 37°C por 18 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de tampão de amostra (tris-HCl 1 mM e ZnSO₄ 1 mM). As amostras foram mantidas em gelo, sonicadas por 1 minuto e transferidas para um microtubo. Após esse passo, foram centrifugadas por 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi transferido para novo microtubo e mantido em gelo. O resíduo foi desprezado (CARTWRIGHT; WALEY, 1984).

Para determinar qual a quantidade do extrato a ser aplicada no gel, pipetou-se em uma placa de microdiluição 20 μL de indicador de β -lactamase (nitrocefim 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 7,0) e colocou-se 3, 5 e 7 μL de amostra em poços com nitrocefim. O menor volume que alterou a cor do nitrocefim de amarelo para vermelho foi o volume aplicado no gel.

O gel foi preparado embebendo-se o filtro superior com solução do cátodo (NaOH 1M) e inferior com solução do ânodo (H₃PO₄ 1M) para obtenção do gradiente de pH entre 3,5 a 9,5. Os controles e amostras foram aplicados aproximadamente 3 centímetros abaixo da fita superior e procedeu-se a corrida a 1500 V, 50 mA, 30 W por uma 1h30min. As β -lactamases foram visualizadas após o gel ser coberto com nitrocefim 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pH 7,0. Foi feita regressão linear usando o pl dos controles e calculou-se o pl das amostras (JACOBY; CARRERAS, 1990). Os controles usados foram *E. coli* produtoras de FOX (pl 7,2); TEM-1 (pl 5,4); MIR (pl 8,4); ACC (pl 7,7); GES (pl 5,8) e SHV (pl 8,2).

3.12 AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA CLÍNICA DA DETECÇÃO DE ESBL EM *Enterobacter* spp.

Foram obtidos os dados clínicos dos 41 pacientes com bacteremia por *Enterobacter* spp. ESBL, definidos como caso, e de 164 pacientes com bacteremia

por *Enterobacter* spp. não ESBL, definidos como controles. Os dados quanto à idade e sexo do paciente, doença de base (neoplasia, doenças do trato digestivo, doenças do aparelho respiratório, doenças cardíacas, doenças do sistema nervoso central, doenças renais), procedimentos invasivos (cateter, ventilação mecânica, traqueostomia, cirurgia, transplante, sonda vesical de demora), unidade de internamento, internamento em UTI, uso de antimicrobianos, imunossupressores ou quimioterápicos antes da cultura, dias internados antes e após a cultura e desfecho clínico (óbito, alta, óbito relacionado) foram obtidos a partir de prontuários médicos, disponibilizados pelo arquivo de prontuários do Hospital de Clínicas.

Os dados referem-se à internação em que foi isolado *Enterobacter* spp. na hemocultura, a partir da data do internamento até a data de alta ou óbito. O óbito foi considerado relacionado à infecção quando a causa do óbito descrita em prontuário era choque séptico e o último micro-organismo isolado em hemocultura tinha sido *Enterobacter* spp.. Considerou-se como terapia adequada para ESBL os carbapenêmicos e para não ESBL os carbapenêmicos e as cefalosporinas de quarta geração. Como terapias inadequadas foram consideradas as cefalosporinas de terceira geração. Os demais antimicrobianos foram considerados adequados ou não individualmente, de acordo com a observação do teste de sensibilidade a antimicrobianos da cepa isolada.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.13.1 Testes fenotípicos para detecção de ESBL em *Enterobacter* spp.

Com o objetivo de determinar pontos de corte que estejam associados à positividade dos testes, foram ajustadas Curvas de Características de Operação do Receptor (Curvas ROC – *Receiver Operating Characteristic*), considerando-se a presença de genes codificadores para produção de ESBL como padrão ouro (positivo ou negativo). O ajuste foi feito para cada método e cada antimicrobiano. Para a avaliação do ajuste, foi calculada a área abaixo da curva e testada a hipótese nula de área igual a 0,5 (ausência de discriminação do marcador). Para a avaliação da qualidade dos marcadores (métodos e antimicrobianos), foram estimados os valores de sensibilidade e especificidade com os respectivos intervalos de 95% de confiança. A análise foi feita usando-se o programa computacional SPSS v.14.0.

3.13.2 Estudo de caso controle

Os dados obtidos foram cadastrados e analisados por meio do programa Epi-info versão 3.5.1 (*Center for Diseases Control*). Foram usados os seguintes parâmetros estatísticos: teste Kruskal-Wallis para variáveis contínuas não paramétricas e teste do Qui-quadrado (grau de liberdade = 1) para variáveis categóricas. Nas variáveis em que não foi possível a utilização do teste do Qui-quadrado (valor esperado menor que cinco), foi usado o teste exato de Fisher. Para todos os testes, foi considerado um intervalo de confiança de 95%, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas, ou seja, descartavam a hipótese nula, quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DADOS GERAIS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS

4.1.1 Resultados

O Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, é um hospital público, universitário, que possui atualmente 643 leitos para internamento e 261 salas de atendimento ambulatorial. Nos últimos dez anos, foram realizados nesse hospital, em média, 792.407 atendimentos/ano e 18.699 internamentos/ano, sendo 159 internamentos/ano em UTIs. O tempo médio de permanência geral no hospital é de sete dias, quando considerado internamento em UTI essa média sobe para oito dias. As clínicas incluem serviços de alta complexidade, como transplantes de medula óssea, transplante hepático, cirurgias cardiovasculares, quimioterapia de alto risco, entre outros (<<http://www.hc.ufpr.br>>).

Os resultados dos perfis de resistência (R) dos isolados de *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. a cefepime (CPM), ertapenem (ERT), imipenem (IPM), amicacina (IPM) e ciprofloxacino (CIP), de 2000 a 2010, estão representados nos GRÁFICOS 1, 2 e 3.

No GRÁFICO 1, pode-se notar um pico de resistência de *E. coli* ao cefepime em 2001, chegando a alcançar 18% de resistência. De 2002 a 2007, a resistência manteve-se entre 8% e 12%, com redução nos anos seguintes. A resistência a carbapenêmicos foi menor que 0,5% ao longo de todo o período, com exceção de 2010, quando aproximadamente 1,3% das cepas foram resistentes ao ertapenem. A resistência ao ciprofloxacino vem aumentando desde 2005 e está próxima a 20%, provavelmente devido ao aumento no consumo de quinolonas. A amicacina apresentou menor resistência que ciprofloxacino e cefepime, porém, maior que os carbapenêmicos.

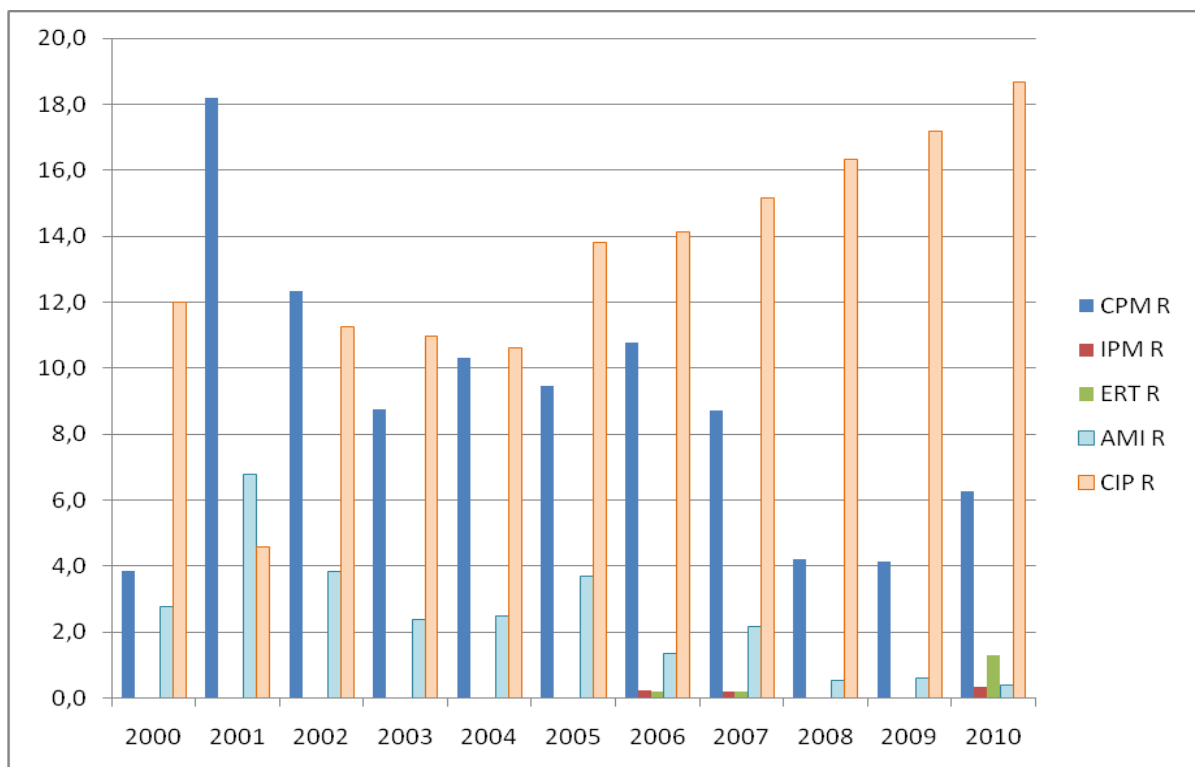


GRÁFICO 1 – PERFIL DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *E. coli* NOS ANOS 2000 A 2010
 FONTE: O autor (2010).

NOTA: R = resistência; CPM = cefepime; IPM = imipenem; ERT = ertapenem; AMI = amicacina; CIP = ciprofloxacino.

Para *Klebsiella* spp. (GRÁFICO 2) o maior índice de resistência a cefepime ocorreu em 2001, como em *E. coli*, atingindo mais de 60%. O fato deve-se a um surto que ocorreu na UTI neonatal durante esse ano. Entre os anos 2002-2007, manteve-se entre 40 a 60%, reduzindo nos anos seguintes. Raros casos de resistência a imipenem foram observados no decorrer dos 10 anos, mas a resistência ao ertapenem está aumentando, chegando a mais de 10% em 2010. A resistência a ciprofloxacino e amicacina tem tendências parecidas com a do cefepime, com redução a partir de 2007. A resistência ao ciprofloxacino variou entre 5-35% e à amicacina entre 5-15%.

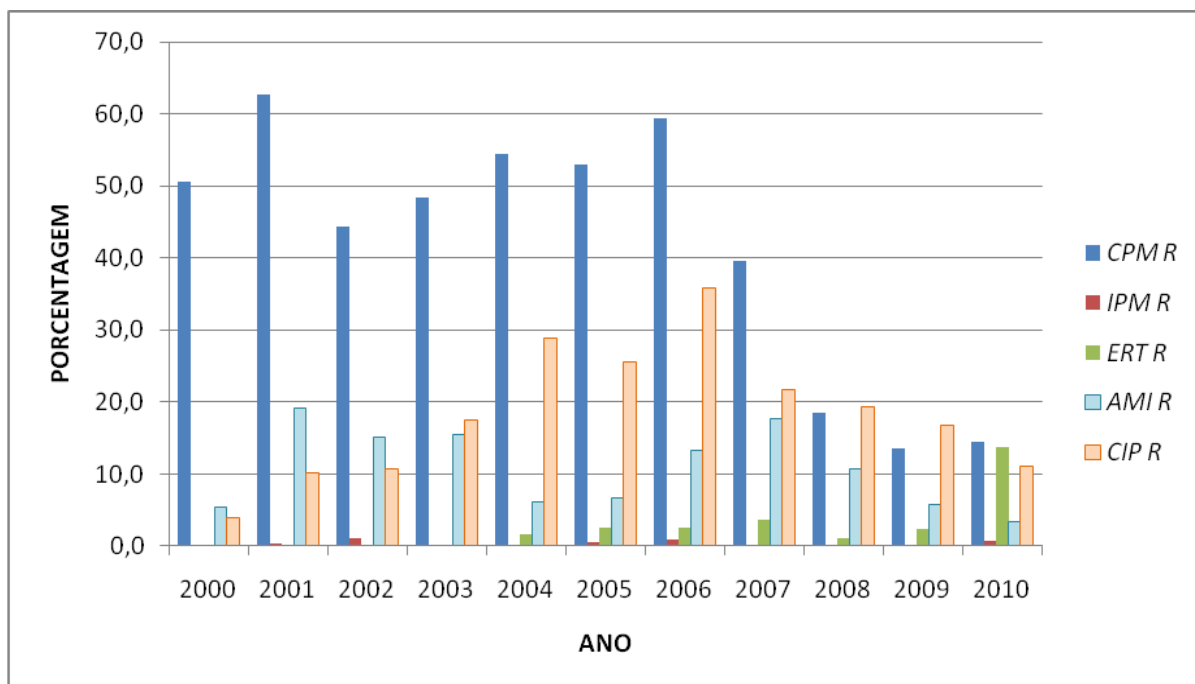


GRÁFICO 2 – PERFIL DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *Klebsiella spp.* NOS ANOS 2000 A 2010.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: R = resistência; CPM = cefepime; IPM = imipenem; ERT = ertapenem; AMI = amicacina; CIP = ciprofloxacino.

Em *Enterobacter spp.* (GRÁFICO 3), nota-se um aumento geral da resistência a partir de 2005. A resistência ao cefepime ficou entre 30% e 50% de 2004 a 2009, e próxima a 30% em 2010. A resistência ao ertapenem é a maior entre as três espécies avaliadas e chegou a 20% em 2009. A resistência ao imipenem, porém, ainda é baixa. A resistência ao ciprofloxacino é elevada, muitas vezes próxima a 50%, e a resistência à amicacina é maior que em *E. coli* e *Klebsiella spp.*, variando entre 10% e 40% no decorrer dos anos.

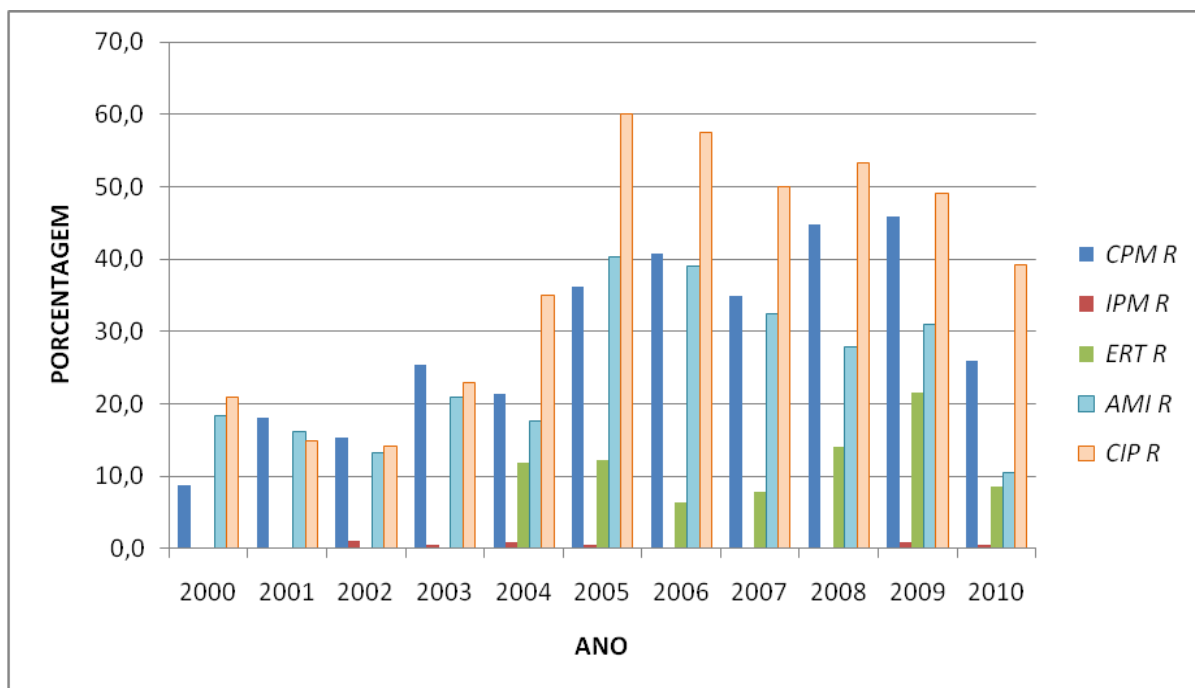


GRÁFICO 3 – PERFIL DE RESISTÊNCIA DE ISOLADOS DE *Enterobacter spp.* NOS ANOS 2000 A 2010.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: R = resistência; CPM = cefepime; IPM = imipenem; ERT = ertapenem; AMI = amicacina; CIP = ciprofloxacino.

A pesquisa de ESBL nas amostras com sensibilidade reduzida a cefalosporinas mostrou que esse é o principal mecanismo de resistência a β -lactâmicos. O estudo completo está descrito no item 4.2. As amostras ESBL positivas foram encontradas principalmente em UTIs, mas também em enfermarias, clínicas cirúrgicas, transplantes e ginecologia e obstetrícia. O número de isolados nas clínicas pode ser observado no GRÁFICO 4.

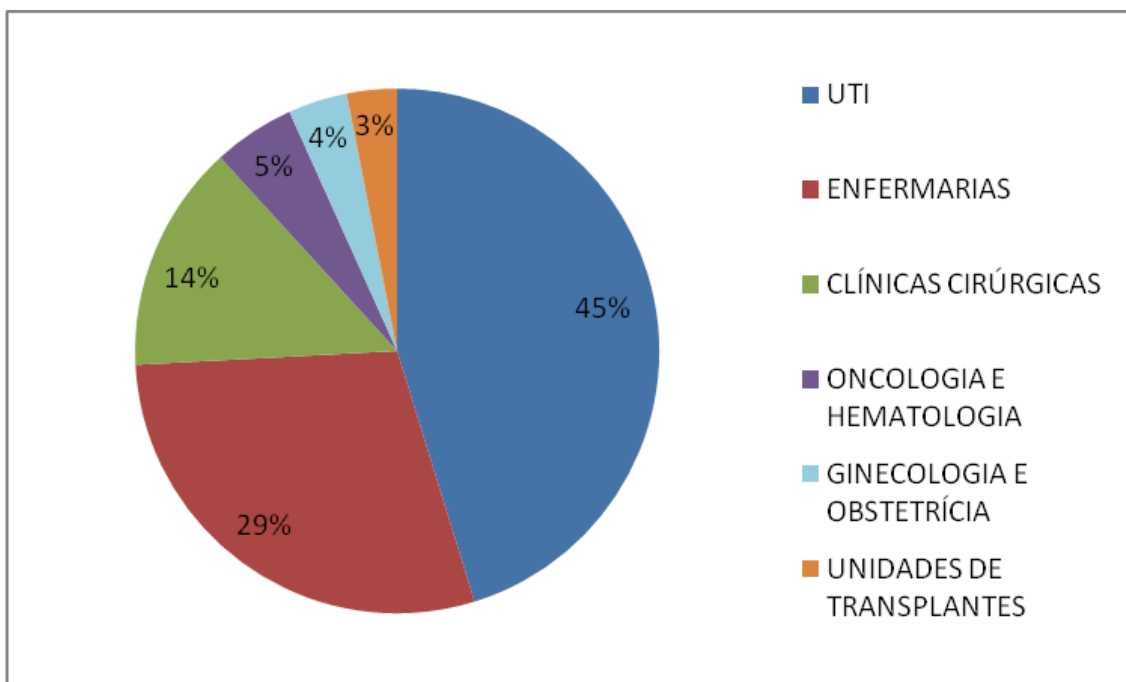


GRÁFICO 4 – DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS PRODUTORES DE ESBL NOS SETORES DO HOSPITAL DE CLÍNICAS – UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.
FONTE: O autor (2010).

O tipo de amostra clínica da qual foram isoladas as bactérias produtoras de ESBL se mostraram bastante diversas. A principal foi urina, seguida de sangue, sendo que as demais amostras clínicas (respiratórias, líquido e líquidos cavitários) contribuíram com porcentagens menores. A distribuição pode ser visualizada no GRÁFICO 5.

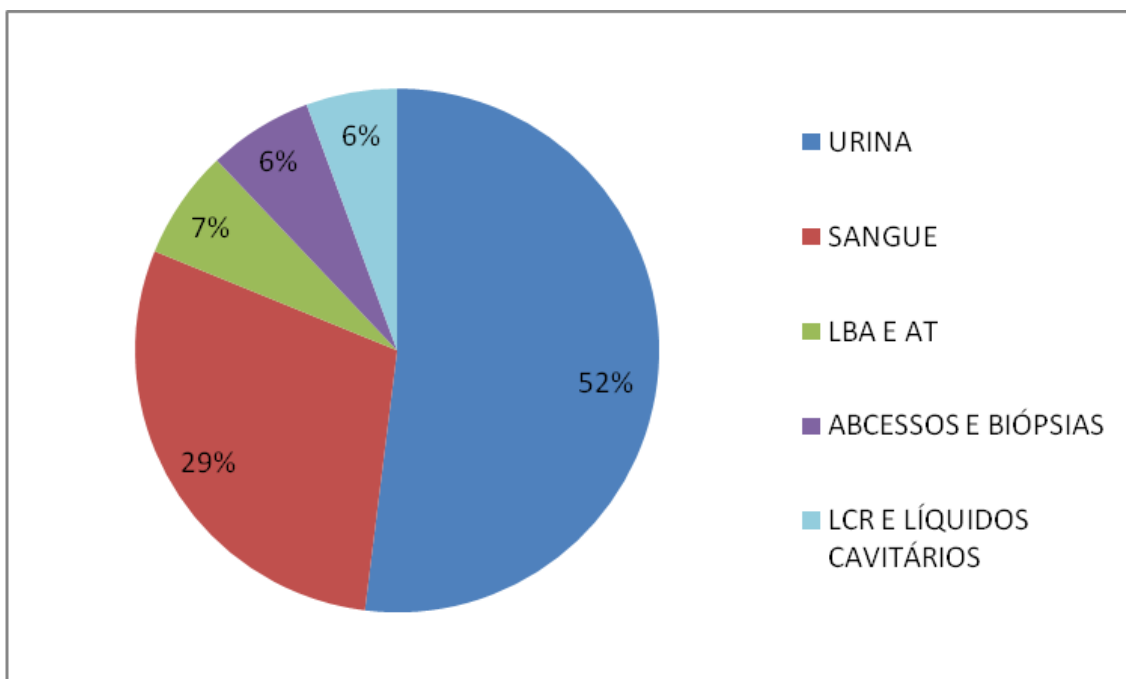


GRÁFICO 5 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS QUE APRESENTARAM ISOLADOS BACTERIANOS PRODUTORES DE ESBL.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: LBA = lavado broncoalveolar, AT = aspirado traqueal, LCR = líquido cefalorraquidiano.

4.1.2 Discussão

Não há dados nacionais ou regionais do mesmo período disponíveis na literatura para concluir se o que foi observado no hospital estudado corresponde a uma tendência ou se é apenas uma observação local, pois sabemos que a resistência varia muito com o local, tipo de instituição e uso de antimicrobianos. Dados do programa SENTRY, obtidos a partir de isolados de enterobactérias provenientes da Ásia, Europa, América do Norte e América Latina, durante os anos de 1997 e 2001, encontraram 99,9% de sensibilidade a imipenem, 97,3% à amicacina e cefepime (SADER; BIEDENBACH; JONES, 2003). O programa TEST, com isolados da mesma região, durante os anos de 1999 a 2003, encontrou mais de 99% de sensibilidade a carbapenêmicos em *K. pneumoniae*, 100% em *E. coli* e variou entre 89,8% a 100% em *Enterobacter* spp. (REINERT *et al.*, 2007). Pode-se presumir que, de forma geral, a resistência encontrada, principalmente ao cefepime, é maior que a dos dois programas citados. Além disso, os dados obtidos confirmam que a resistência aos antimicrobianos em enterobactérias é preocupante, com aumento da resistência às fluorquinolonas, emergência da resistência a

carbapenêmicos, especialmente ertapenem, além da presença de ESBL, restando poucas opções para tratamento das infecções por enterobactérias.

Esses resultados também são relevantes para direcionar a terapia empírica no hospital estudado, pois é possível verificar que os antimicrobianos com menor resistência são aminoglicosídeos e carbapenêmicos. Os aminoglicosídeos são menos indutores da resistência, mas têm indicações limitadas e elevada toxicidade, fazendo com que os carbapenêmicos sejam os antimicrobianos mais utilizados. Porém, é preciso critério, pois o uso indiscriminado de carbapenêmicos vem selecionando as cepas resistentes (LIVERMORE; PEARSON, 2007; LEIBOVICI; VIDAL; PAUL, 2009; LIVERMORE, 2009b).

Os micro-organismos multirresistentes aparecem com maior frequência em UTIs, esse dado também foi encontrado no presente trabalho. São frequentes também em clínicas oncológicas e cirúrgicas (PATERSON; BONOMO, 2005; FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009). Além disso, as bactérias produtoras de ESBL foram encontradas nas mais diversas amostras clínicas, confirmando que são importantes agentes de infecções urinárias, respiratórias, bacteremias, meningites, entre outras. O grande número de isolados de sangue evidencia os riscos associados às infecções por esses micro-organismos, pois muitos autores relacionam a bacteremia por produtores de ESBL à maior mortalidade, permanência nos hospitais e custos (TUMBARELLO *et al.*, 2007; TUMBARELLO *et al.*, 2010). O relato de ESBL em isolados clínicos de pacientes com infecções é importante para adequar o tratamento e reduzir a mortalidade (SCHWABER; CARMELI, 2007; MARCHAIM *et al.*, 2010).

No presente estudo, a produção de β -lactamases foi o mecanismo de resistência a cefalosporinas mais comum em enterobactérias. Esses dados destacam a importância da pesquisa de β -lactamases em enterobactérias, para melhor compreensão dos perfis de resistência.

4.2 PREVALÊNCIA GERAL E DE TIPOS ESPECÍFICOS DE ESBL

4.2.1 Resultados

As enterobactérias isoladas de amostras coletadas no período de 2003 a 2008 foram triadas quanto à suscetibilidade às cefalosporinas de terceira geração, aztreonam, ceftazidima e carbapenêmicos. Entre as 1827 amostras triadas, 483 (26,4%) apresentaram sensibilidade reduzida às cefalosporinas de terceira geração e/ou aztreonam, segundo os critérios predeterminados. Essas amostras foram submetidas a testes fenotípicos e genotípicos para pesquisa de ESBL (ver ANEXO 3).

Os resultados dos testes fenotípicos foram positivos para 379 (20,7%) isolados no método de DC (FIGURA 4) e 354 (19,4%) isolados no teste de DDD (FIGURA 5).

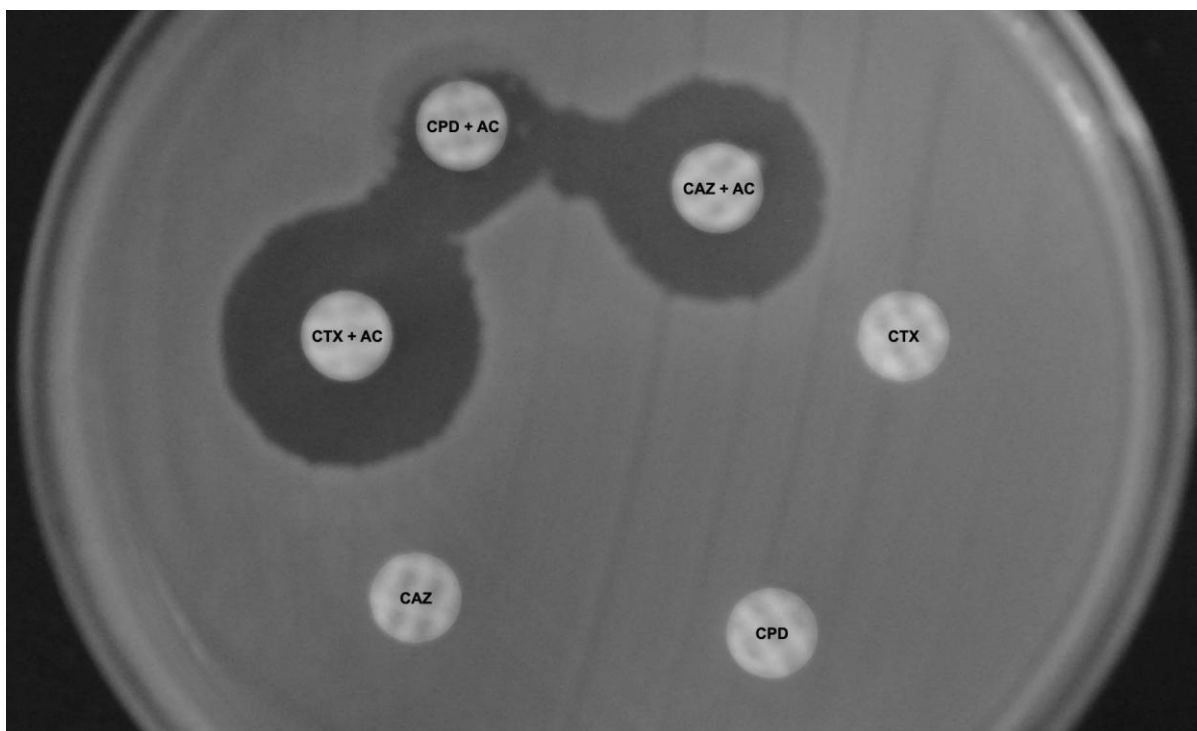


FIGURA 4 – TESTE POSITIVO PARA ESBL UTILIZANDO O MÉTODO DO DISCO COMBINADO (DC).

FONTE: O autor (2010).

NOTA: CPD = cefpodoxima; CAZ = ceftazidima; CTX = cefotaxima; AC = ácido clavulânico.

A reação de PCR para os genes que codificam ESBLs foi positiva em 439 (24,02%) isolados de enterobactérias, sendo que em 300 desses isolados foram

detectados dois ou três dos genes que codificavam diferentes β -lactamases. A PCR para o gene *bla*_{TEM} foi positiva em 291 isolados bacterianos (FIGURA 6), a PCR para o gene *bla*_{SHV} foi positiva em 208 isolados (FIGURA 7), a PCR para o gene *bla*_{CTX-M} foi positiva em 284 isolados (FIGURAS 8, 9 e 10) e a PCR para o gene *bla*_{PER} foi positiva em dois isolados. Os demais genes pesquisados não foram encontrados.

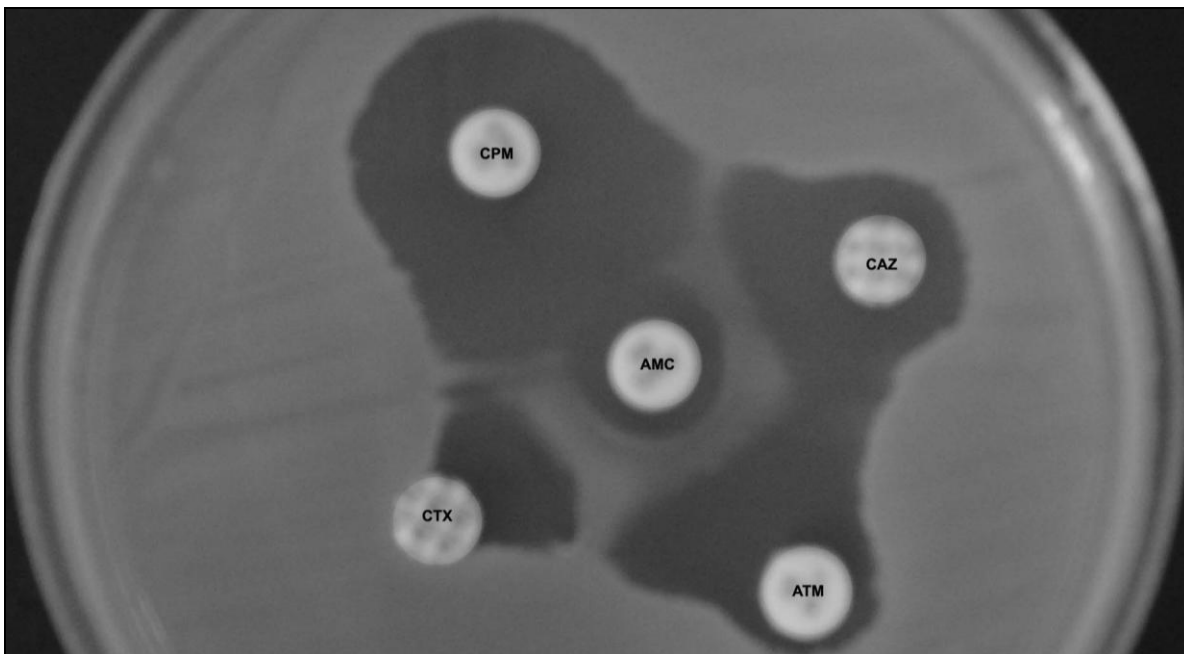


FIGURA 5 – TESTE DE DUPLA DIFUSÃO (DDD) POSITIVO PARA ESBL.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: ATM = aztreonam; CAZ = ceftazidima; CTX = cefotaxima; CPM = cefepime; AMC = amoxicilina com ácido clavulânico.

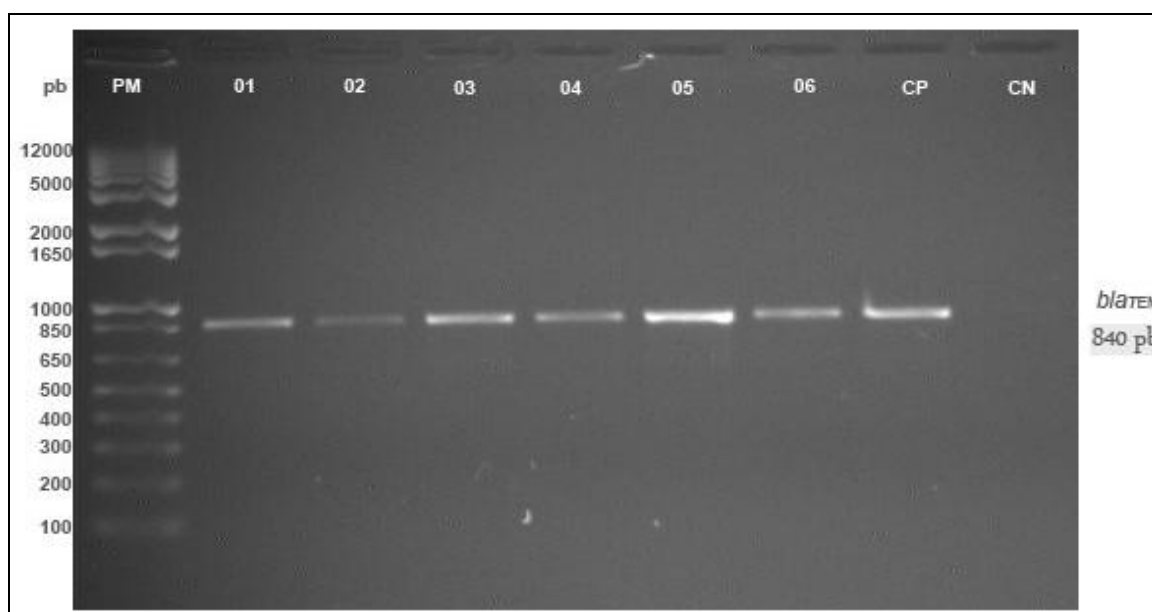


FIGURA 6 – AMOSTRAS POSITIVAS NA PESQUISA DO GENE *bla*_{TEM} POR PCR.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: PM = peso molecular; 01-06 = amostras positivas; CP = controle positivo; CN = controle negativo.

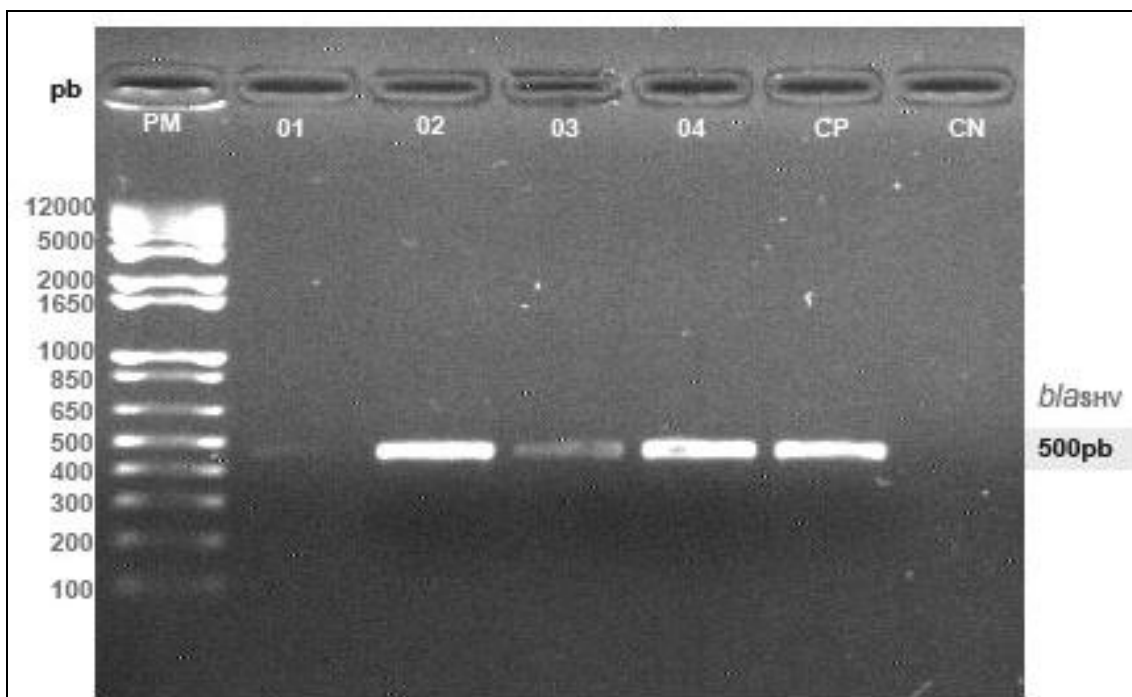


FIGURA 7 – AMOSTRAS POSITIVAS NA PESQUISA DO GENE *bla_{SHV}* POR PCR.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: PM = peso molecular; 01-04 = amostras positivas; CP = controle positivo; CN = controle negativo.

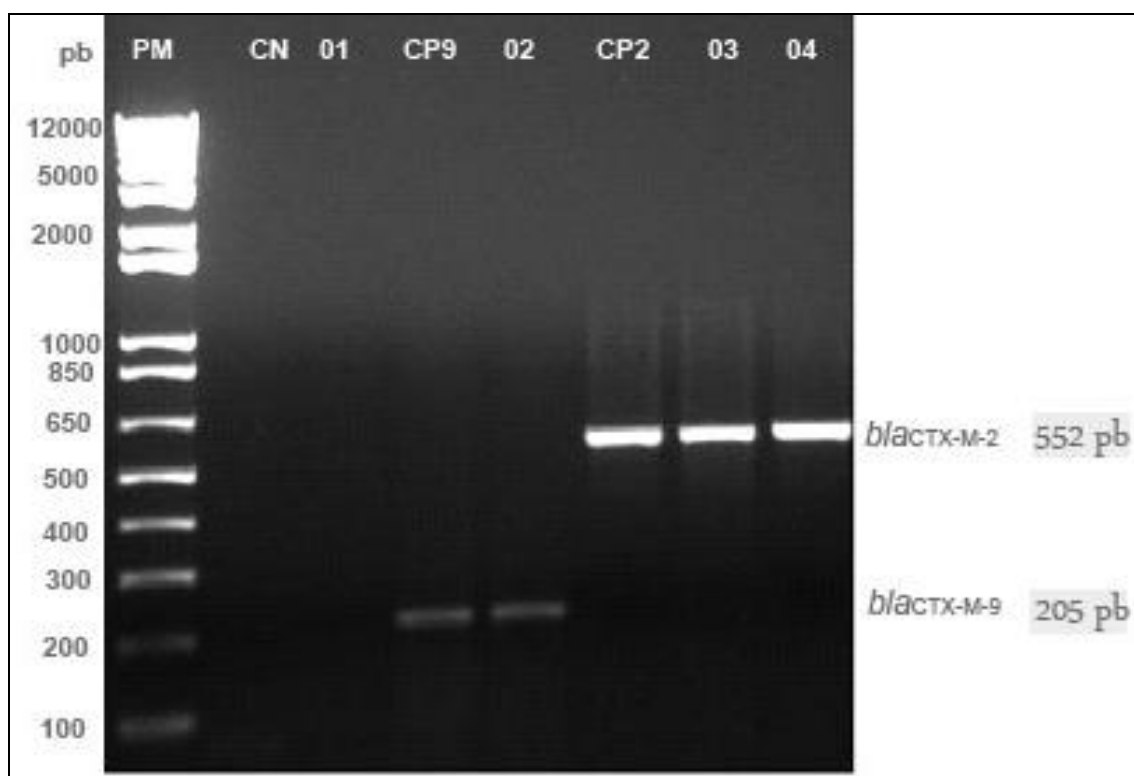


FIGURA 8 – AMOSTRAS POSITIVAS NA PESQUISA DOS GENES *bla_{CTX-M-2}* E *bla_{CTX-M-9}* POR PCR.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: PM = peso molecular; CN = controle negativo; 01 = amostra negativa; 02-04 = amostras positivas; CP2 = controle positivo CTX-M-2; CP9 = controle positivo CTX-M-9.

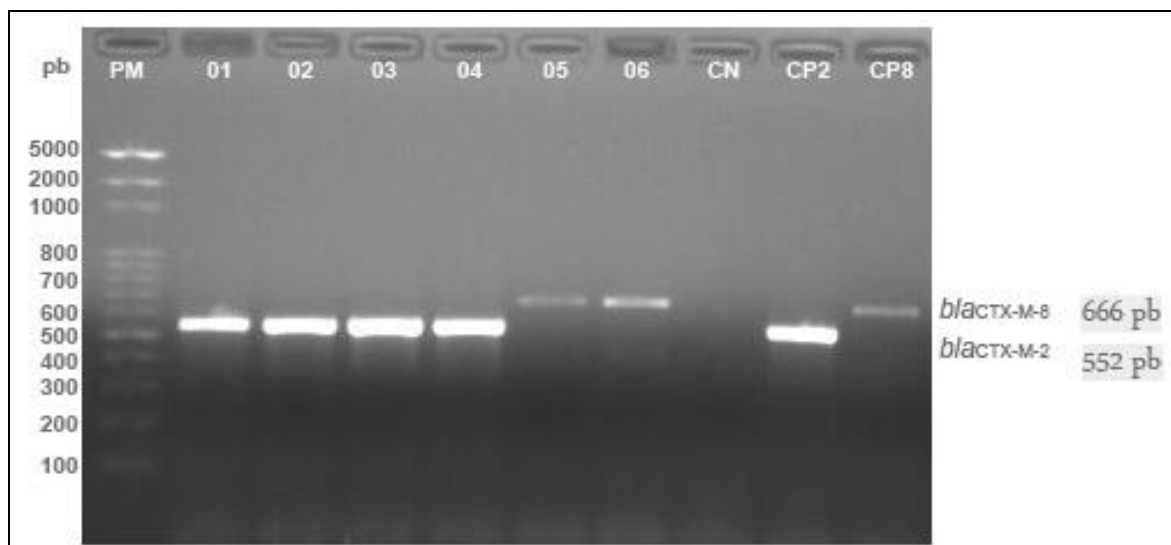


FIGURA 9 – AMOSTRAS POSITIVAS NA PESQUISA DOS GENES *bla*_{CTX-M-2} E *bla*_{CTX-M-8} POR PCR
 FONTE: O autor (2010).

NOTA: PM = peso molecular; 01-06 = amostras positivas; CN = controle negativo; CP2 = controle positivo CTX-M-2; CP8 = controle positivo CTX-M-8.

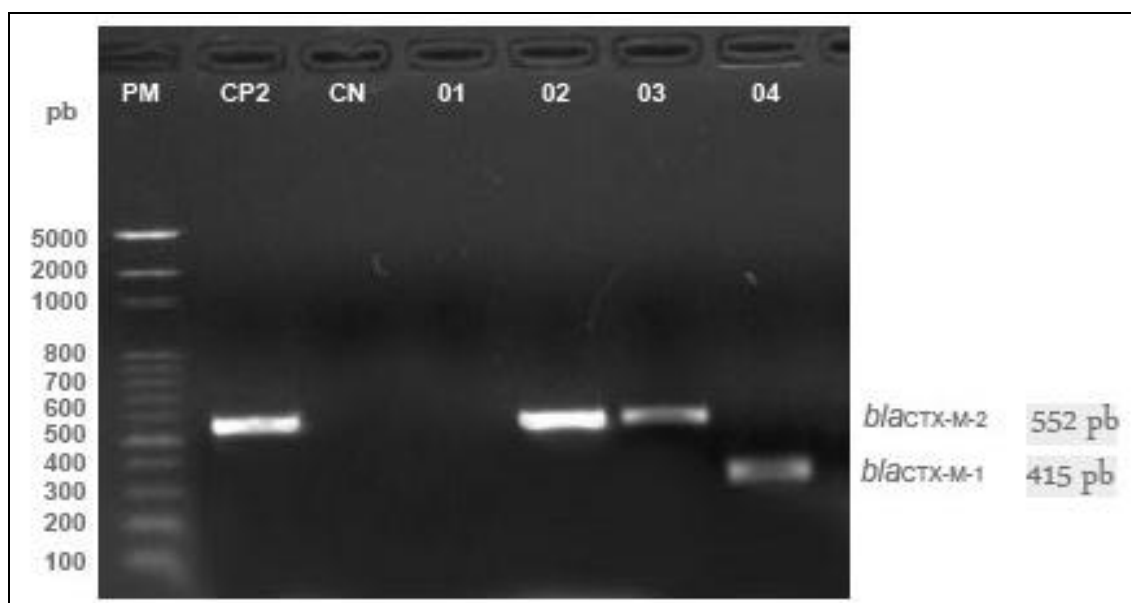


FIGURA 10 – AMOSTRAS POSITIVAS NA PESQUISA DOS GENES *bla*_{CTX-M-1} E *bla*_{CTX-M-2} POR PCR.
 FONTE: O autor (2010).

NOTA: PM = peso molecular; CP2 = controle positivo CTX-M-2; 01 = amostra negativa; 02-04 = amostra positiva.

A determinação do ponto isoelétrico das amostras com testes fenotípicos positivos e testes genotípicos negativos (24 amostras) apresentou resultados compatíveis com as enzimas TEM, CTX-M e SHV. A nova reação de PCR, realizada após extração com *kit* para reduzir inibidores, apresentou resultados positivos em 22 delas. As outras 2 continuam sem definição.

Com a análise das sequências dos produtos de PCR, foi possível concluir que apenas duas amostras possuíam ESBL do tipo TEM e 94 do tipo SHV. As demais β -lactamases TEM e SHV encontradas pertenciam ao grupo 2b de Bush e Jacoby, ou seja, eram β -lactamases de espectro restrito (BUSH; JACOBY, 2010). Nenhuma β -lactamase TEM ou SHV resistente a inibidores foi encontrada. A TABELA 1 apresenta os resultados gerais obtidos no teste de triagem, no teste fenotípico e nos testes genotípicos para ESBL, separados por espécie bacteriana. As espécies com menos de 12 isolados foram agrupadas com outras na TABELA 1, que corresponde a dois isolados de *C. amalonaticus*, um isolado de *C. diversus*, dois isolados de *E. sakazakii*, 10 isolados de *E. gergoviae* (3 isolados ESBLs), seis isolados de *K. ozanae*, 2 isolados de *Pantoea agglomerans* (1 isolado ESBL), um isolado de *Providencia rettgeri* (1 isolado ESBL), quatro isolados de *P. stuartii* (2 isolados ESBL), 12 isolados de *P. vulgaris* (1 isolado ESBL) e 6 de *S. liquefaciens*.

TABELA 1 – PREVALÊNCIA DE ESBL NAS DIFERENTES ESPÉCIES DE ENTEROBACTÉRIAS UTILIZANDO MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS.

ESPÉCIE	Isolados n	Suspeitas n (%)	DC (+) n (%)	DDD (+) n (%)	PCR (+) n (%)	ESBL (+) n (%)
<i>C. freundii</i>	27	3 (11,1)	2 (7,4)	2 (7,4)	2 (7,4)	2 (7,4)
<i>E. aerogenes</i>	100	64 (64,0)	53 (53,0)	49 (46,0)	62 (62,0)	57 (57,0)
<i>E. cloacae</i>	214	125 (58,4)	73 (34,1)	71 (33,2)	106 (49,5)	83 (38,8)
<i>E. coli</i>	732	46 (6,3)	41 (5,6)	38 (5,2)	41 (5,6)	39 (5,3)
<i>K. oxytoca</i>	57	10 (17,5)	7 (12,3)	8 (14,0)	11 (19,3)	6 (10,5)
<i>K. pneumoniae</i>	520	190 (36,5)	177 (34,0)	167 (32,1)	190 (36,5)	173 (33,3)
<i>M. morgani</i>	34	5 (14,7)	2 (5,9)	2 (5,9)	4 (11,8)	1 (2,9)
<i>P. mirabilis</i>	50	10 (20,0)	6 (12,0)	5 (10,0)	6 (12,0)	6 (12,0)
<i>S. marcescens</i>	47	18 (38,3)	3 (6,4)	4 (8,5)	7 (14,9)	7 (14,9)
Outras*	46	12 (26,1)	8 (17,4)	8 (17,4)	10 (21,7)	8 (17,4)
Total	1827	483 (26,4)	379 (20,7)	354 (19,4)	439 (24,0)	382 (20,9%)

FONTE: O autor (2010).

NOTA: N = número de amostras; DC (+) = positivas para ESBL pelo método disco combinado; DDD (+) = positivas para ESBL pelo método duplo disco difusão; PCR (+) = positivas na PCR para genes TEM, SHV, CTX-M ou PER; ESBL (+) = genes confirmados como ESBL após sequenciamento; *outras = *C. diversus*, *E. sakazakii*, *E. gergoviae*, *K. ozanae*, *Pantoea agglomerans*, *Providencia rettgeri*, *P. stuartii*, *P. vulgaris*, *S. liquefaciens*.

Na TABELA 2 podem-se observar os tipos de ESBL encontrados. A maioria das ESBLs encontradas pertence ao tipo CTX-M (74,3%; 284/382), que foi classificado primeiramente quanto ao grupo a que pertencia a enzima, sendo

encontradas três do grupo CTX-M-1, 265 do grupo CTX-M-2, seis do grupo CTX-M-8, nove do grupo CTX-M-9 e uma com ESBLs do grupo CTX-M-2 e CTX-M-9, simultaneamente. O tipo SHV foi o segundo mais encontrado (22,0%; 84/382), sendo que uma pertencia ao subtipo SHV-2, uma ao subtipo SHV-27, duas ao subtipo SHV-38 e as outras 80 ao subtipo SHV-12. As duas ESBLs (0,6%) do tipo PER encontradas pertenciam ao subtipo PER-2, e as duas ESBLs do tipo TEM (0,6%) pertenciam ao subtipo TEM-136. Nas dez amostras (2,6%) com CTX-M e SHV, simultaneamente, os subtipos encontrados foram CTX-M-2 e SHV-12.

Além das amostras que apresentaram duas ESBLs simultaneamente, muitas outras apresentaram concomitantemente ESBL e outros tipos de β -lactamases. Algumas apresentaram TEM ou SHV não ESBL associadas a CTX-M, ou TEM não ESBL associada a SHV ESBL, ou ainda TEM e SHV não ESBL. O pl das amostras com PCR positiva para mais de um gene demonstrou que ocorre a expressão de duas ou três β -lactamases na mesma amostra.

Entre as amostras avaliadas, foram encontradas 24 (6,3%) amostras positivas nos testes fenotípicos que não confirmaram a presença de genes de resistência nos testes de PCR. Além disso, 30 amostras foram negativas nos testes fenotípicos e positivas nos testes genotípicos.

TABELA 2 – DISTRIBUIÇÃO DOS TIPOS DE ESBL POR ESPÉCIE BACTERIANA.

ESPÉCIE	ESBL n	CTX-M n	SHV n	TEM n	PER n	CTX-M/SHV n
<i>C. freundii</i>	2	2	-	-	-	-
<i>E. aerogenes</i>	57	49	4	-	-	3
<i>E. cloacae</i>	83	60	14	2	2	5
<i>E. coli</i>	39	31	8	-	-	-
<i>E. gergoviae</i>	3	2	-	-	-	1
<i>K. oxytoca</i>	6	5	1	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	173	116	57	-	-	-
<i>M. morgani</i>	1	1	-	-	-	-
<i>P. agglomerans</i>	1	1	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	6	6	-	-	-	-
<i>P. rettgeri</i>	1	1	-	-	-	-
<i>P. stuartii</i>	2	2	-	-	-	-
<i>P. vulgaris</i>	1	1	-	-	-	-
<i>S. marcescens</i>	7	7	-	-	-	-
Total	382	284	84	2	2	10

FONTE: O autor (2010).

4.2.2 Discussão

A prevalência de ESBL na população estudada, confirmada por testes genotípicos, foi de 20,9% (TABELA 1). Em outro trabalho brasileiro, realizado no Rio Grande do Sul, com dados de prevalência de ESBL em enterobactérias baseados em testes fenotípicos, a prevalência foi de 24,8% (LAGO *et al.*, 2010), porém, não existe um dado brasileiro utilizando testes genotípicos para comparação.

As espécies com maior número de amostras positivas foram *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* e *E. coli*. A maior prevalência entre essas espécies foi encontrada em *E. aerogenes*, sendo inclusive maior que em *K. pneumoniae*, considerada principal produtora da enzima. A análise epidemiológica mostrou que o fato provavelmente se deve à disseminação de um clone produtor de CTX-M-59 no hospital estudado (item 4.5).

A produção de ESBL foi o principal mecanismo de resistência às cefalosporinas de terceira geração em enterobactérias, uma vez que 79,1% (382 de 483) das amostras resistentes às cefalosporinas (positivas no teste de triagem) eram produtoras de ESBLs. Outros mecanismos de resistência a cefalosporinas em enterobactérias são produção de AmpC cromossômica induzível em *Enterobacter* spp., *M. morgani*, *S. marcescens*, *C. freundii*, *P. stuartii* e *Providencia rettgeri*, produção de β -lactamases induzíveis da classe A em *C. amalonaticus* e *C. koseri*, superprodução de β -lactamases da classe 2b em *Klebsiella* spp. ou, ainda, redução da permeabilidade em todas as espécies de enterobactérias (BLACK; MOLAND; THOMSON, 2005; PATERSON, 2006).

No presente estudo, 30 ESBLs eram positivas no teste genotípico e apresentaram resultado falso negativo nos testes fenotípicos. A causa mais comum de resultados falsos negativos é a produção de β -lactamase AmpC induzível, que mascara a presença de ESBL. Entre os isolados citados, 26 eram portadores de AmpC cromossômica, confirmando esse mecanismo como provável causa desse resultado. Variações nos testes fenotípicos podem melhorar a detecção nessas espécies, como será discutido no item 4.4. Outros fatores que pode levar a resultados falsos negativos é a redução da permeabilidade devido à mutação em porinas de membrana ou a falta de expressão das ESBLs (DRIEUX *et al.*, 2008).

Além disso, foram encontradas 24 (6,3%) amostras positivas nos testes fenotípicos, que não confirmaram a presença de genes de resistência nos testes

genotípicos. Nessas amostras será necessário pesquisar outras ESBLs, por meio de pl e PCR para outros genes, para diferenciar entre amostras que possuem tipos menos frequentes de ESBL e amostras com resultados falsos positivos nos testes fenotípicos.

Resultados falsos positivos, em geral, são devidos à presença de outras β -lactamases inibidas por ácido clavulânico. Essas β -lactamases podem ser cromossômicas ou plasmidianas. Alguns exemplos são hiperprodução de β -lactamase cromossômica em *C. amalonaticus*, hiperprodução de K1 em *K. oxytoca*, hiperprodução da SHV cromossômica em *K. pneumoniae* ou hiperprodução de β -lactamases plasmidianas do grupo 2b de Bush, como TEM-1 ou SHV-1 (SCHWABER *et al.*, 2004; DRIEUX *et al.*, 2008; PITOUT; LAUPLAND, 2008; BUSH; JACOBY, 2010).

O tipo predominante de ESBL foi o CTX-M, presente em 76,7% (293/382) das amostras ESBL positivas. O grupo CTX-M se disseminou primeiramente na América do Sul (RADICE *et al.*, 2002) sendo o tipo prevalente segundo trabalhos realizados no Brasil (TOLLENTINO *et al.*, 2010) e em outros países desse continente (VILLEGAS; KATTAN *et al.*, 2008). Atualmente, é também o tipo predominante em outras regiões do mundo (GOVINDEN *et al.*, 2007; VILLEGAS *et al.*, 2008), sendo considerado um grupo crescente de ESBLs, inclusive em infecções ambulatoriais (ROSSOLINI; D'ANDREA; MUGNAIOLI, 2008).

O subgrupo CTX-M-2 foi o predominante no presente trabalho, sendo encontrado em 273 amostras (71,5% das ESBLs). O mesmo resultado foi encontrado em estudos realizados na Argentina, Bolívia e Peru (QUINTEROS *et al.*, 2003; CELENZA *et al.*, 2006; VILLEGAS *et al.*, 2008). Nas outras regiões do mundo o subgrupo predominante é o CTX-M-1 (BARANIAK *et al.*, 2002; MARKOVSKA *et al.*, 2004; GOVINDEN *et al.*, 2007; LIVERMORE *et al.*, 2007), que foi encontrado em apenas três das amostras estudadas.

O subgrupo CTX-M-8 foi encontrado em cinco amostras de *E. coli* e em uma amostra de *K. pneumoniae*. A primeira enzima desse grupo, que originou seu nome, foi descrita no Brasil em amostras de *C. amalonaticus* e *E. cloacae* (BONNET *et al.*, 2000b).

Em relação ao subgrupo CTX-M-9, foi encontrado em dez amostras. O subgrupo foi relatado pela primeira vez no Brasil em 2001 (BONNET *et al.*, 2001), mas tem sido encontrado com frequência menor que o subgrupo CTX-M-2.

O grupo SHV foi o segundo grupo mais frequente no presente trabalho, encontrado em 85 amostras (22,2% das ESBLs), sendo o subtipo SHV-12 encontrado em 81 amostras (21,2%). As enzimas SHV, especialmente SHV-12, são descritas com frequência no mundo todo (BUSH, 2008; CANTON *et al.*, 2008b; HAWKEY, 2008), e também já haviam sido relatadas no Brasil (TOLLENTINO *et al.*, 2010). Também foram encontradas as ESBLs SHV-2 (uma amostra ou 0,3%), SHV-27 (uma amostra ou 0,3%) e SHV-38 (duas amostras ou 0,6%). A enzima SHV-27 foi descrita pela primeira vez no Brasil (CORKILL *et al.*, 2001), e a SHV-38 também já foi encontrada no Brasil anteriormente (TOLLENTINO *et al.*, 2010).

O grupo TEM (subtipo TEM-136) foi observado em apenas duas amostras (0,6%). Esse grupo não é comum no Brasil, sendo relatado apenas o tipo TEM-116 (DROPA *et al.*, 2009). Em outros locais do mundo, também é menos frequente que CTX-M e SHV (CANTON *et al.*, 2008b).

O grupo PER-2 é restrito à América do Sul (NAAS; POIREL; NORDMANN, 2008) e foi observado em apenas dois isolados, porém, foi pesquisado apenas nos isolados negativos para ESBLs CTX, TEM e SHV, e talvez existam mais casos. O grupo PER-2 ainda não havia sido relatado no Brasil.

A produção de dois tipos de ESBL pela mesma cepa ocorreu em nove isolados que possuíam SHV-12 e CTX-M-2. Também ocorreu ESBL associada a outras β -lactamases em 204 amostras. Essas associações são muito frequentes, sendo que, muitas vezes, β -lactamases diferentes são encontradas no mesmo plasmídeo (CARATTOLI, 2009).

4.3 SUSCETIBILIDADE DAS AMOSTRAS PRODUTORAS DE ESBL AOS ANTIMICROBIANOS

4.3.1 Resultados

A TABELA 3 apresenta os resultados do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos realizado pelo método de microdiluição em ágar, além da determinação da potência (CIM₅₀) e atividade (CIM₉₀) das cefalosporinas de terceira e quarta geração, carbapenêmicos e tigeciclina. A suscetibilidade às cefalosporinas e carbapenêmicos foi realizada utilizando-se os critérios do CLSI 2010 e do EUCAST 2011. Para tigeciclina foi usado o ponto de corte determinado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (FDA, 2009; CLSI, 2010a; CLSI, 2010b; EUCAST, 2011).

TABELA 3 – POTÊNCIA (CIM₅₀) E ATIVIDADE (CIM₉₀) DOS ANTIMICROBIANOS CONTRA AS AMOSTRAS PRODUTORAS DE ESBL E SUSCETIBILIDADE USANDO PONTOS DE CORTE DO CLSI E DO EUCAST.

Antimicrobiano	CIM ₅₀ (µg/ml)	CIM ₉₀ (µg/ml)	Suscetibilidade CLSI (%)	Suscetibilidade EUCAST (%)
Ceftazidima	32	> 128	19,6	10,7
Cefotaxima	256	> 256	4,3	4,3
Aztreonam	128	> 256	10,4	8,2
Cefepime	32	> 128	12,1	5,4
Imipenem	0,06	0,12	99,3	99,6
Meropenem	0,03	0,25	98,2	98,9
Ertapenem	0,06	0,5	86,4	91,0
Tigeciclina	0,5	2	90,3*	90,3*

FONTES: O autor (2010).

NOTA: *ponto de corte do FDA, não determinado no CLSI ou Eucast.

4.3.2 Discussão

As cefalosporinas e o aztreonam apresentaram elevadas CIM₅₀ e CIM₉₀. Esse resultado era esperado, já que as ESBLs conferem resistência a esses antimicrobianos. Porém, mesmo com a redução dos pontos de corte, nem todas as amostras produtoras de ESBL foram classificadas como resistentes pelos critérios utilizados. Segundo os novos documentos do CLSI e EUCAST (ver QUADRO 4),

essas amostras devem ser liberadas como suscetíveis no teste de suscetibilidade, apesar da produção de ESBL (CLSI, 2010a; CLSI, 2010b; EUCAST, 2010). Essa decisão foi baseada em estudos de farmacocinética e farmacodinâmica, os quais mostram que para esses antimicrobianos, o tempo acima da CIM é um critério mais adequado que a produção de ESBL na determinação da suscetibilidade (ANDES; CRAIG, 2005; JONES *et al.*, 2005; BHAT *et al.*, 2007; KAHLMETER, 2008; MACGOWAN, 2008).

Por outro lado, vários estudos clínicos relatam falha terapêutica das cefalosporinas no tratamento de infecções por micro-organismos produtores de ESBL, mesmo quando a CIM é menor que os novos pontos de corte sugeridos (PATERSON *et al.*, 2001; ANDES; CRAIG, 2005; BHAT *et al.*, 2007).

No presente estudo, 19,6% e 4,3% das amostras ESBLs seriam liberadas como suscetíveis à ceftazidima e cefotaxima, respectivamente, segundo critérios do CLSI 2010, sendo que a sensibilidade à ceftazidima é maior devido à predominância de ESBLs do tipo CTX-M. Mas, a eficácia clínica do tratamento usando cefalosporinas nesses casos ainda é uma dúvida. O mesmo se aplica ao aztreonam, que apresentou 10,4% das amostras sensíveis. No entanto, o ponto mais crítico dessa discussão é o ponto de corte do cefepime, que o CLSI manteve em $\geq 8 \mu\text{L/ml}$.

Para o cefepime, alguns autores sugerem que as amostras com CIM $< 1 \mu\text{g/ml}$ (5,4% neste trabalho), apresentariam bons resultados de pK/pD com doses usuais de cefepime, as quais atingiriam os índices requeridos de $T > \text{CIM}$ ($> 50\%$) ou AUC/CIM (> 1654). Em relação a esse dados, existe uma concordância maior entre os resultados de eficácia terapêutica, que mostram $T > \text{CIM}$ maior que 50% e boa atividade, resultando em cura clínica ou microbiológica (LIAO *et al.*, 2006).

Porém, para as amostras com CIM entre 1-8 $\mu\text{g/ml}$ (6,9% neste trabalho), os resultados seriam duvidosos porque, apesar de estar estabelecido por vários estudos que os índices requeridos de pK/pD podem ser atingidos, especialmente com doses maiores que as usuais ou infusão contínua (KOTAPATI *et al.*, 2005; KAHLMETER, 2008; MACGOWAN, 2008), os resultados clínicos com essas CIMs é controverso. Um estudo mostrou que a chance de eficácia terapêutica usando cefepime é de 89% quando a CIM é $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, 67% quando CIM é 2 $\mu\text{g/ml}$, 27% quando CIM é 4 $\mu\text{g/ml}$ e 11% quando CIM é 8 $\mu\text{g/ml}$ (ANDES; CRAIG, 2005). Outros também mostram ineficácia quando CIM $< 8 \mu\text{g/ml}$ (BHAT *et al.*, 2007).

Os pontos de corte do EUCAST são mais cautelosos, preferindo manter valores menores aos encontrados nos estudos de pK/pD, até que mais estudos clínicos controlados sejam realizados (EUCAST, 2010).

Os carbapenêmicos são considerados a droga de escolha no tratamento de infecções por micro-organismos produtores de ESBL. Neste estudo, apresentaram boa suscetibilidade (99,3% para imipenem, 98,2% para meropenem e 86,4% para ertapenem), porém, isolados resistentes têm sido encontrados, principalmente ao ertapenem. As ESBLs não degradam carbapenêmicos de forma eficiente, mas podem conferir resistência quando associadas à redução da permeabilidade (YANG; GUO; ZHANG, 2009; WEBSTER *et al.*, 2010). Além da suscetibilidade, os carbapenêmicos apresentaram boa potência e atividade, reforçando o fato de serem uma importante opção terapêutica contra esses micro-organismos.

Um antimicrobiano mais recente, a tigeciclina, também foi testada e apresentou boa suscetibilidade, atividade e potência, porém, menor que os carbapenêmicos. Seu uso foi aprovado pelo FDA para infecções intra-abdominais, infecções de pele e tecidos moles e pneumonias comunitárias. No tratamento de bacteremias e infecções urinárias, o uso da tigeciclina não é aprovado e são necessários mais estudos que comprovem a sua eficácia (FRITSCHÉ *et al.*, 2005; MOROSINI *et al.*, 2006; KELESIDIS *et al.*, 2008; BHATTACHARYA; PARAKH; NARANG, 2009; FALAGAS; METAXAS, 2009).

4.4 DETECÇÃO DE ESBL EM *Enterobacter* spp.

4.4.1 Resultados

Todos os testes, com exceção do teste de dupla difusão em que não se utiliza a diferença entre halos, foram avaliados primeiramente em relação a qual o melhor ponto de corte para se considerar uma bactéria positiva para ESBL. Com essa finalidade, avaliou-se a diferença entre os halos da cefalosporina isolada e da cefalosporina associada ao ácido clavulânico. Os pontos de corte foram obtidos pela construção de curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), como no exemplo mostrado na FIGURA 11. Das 15 combinações entre métodos e substratos testados, oito tiveram o ponto de corte definido como ≥ 3 mm, e para os outros sete, o ponto de corte definido pela curva ROC foi ≥ 1 mm, porém, com especificidade $< 100\%$ em alguns casos. Como a diferença ≥ 1 mm é muito pequena e subjetiva, o ponto de corte ≥ 3 mm foi escolhido como ideal para todos os testes. Com ponto de corte ≥ 3 mm, todos os testes apresentaram 100% de especificidade. A sensibilidade para cada método, separados por antimicrobiano testado e, também, considerando os três antimicrobianos usados simultaneamente, está representada na TABELA 4. Um exemplo de resultado de todos os métodos testados pode ser visualizado na FIGURA 12.

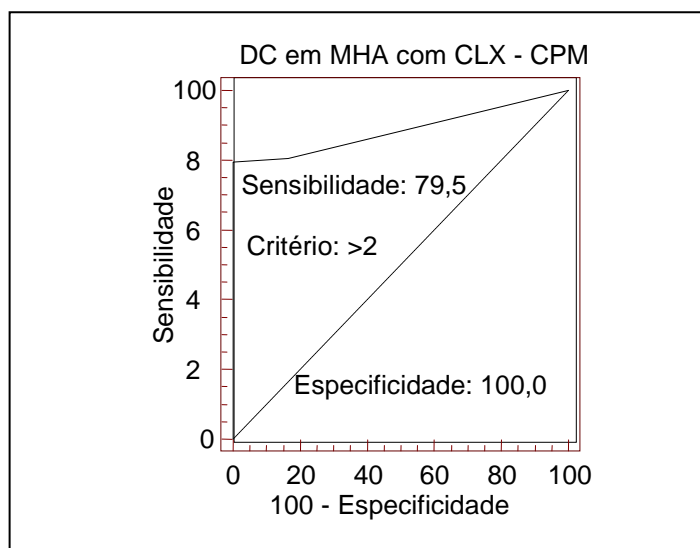


FIGURA 11 – CURVA ROC OBTIDA PARA MÉTODO DE DISCO COMBINADO EM ÁGAR COM CLOXACILINA E SUBSTRATO CEFEPIME.

FONTE: O autor (2010).

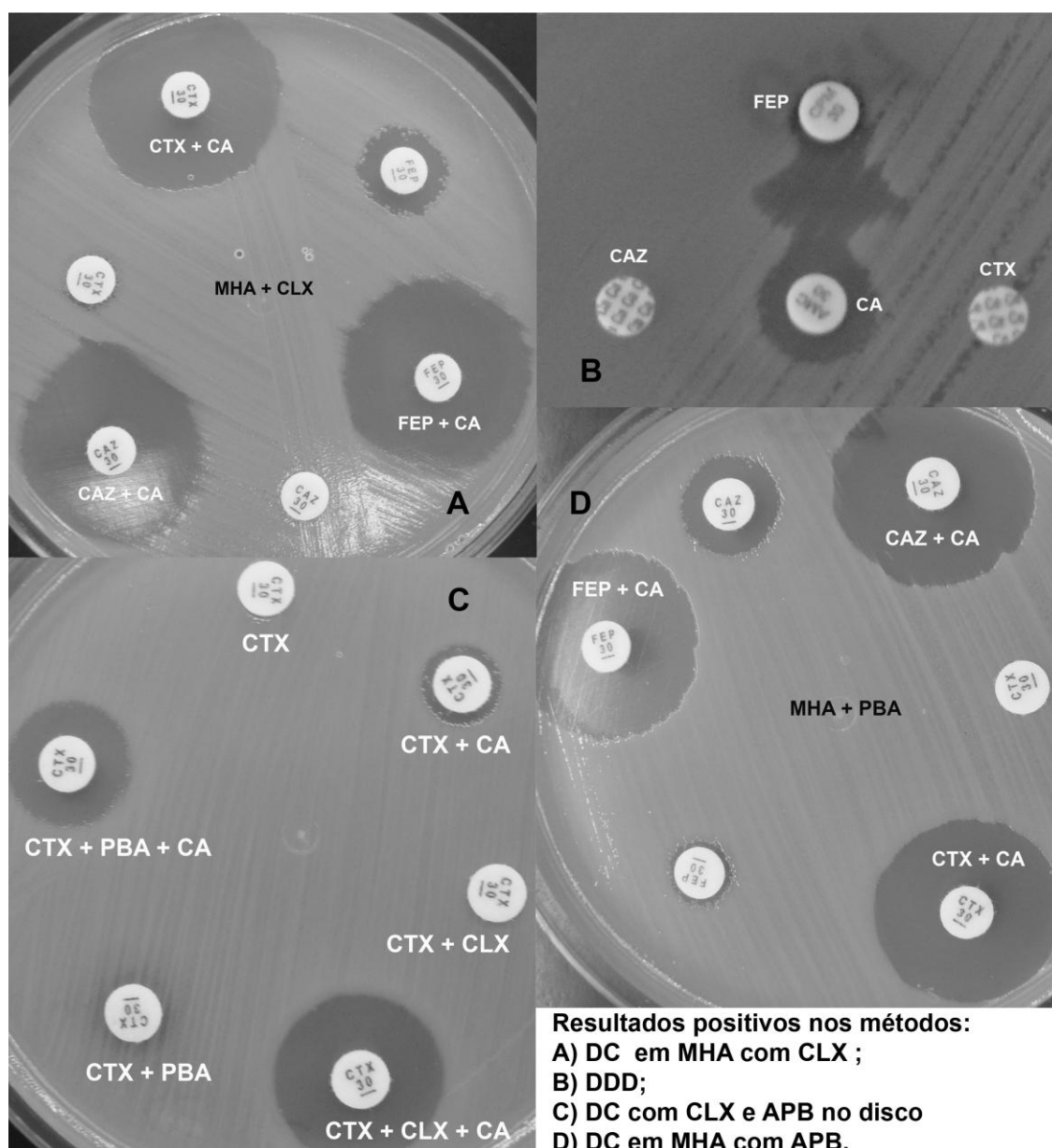


FIGURA 12 – MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ESBL EM *Enterobacter* spp..

FONTE: O autor (2010).

NOTA: DC = disco combinado; MHA = Ágar Mueller Hinton; CLX = cloxacilina; DDD = duplo disco difusão; APB = ácido fenil borônico; FEP = cefepime; CAZ = ceftazidima; CTX = cefotaxima; CA = ácido clavulânico.

TABELA 4 – SENSIBILIDADE DOS TESTES AVALIADOS NA DETECÇÃO DE ESBL EM *Enterobacter spp.*

Método	Antimicrobiano	Sensibilidade (%)	(IC 95%)
Duplo disco difusão	CAZ	51,8	41,1-62,6
	CTX	55,4	44,7-66,1
	CPM	86,7	79,5-94
	Todos	89,2	82,5-95,8
Disco combinado AC	CAZ	60,2	49,7-70,8
	CTX	71,1	61,3-80,8
	CPM	81,9	73,6-90,2
	Todos	89,2	82,5-95,8
Disco combinado (AC + CLX)	CAZ	66,3	56,1-76,4
	CTX	66,3	56,1-76,4
	CPM	68,7	58,7-78,7
	Todos	75,9	66,7-85,1
Disco combinado (AC + APB)	CAZ	57,8	47,2-68,5
	CTX	81,9	73,6-90,2
	CPM	83,1	75,1-91,2
	Todos	84,3	76,5-92,2
Disco combinado em MHA com CLX	CAZ	84,3	76,5-92,2
	CTX	89,2	82,5-95,8
	CPM	79,5	70,8-88,2
	Todos	94	88,9-99,1
Disco combinado em MHA com APB	CAZ	78,3	69,4-87,2
	CTX	83,1	75,1-91,2
	CPM	81,9	73,6-90,2
	Todos	90,4	84-96,7

FONTE: O autor (2010).

NOTA: MHA = Ágar Mueller Hinton; CLX = cloxacilina; APB = ácido fenil borônico; CPM = cefepime; CAZ = ceftazidima; CTX = cefotaxima.

Todos os métodos apresentaram resultados melhores para *E. aerogenes* que para *E. cloacae*, quando as espécies foram avaliadas separadamente. Também houve diferença quanto ao melhor substrato na identificação de ESBL, de acordo com o tipo de β -lactamase presente quando as cepas foram avaliadas separadamente. O cefepime foi melhor na detecção de CTX-M, porém, igual à ceftazidima na detecção de outros tipos de ESBL (TEM, SHV e PER). Os resultados obtidos na análise estratificada por espécie e tipo de ESBL pelo método do disco combinado em ágar contendo cloxacilina, o qual apresentou maior sensibilidade, está representado na TABELA 5.

TABELA 5 – SENSIBILIDADE DO MÉTODO DE DISCO COMBINADO EM ÁGAR CONTENDO CLOXACILINA, POR ESPÉCIE DE *Enterobacter* E TIPO DE ESBL.

Grupo analisado		CAZ (%)	CTX (%)	CPM (%)	TODOS (%)
Geral		67,5	74,7	65,1	94,0
Espécies	<i>E. cloacae</i>	85,1	83	74,5	91,5
	<i>E. aerogenes</i>	82,9	97,1	85,7	97,1
	<i>E. gergoviae</i>	100	100	100	100
Tipo de ESBL	CTX-M	84,2	92,1	80,3	94,7
	PER, TEM, SHV	85,7	57,1	71,4	85,7

FONTE: O autor (2010).

NOTA: CAZ = ceftazidima; CTX = cefotaxima; CPM = cefepime.

O cefepime pode ser usado como substrato também no teste de triagem para ESBL em *Enterobacter* spp.. Para esse uso, a curva ROC mostrou que o ponto de corte ideal é próximo ao apresentado pelo CLSI (≥ 21 mm), com especificidade de 100% e sensibilidade de 82,9% na amostragem deste trabalho.

4.4.2 Discussão

Os testes mais usados para detectar ESBL em *Klebsiella* spp. e *E. coli* são os testes de duplo disco difusão (DDD) e disco combinado (DC), usando ceftazidima, cefotaxima e, às vezes, cefpodoxima. Considerando, primeiramente, esses dois métodos, com os quais os microbiologistas já estão familiarizados, podemos observar que pequenas modificações podem melhorar a sensibilidade, sem alterar a especificidade. A inclusão de cefepime nos testes, ao lado da ceftazidima e cefotaxima, é um fator importante, pois o cefepime foi capaz de detectar 30,7% e 9,2% mais amostras que a cefotaxima no teste de duplo disco difusão e disco combinado, respectivamente. Comparado com a ceftazidima, a diferença é ainda maior, principalmente devido à predominância de produtores de CTX-M entre as amostras testadas. A utilização do cefepime como substrato para detecção de ESBL em produtores de AmpC já havia sido relatada por outros autores (HO *et al.*, 2009; TOWNE *et al.*, 2010), inclusive em outras metodologias como E-test (MOHANTY *et al.*, 2010) e diluição em caldo (JEONG *et al.*, 2009). O cefepime pode, ainda, ser usado como um marcador da presença de ESBL nessas

espécies, durante o teste de sensibilidade a antimicrobianos realizado na rotina laboratorial (GARCIA; DE LA GANDARA; GARCIA, 2009).

Outras modificações analisadas foram a distância entre os discos no DDD e o menor ponto de corte no DC (≥ 3 ao invés de ≥ 5 mm). A redução da distância no DDD já havia sido descrita por Pitout *et al.* (PITOUT *et al.*, 2003) e a modificação no ponto de corte do DC já havia sido sugerida por Towne *et al.* (TOWNE *et al.*, 2010), porém, apenas para *Enterobacter* spp. SHV-12. Essas modificações são simples e podem ser facilmente realizadas, especialmente se já existe uma rotina para detecção em *Klebsiella* spp. e *E. coli*. Esses testes apresentam especificidade de 100% e sensibilidade de 89,2% na detecção de ESBL em *Enterobacter* spp. quando os três discos são testados em conjunto. Dessa forma, ao menos, uma grande maioria das cepas de *Enterobacter* spp. produtoras de ESBL (89,2%) poderiam ser corretamente identificadas, evitando-se a disseminação dessas enzimas e a terapia inadequada.

Para melhorar ainda mais a sensibilidade, foram incluídos dois inibidores, APB e CLX. Também foi avaliado se seria melhor acrescentá-los ao ágar ou ao disco de cefalosporina com AC. Com ambos os inibidores, a sensibilidade foi maior quando eles foram adicionados ao ágar Mueller Hinton e não aos discos de cefalosporinas. A adição de inibidores no disco, na verdade, não melhorou a sensibilidade dos testes. Provavelmente, houve interferência na difusão pela adição de grande quantidade de substâncias (cefalosporinas + AC + APB ou CLX) no mesmo disco.

Já a adição de inibidores ao ágar alcançou o efeito desejado. Nesse caso, a adição de APB melhorou a sensibilidade do método do disco combinado para 90,2% quando todos os discos foram considerados em conjunto, enquanto a adição de CLX aumentou a sensibilidade para 94%, sendo o melhor resultado obtido neste trabalho. Autores têm relatado a adição de inibidores como uma maneira de melhorar os resultados nos testes convencionais (JEONG *et al.*, 2008; JEONG *et al.*, 2009).

É interessante ressaltar que, quando inibidores de AmpC são adicionados ao teste, a vantagem do cefepime sobre as outras cefalosporinas na detecção diminui, sendo parecida, e às vezes menor, que a cefotaxima. Esse fato se deve à preferência das ESBL CTX-M, predominantes no trabalho, que se manifestaram mais claramente quando a AmpC estava inibida.

A avaliação separada por espécie mostrou que a detecção apresentou melhores resultados para *E. gergoviae* e *E. aerogenes* que para *E. cloacae*. Esse resultado foi observado em todos os métodos, provavelmente porque a produção de AmpC é maior em *E. cloacae* que nas outras espécies.

Quanto à avaliação por tipo de ESBL presente, a sensibilidade foi melhor para CTX-M que para os outros tipos. Não foi possível ter certeza que essa diferença foi real, e as ESBLs do tipo CTX-M foram mais facilmente detectadas ou se a diferença foi devida à amostragem de CTX-M, que foi bem maior no presente estudo que os outros tipos. Um trabalho realizado recentemente apenas com *Enterobacter* spp. produtores de SHV-12, encontrou sensibilidade de 88% na detecção dessas amostras. Pôde-se observar como já era esperado, que enquanto a cefotaxima é melhor para detectar CTX-M, a ceftazidima é melhor para outras ESBLs (DRIEUX *et al.*, 2008). Isso reforça a importância de usar as duas cefalosporinas para detecção de todos os tipos de ESBL, já que os substratos preferidos pelas enzimas diferem significativamente. A inclusão do cefepime melhora a detecção em produtores de AmpC, especialmente quando inibidores de AmpC não são incluídos no teste.

4.5 ESTUDO DOS SUBTIPOS DE ESBL CTX-M E DA SIMILARIDADE GENÉTICA

4.5.1 Resultados

Entre as amostras produtoras de CTX-M, principal grupo de ESBL no hospital estudado, 269 tiveram a PCR repetida para amplificação e sequenciamento de uma grande parte do gene, a fim de identificar os subtipos de CTX-M. Após o sequenciamento, os genes dos três isolados com ESBL do grupo CTX-M-1 foram identificados como *bla*_{CTX-M-15}; os genes dos 252 isolados com ESBL do grupo CTX-M-2 foram identificados como *bla*_{CTX-M-59} (42) e *bla*_{CTX-M-2} (210), os genes dos quatro isolados com ESBL do grupo CTX-M-8 foram identificados como *bla*_{CTX-M-8} e os dez isolados com ESBL do grupo CTX-M-9 como *bla*_{CTX-M-14} (1) e *bla*_{CTX-M-9} (9).

Entre os isolados de *K. pneumoniae* foram encontradas 101 amostras com gene *bla*_{CTX-M-2} e três amostras com genes *bla*_{CTX-M-9}. Entre os isolados de *E. coli* foram encontradas 25 amostras com gene *bla*_{CTX-M-2}, quatro com genes *bla*_{CTX-M-8} e uma com gene *bla*_{CTX-M-15}. Entre os isolados de *E. aerogenes*, o gene *bla*_{CTX-M-2} foi encontrado em cinco amostras, o gene *bla*_{CTX-M-59} em 42 e o *bla*_{CTX-M-9} em uma. Em *E. cloacae* foram encontrados *bla*_{CTX-M-2} em 58 amostras, *bla*_{CTX-M-9} em quatro e *bla*_{CTX-M-15} em uma. Essas espécies foram avaliadas também quanto à similaridade genética e os dendrogramas obtidos no estudo de 101 isolados de *K. pneumoniae*, 25 isolados de *E. coli*, 44 isolados de *E. aerogenes* e 58 isolados de *E. cloacae* estão representados nas FIGURAS 13, 14, 15 e 16, respectivamente.

Além das quatro espécies descritas anteriormente, nas quais foi observado o maior número de amostras positivas, outras apresentaram genes *bla*_{CTX-M}. Foram encontrados quatro isolados de *S. marcescens* com *bla*_{CTX-M-2} e um com *bla*_{CTX-M-15}; um isolado de *C. freundii* com *bla*_{CTX-M-9} e um com *bla*_{CTX-M-2} e, ainda, dois isolados de *E. gergoviae* com gene *bla*_{CTX-M-2} sozinho e um isolado com *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-14}, simultaneamente. O gene *bla*_{CTX-M-2} foi encontrado também em *K. oxytoca* (quatro isolados), *M. morgani* (um isolado), *P. agglomerans* (um isolado), *P. mirabilis* (quatro isolados), *P. rettgeri* (um isolado), *P. stuartii* (dois isolados) e *P. vulgaris* (um isolado).

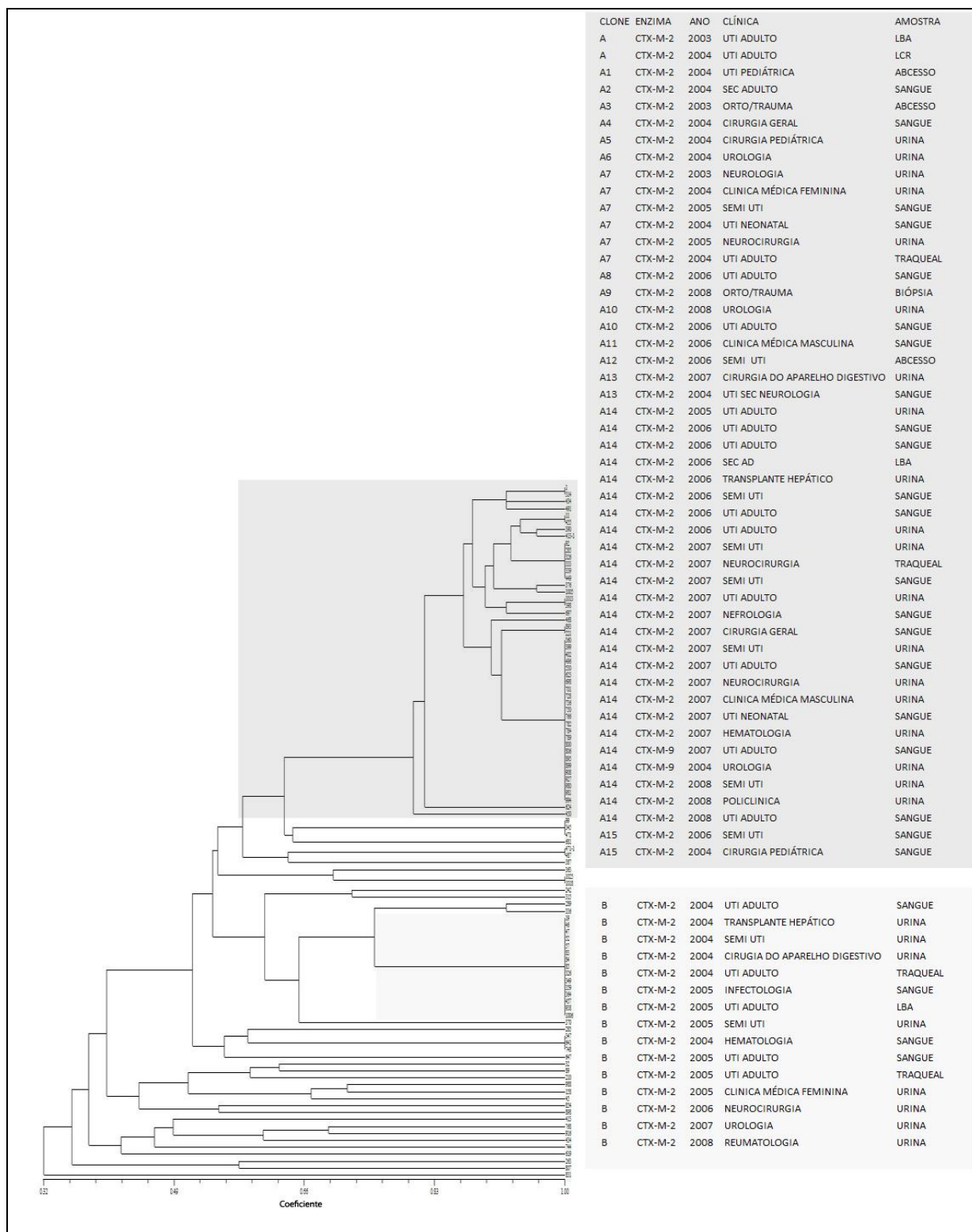


FIGURA 13 – DENDROGRAMA DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS DE AMOSTRAS DE *K. pneumoniae* PRODUTORAS DE ESBL DO TIPO CTX-M.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: em destaque dois clusters A (subtipos A1-A15) e B, com descrição da amostra clínica, ano de isolamento e clínica de origem da amostra.

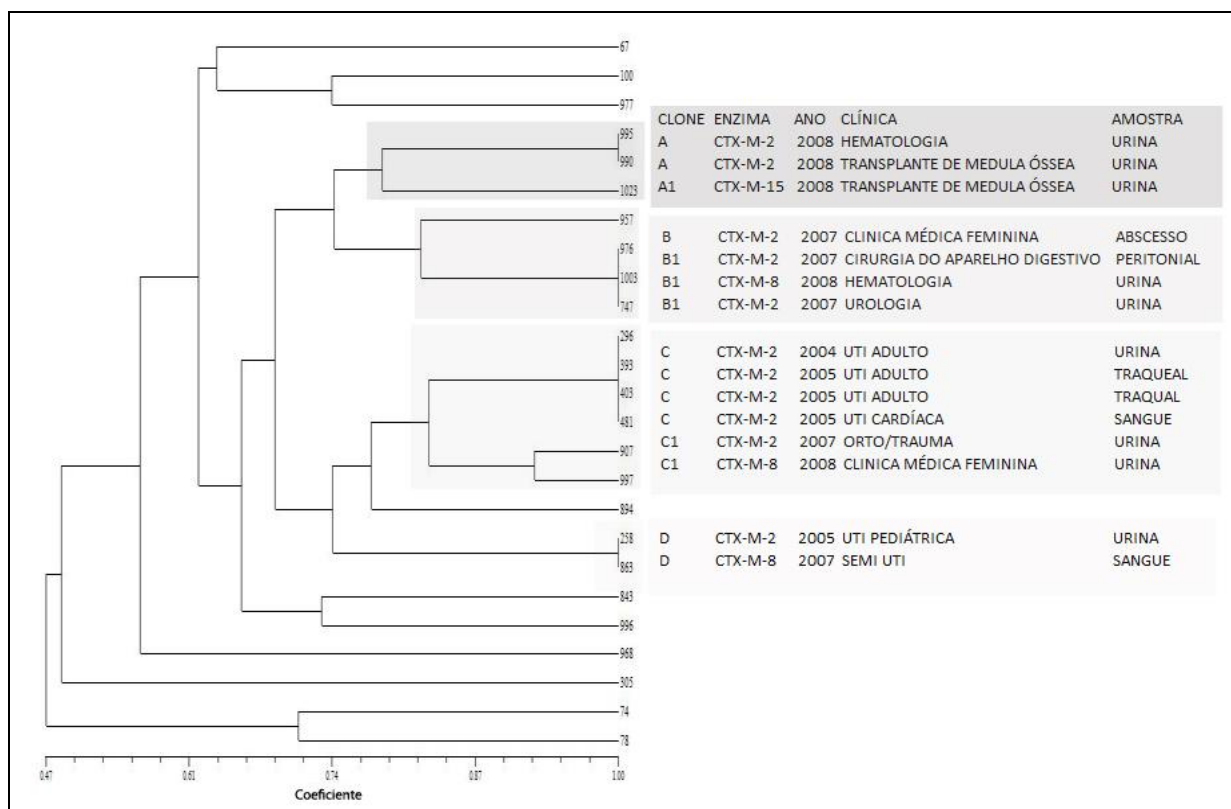


FIGURA 14 – DENDROGRAMA DOS PERFIS ELETRORÉTICOS DE AMOSTRAS DE *E. coli* PRODUTORAS DE ESBL DO TIPO CTX-M.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: em destaque quatro clusters A (subtipos A1), B (subtipos B1), C (subtipos C1) e D com descrição da amostra clínica, ano de isolamento e clínica de origem da amostra.

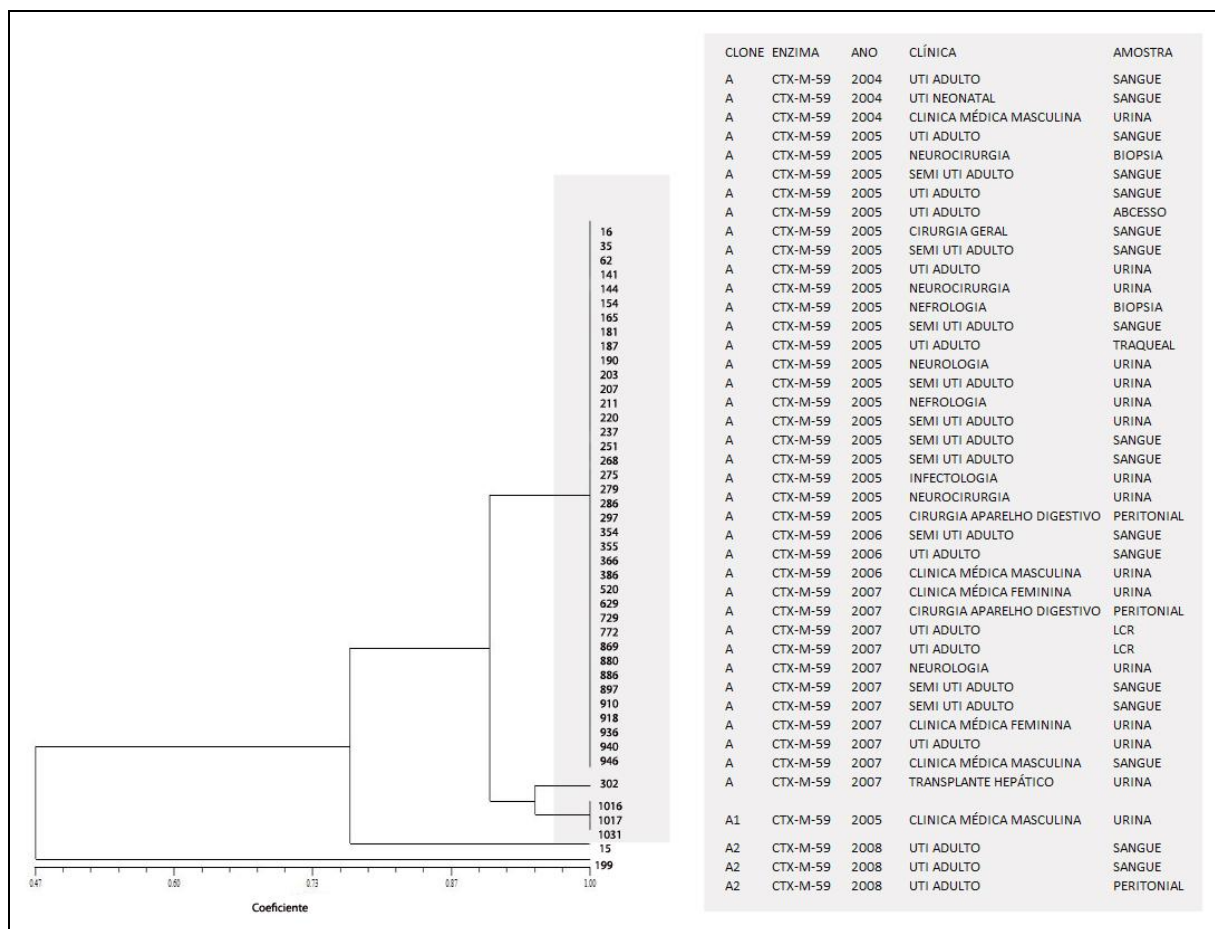


FIGURA 15 – DENDROGRAMA DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS DE AMOSTRAS DE *E. aerogenes* PRODUTORAS DE ESBL DO TIPO CTX-M.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: em destaque os clusters A (subtipos A1-A2), com descrição da amostra clínica, ano de isolamento e clínica de origem da amostra.

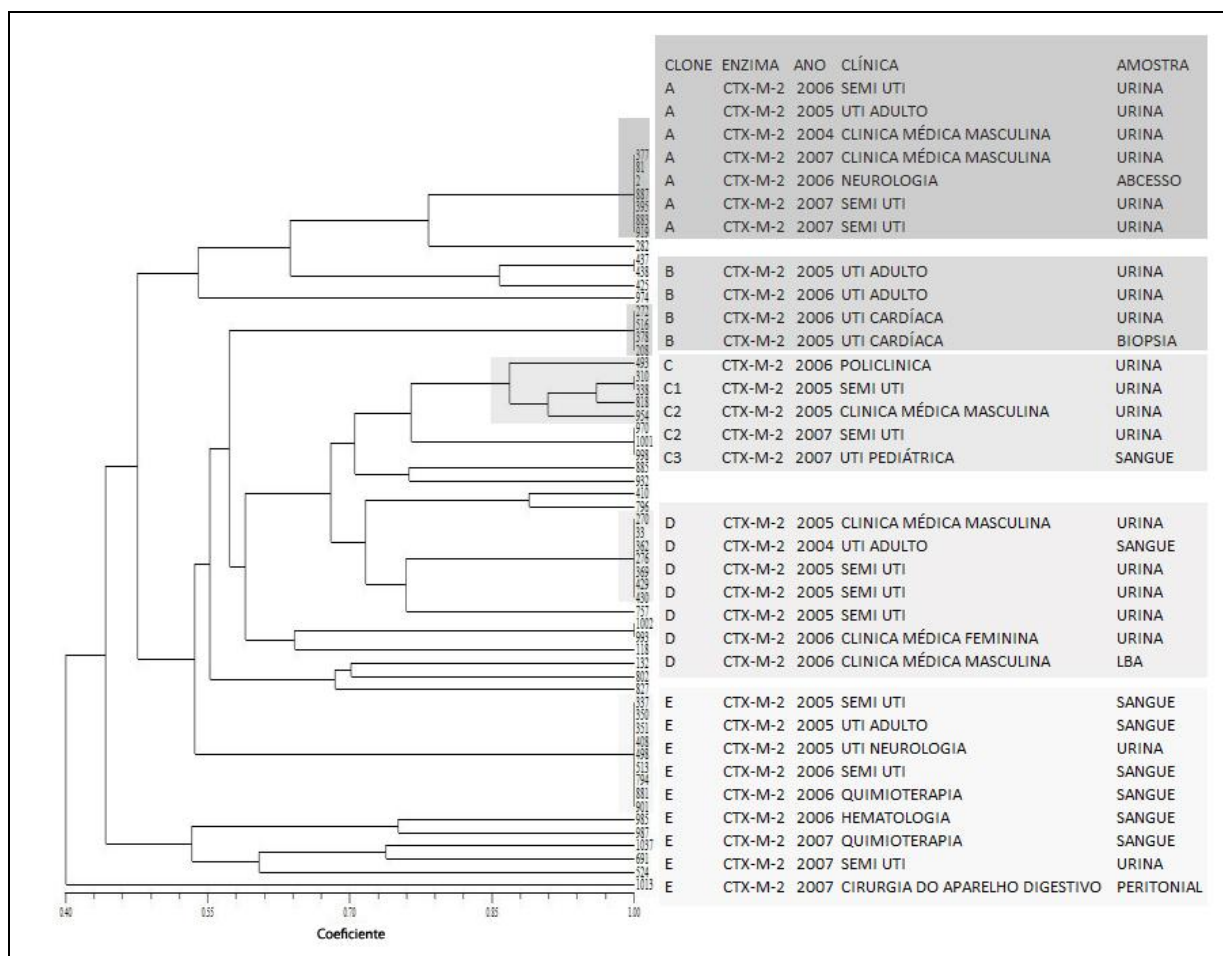


FIGURA 16 – DENDROGRAMA DOS PERFIS ELETRORFORÉTICOS DE AMOSTRAS DE *E. cloacae* PRODUTORAS DE ESBL DO TIPO CTX-M.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: em destaque dois clusters A, B, C (subtipos C1-C3), D e E, com descrição da amostra clínica, ano de isolamento e clínica de origem da amostra.

4.5.2 Discussão

As β -lactamases CTX-M foram inicialmente reportadas na segunda metade dos anos 80 do século XX, e sua disseminação mundial tem aumentado dramaticamente desde 1995 (BONNET, 2004). Como vários subtipos de CTX-M foram descritas quase que simultaneamente no mundo todo, o rápido crescimento desse grupo é melhor explicado pela disseminação de novos genes CTX-M das portadoras naturais para as demais bactérias do que pela transferência de CTX-M estabelecida de um país para outro (GOVINDEN; MOCKTAR, 2007).

O estudo da similaridade genética das amostras produtoras de CTX-M no presente estudo permitiu concluir que ocorreu, ao mesmo tempo, a disseminação

dos clones resistentes, que conseguem persistir por vários anos no ambiente hospitalar, e a transmissão de plasmídeos, contendo os genes de resistência. Esse fato é evidenciado com o achado de clones idênticos, apresentando diferentes tipos de CTX-M e amostras não relacionadas com a mesma enzima. A única enzima que não se disseminou foi a CTX-M-59, apresentada apenas por um único clone de *E. aerogenes*. Os clones não ficaram restritos a determinadas áreas hospitalares, estando presentes em UTIs e também em diversas unidades de internação do hospital estudado. Estiveram presentes, ainda, como agentes de infecções urinárias, respiratórias, bacteremias, entre outras.

Em *K. pneumoniae*, espécie com maior número de isolados bacterianos produtores de ESBL do tipo CTX-M, pôde-se observar a presença de dois grandes grupos de amostras altamente relacionadas, que foram chamados de grupo clonal A e subdivididos em subtipos A1-A15 (relacionados) e B. Nas amostras do grupo A podemos observar dois tipos de CTX-M, CTX-M-2 e CTX-M-9, mostrando que, além da disseminação clonal nesse grupo, deve ter ocorrido a aquisição de plasmídeos. O clone A esteve presente em amostras de *K. pneumoniae* obtidas durante todo o período do estudo, em diversas clínicas, causando diferentes infecções, mostrando que trata-se de um micro-organismo endêmico no hospital. O clone B não apresentou subclones, esteve presente nos anos de 2004 a 2008 em diferentes clínicas, mas principalmente em UTIs. Foi encontrado como agente responsável por infecções urinárias, de corrente sanguínea e respiratórias. As demais amostras apresentaram similaridade abaixo do limite de definição de amostra altamente relacionada ou relacionada.

Em *E. coli*, a disseminação foi principalmente policlonal, com pequenos grupos altamente relacionados, designados como grupos clonais A, B, C e D. O clone A foi encontrado em três amostras de urina de pacientes hematológicos no ano de 2008, sendo uma amostra produtora de CTX-M-15 e as demais produtoras de CTX-M-2. O clone B tem quatro representantes isoladas nos anos de 2007 e 2008, em diferentes clínicas e amostras. Nessas amostras, foram encontradas CTX-M-2 e CTX-M-8. O clone C esteve presente nos anos de 2004 a 2008, apresentou quatro amostras CTX-M-2 na UTI e dois subclones, um CTX-M-2 e um CTX-M-8, isolados em outras unidades hospitalares. O clone D apresentou dois representantes em clínicas, anos e amostras diferentes.

Em *E. aerogenes*, observou-se a disseminação de um clone produtor de CTX-M-59, que foi isolado durante os anos de 2004 a 2008. A maioria dos isolados eram provenientes de pacientes internados em UTI e semi-UTI, de amostras de sangue e urina. Apenas dois isolados não apresentavam relação clonal com os demais isolados e apresentaram perfis eletroforéticos únicos.

Em *E. cloacae* a disseminação foi principalmente policlonal, com quatro grupos principais, incluindo mais de três cepas semelhantes. Os grupos clonais foram denominados A, B, C, D e E, e todos apresentavam apenas ESBL do tipo CTX-M-2. Com exceção do clone E, que foi mais isolado em sangue, os demais foram predominantemente isolados de urina. O clone A foi isolado de 2004 a 2007, o clone B de 2005 a 2006, o C e o E de 2005 a 2007, o D de 2004 a 2006. Todos os clones foram encontrados em várias clínicas diferentes, demonstrando que estavam disseminados pelo hospital.

A enzima CTX-M-2, presente com maior frequência neste estudo, é também o tipo prevalente na América do Sul. Essa enzima foi descrita pela primeira vez em uma cepa de *Salmonella* isolada na Argentina (BAUERNFEIND *et al.*, 1996a) e, logo depois, foi relatada no Brasil e outros países da América do Sul (VILLEGAS *et al.*, 2008). É o tipo predominante em estudos brasileiros (CLIMACO; MINARINI; DA COSTA DARINI, 2010). No presente trabalho, foi encontrada em diversas espécies diferentes de enterobactérias.

O tipo CTX-M-59 foi encontrado em vários isolados de *E. aerogenes*. É originado da CTX-M-2 pela substituição do aminoácido H89L e foi descrita pela primeira vez no Brasil durante um surto policlonal por *K. pneumoniae* produtora de ESBL CTX-M (DE OLIVEIRA GARCIA *et al.*, 2008). O segundo e último relato também foi no Brasil, em isolados de *K. pneumoniae* (TOLLENTINO *et al.*, 2010), não havendo ainda relatos fora do Brasil ou em espécies diferentes.

O tipo CTX-M-15 foi identificado em *E. coli* (1), *E. cloacae* (1), *S. marcescens* (1). Esse tipo está disseminado no mundo todo, principalmente em *E. coli* e *K. pneumoniae* (PITOUT, 2010). Em alguns países, ocorreram surtos por um único clone de *E. coli*, identificado por MLST como clone O25:H-4- ST131, o qual está distribuído em diferentes regiões do mundo (NICOLAS-CHANOINE *et al.*, 2008). Essa enzima foi relatada no Brasil pela primeira vez em 2010 (TOLLENTINO *et al.*, 2010).

A enzima CTX-M-8 foi encontrada em quatro isolados de *E. coli*. Esse grupo foi descrito primeiramente no Brasil (BONNET *et al.*, 2000b), e a descrição em outro país aconteceu apenas em 2009, na Espanha (VINUE *et al.*, 2009).

A enzima CTX-M-9 e sua variante CTX-M-14 foram encontradas em nove e em uma amostra, respectivamente. A enzima CTX-M-9 já foi relatada em vários estudos brasileiros (MINARINI *et al.*, 2009; CLIMACO; MINARINI; DA COSTA DARINI, 2010) e está presente na Europa (LIVERMORE *et al.*, 2007), sendo considerada pandêmica, ao lado de CTX-M-15 (CANTON; COQUE, 2006). Uma nova variante, originada a partir de uma substituição do aminoácido A240G em CTX-M-9 é chamada CTX-M-16 e foi descrita no Brasil em 2001 (BONNET *et al.*, 2001). Outra variante chamada CTX-M-14 foi descrita pela primeira vez na China (CHANAWONG *et al.*, 2002) e já foi reportada no Brasil em 2010 (CERGOLINOVELLA *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que as β -lactamases do tipo CTX-M se disseminaram de forma horizontal e também vertical, provavelmente através da transferência de plasmídeos, sendo encontradas em várias espécies diferentes de enterobactérias. O tipo CTX-M é a ESBL predominante no hospital estudado e também no Brasil e em outros países. Além disso, a disseminação da resistência pode ocorrer por meio da transmissão de cepas resistentes. Os clones resistentes podem se estabelecer no ambiente hospitalar por vários anos, espalhando-se por todas as unidades hospitalares e causando diversos tipos de infecções.

4.6 DETECÇÃO DE AmpC PLASMIDIANA

4.6.1 Resultados

A pesquisa de β -lactamases do tipo AmpC plasmidiana foi realizada em amostras de *K. pneumoniae* (n = 20) e *E. coli* (n = 6), que apresentaram suscetibilidade reduzida às cefalosporinas de terceira geração e resistência à ceftazidima (item 3.3, FIGURA 3, perfil 2). O teste fenotípico foi positivo em três amostras de *E. coli*, e negativas para todas as amostras de *K. pneumoniae*, com os dois inibidores testados – ácido fenil borônico e cloxacilina (FIGURA 17). As PCRs para pesquisa dos genes foi negativa para todas as amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae* (ver ANEXO 3).



FIGURA 17 – TESTE FENOTÍPICO POSITIVO PARA A ENZIMA AmpC EM *E. coli*.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: APB = ácido fenil borônico; CAZ = ceftazidima; CFO = ceftaxima; CTX = cefotaxima.

Após o final do período de coleta das amostras (2003 a 2008), o monitoramento de AmpC continuou para detectar possíveis produtores de AmpC plasmidiana. Durante o ano de 2010, surgiram três possíveis casos em isolados de

E. coli, triados usando os critérios estabelecidos. As três amostras de *E. coli* foram positivas para AmpC nos métodos fenotípicos e na PCR para a pesquisa de genes codificadores de AmpC plasmidiana. O sequenciamento do produto de PCR permitiu identificar o gene *bla*_{CMY-2}. Elas apresentavam resistência à cefoxitina e cefalosporinas de terceira geração e eram ESBLs negativas. Uma das amostras era resistente ao ertapenem e intermediária ao meropenem. Foi realizada, ainda, análise da similaridade genética entre as amostras por PFGE, e constatou-se que se tratava de amostras não relacionadas. Essas amostras foram os primeiros casos de AmpC plasmidiana detectados no hospital estudado.

4.6.2 Discussão

A produção de AmpC plasmidiana tem sido frequente em isolados de *E. coli* e *Klebsiella* spp., sendo que a cefoxitina pode ser usada como um marcador, pois é degradada pela AmpC, mas não por ESBL. Entre as 26 amostras resistentes à cefoxitina testadas no presente estudo, nove eram produtoras de ESBL e nenhuma foi positiva para AmpC plasmidiana nos testes fenotípicos ou genotípicos. Os mecanismos mais prováveis para resistência à cefoxitina é a redução da permeabilidade ou hiperprodução de β -lactamases de pequeno espectro (NIKAIDO, 2003; BLACK; MOLAND; THOMSON, 2005; MARTINEZ-MARTINEZ, 2008).

Os primeiros casos de AmpC plasmidiana foram encontrados no ano de 2010 em três amostras de *E. coli*. Vários relatos vêm ocorrendo no mundo todo. No Brasil, apenas um trabalho foi publicado relatando a presença de AmpC plasmidiana do tipo CMY-2 (PAVEZ *et al.*, 2008); o mesmo tipo encontrado neste trabalho. O tipo CMY também já foi encontrado na Argentina (RAPOPORT *et al.*, 2008) e é também o mais frequente em outros locais (DOI; PATERSON, 2007; DA SILVA DIAS *et al.*, 2008; DING *et al.*, 2008; MAMMERI *et al.*, 2008a; MAMMERI *et al.*, 2008b; PAVEZ *et al.*, 2008; RAJNI *et al.*, 2008; RAPOPORT *et al.*, 2008; SINHA *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008b; JACOBY, 2009; TENOVER *et al.*, 2009; THOMSON, 2010).

A presença em três amostras positivas para AmpC plasmidiana não relacionadas a *E. coli* demonstra a possível circulação do plasmídeo que contém o gene *ampC* no hospital. Os plasmídeos contendo *ampC* são, em geral, transferíveis e contém outros genes de resistência associados (JACOBY, 2009; THOMSON, 2010).

Uma das amostras foi resistente a carbapenêmicos. A mesma não possuía nenhuma carbapenemase, o que demonstra a possível presença de AmpC associada à perda de porinas, explicando o fenótipo de resistência apresentado por essa cepa. O produtor de CMY-2 isolado anteriormente no Brasil também era resistente a carbapenêmicos (PAVEZ *et al.*, 2008).

4.7 DETECÇÃO DE KPC

4.7.1 Resultados

A pesquisa de carbapenêmicos foi realizada em 95 amostras de enterobactérias com redução da sensibilidade a carbapenêmicos, conforme os critérios estabelecidos (item 3.3, FIGURA 3, perfil 3). As amostras de enterobactérias pertenciam às seguintes espécies: *E. cloacae* (n = 75), *K. pneumoniae* (n = 9), *E. aerogenes* (n = 5), *S. marcescens* (n = 3) e *E. coli* (n = 2). Todas foram negativas no teste de Hodge e também na PCR para pesquisa das carbapenemases KPC, IMP e SPM (ver ANEXO 3).

Após o período de coleta de amostras (2003 a 2008), houve o monitoramento contínuo para detectar cepas produtoras de carbapenemases. Em julho de 2010 foram detectadas três cepas com sensibilidade reduzida a carbapenêmicos e teste de Hodge positivo (FIGURA 18). Essas amostras apresentaram PCR positiva para o gene KPC, sendo os primeiros casos desse mecanismo de resistência no Hospital de Clínicas da UFPR.

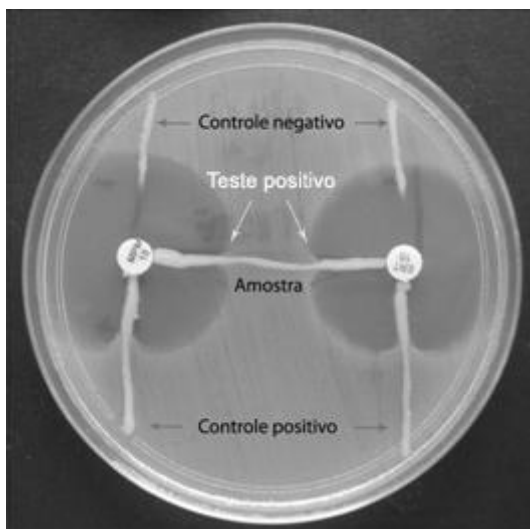


FIGURA 18 – TESTE DE HODGE POSITIVO.

FONTE: O autor (2010).

NOTA: discos usados: MPM = meropenem e ERT = ertapenem.

Os produtos de PCR foram sequenciados e as sequências identificadas como *bla*_{KPC-2}. As amostras foram avaliadas quanto à similaridade genética por PFGE, o que mostrou tratar-se de um único clone, ou seja, a disseminação de uma única cepa.

4.7.2 Discussão

As carbapenemases vêm se disseminando entre as enterobactérias e são um importante mecanismo de resistência a carbapenêmicos nessas espécies. Entre as 95 amostras estudadas durante o período de 2003 a 2008, nenhuma foi positiva nos testes fenotípicos ou genotípicos usados para detecção. Entre essas amostras, 65 eram produtoras de ESBL, distribuídas em *E. cloacae* (n = 54), *K. pneumoniae* (n = 6), *E. aerogenes* (n = 2), *S. marcescens* (n = 1) e *E. coli* (n = 2). A produção de ESBL sozinha não confere resistência a carbapenêmicos, mas associada à perda de porinas pode conferir resistência (WEBSTER *et al.*, 2010). Nas amostras não produtoras de ESBL, o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos são outras β -lactamases como AmpC, também associada à redução da permeabilidade (JACOBY, 2009).

A maioria das amostras (n = 88 / 92,6%) foi resistente somente a ertapenem. Vários autores relatam a redução da permeabilidade como importante mecanismo de resistência ao ertapenem, principalmente quando associado às β -lactamases (DOUMITH *et al.*, 2009; LEAVITT *et al.*, 2009; HERNANDEZ; CONEJO; PASCUAL, 2010).

A produção de KPC foi detectada pela primeira vez no ano de 2010. O tipo KPC-2 é o tipo descrito na América do Sul e em vários hospitais brasileiros (VILLEGAS *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2009; PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009; PEIRANO *et al.*, 2009).

As amostras pertenciam a um mesmo clone, indicando infecção cruzada. Dois dos três pacientes ficaram internados na mesma unidade, mas um deles não teve nenhum tipo de contato com os demais e a fonte da infecção desse caso não foi determinada.

4.8 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE BACTEREMIAS POR *Enterobacter* spp. PRODUTOR DE ESBL

4.8.1 Resultados

Foi realizado um levantamento sobre a importância de *Enterobacter* spp. como agente de bacteremia. O período avaliado com essa finalidade foram os anos de 2004 a 2008. Durante esses cinco anos, foram obtidas 5.056 hemoculturas positivas, das quais *Enterobacter* spp. foi o agente bacteriano isolado em 227 amostras, o que corresponde a uma prevalência média de 4,5%. Desse total, a frequência de isolamento entre as espécies foi a seguinte: *Enterobacter cloacae* (121/227; 53,3%), *E. aerogenes* (100/227; 44,5%), *E. gergoviae* (5/227; 2,2%) e *E. sakazakii* (1/227; 0,4%). Calculando a prevalência por ano, observou-se uma variação de 2,7% em 2004 para 5,8% em 2008, sugerindo que *Enterobacter* spp. vem tendo uma importância cada vez maior como agente de infecções hospitalares.

A pesquisa mostrou que os 227 frascos de hemocultura positivos pertenciam a 211 pacientes diferentes, sendo que 41 (19,4%) apresentaram *Enterobacter* spp. produtores de ESBL e 170 (80,6%) apresentaram *Enterobacter* spp. não produtores de ESBL. Entre os produtores de ESBL, 20 eram *E. cloacae* e 21 eram *E. aerogenes*.

A média de idade dos pacientes foi de aproximadamente 50 anos e não houve diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias acometidas nos dois grupos ($p = 0,48$). A distribuição entre as faixas etárias pode ser visualizada no GRÁFICO 6.

Também não houve variação quanto ao gênero acometido nos dois grupos ($p = 0,259$). As clínicas de internamento também tiveram distribuição semelhante, com exceção do internamento em UTI, que teve prevalência maior ($p < 0,05$) entre o grupo com *Enterobacter* spp. produtor de ESBL (65,9%) quando comparado com o *Enterobacter* spp. não produtor de ESBL (48,3%). Dessa forma, a internação em UTI aumentou o risco de infecção por cepas produtoras de ESBL em relação às amostras não produtoras. Da mesma forma, a média de dias internados antes da infecção foi semelhante entre os dois grupos, variando apenas as médias de dias internados em UTI (TABELA 6).

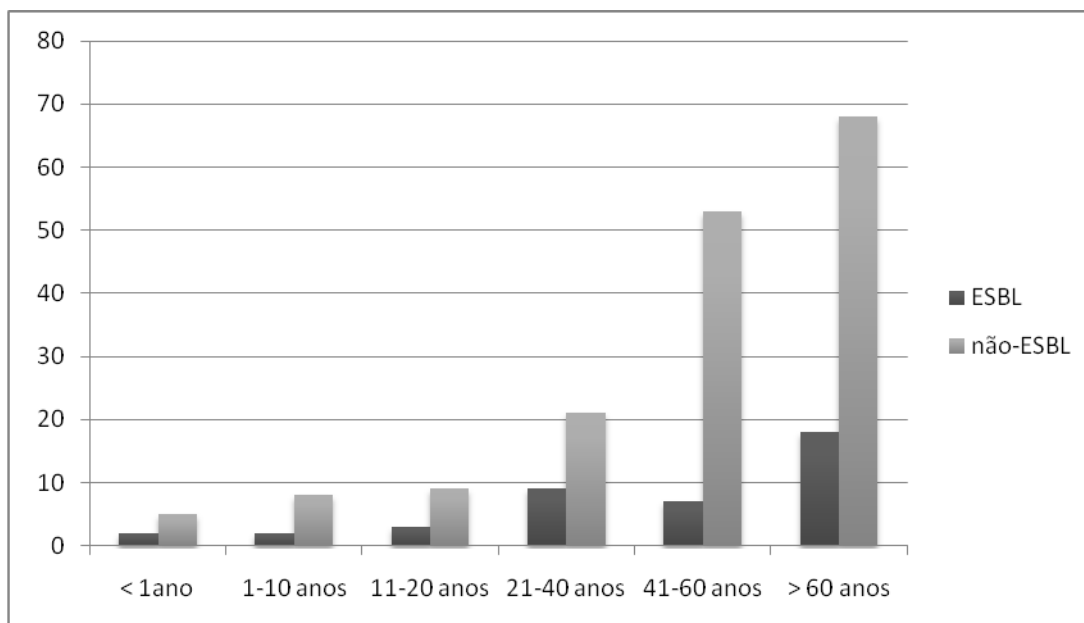


GRÁFICO 6 – DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE BACTEREMIA POR *Enterobacter* spp. ESBL E NÃO ESBL POR FAIXA ETÁRIA.

Quanto às doenças de base e comorbidades avaliadas, apenas duas diferenças significativas foram encontradas. As doenças do trato gastrointestinal ofereceram um risco menor para infecção por *Enterobacter* spp. ESBL que não ESBL ($p < 0,05$), enquanto pneumonia anterior à bacteremia indicou ser um fator de risco maior para a infecção por ESBL que por não ESBL ($p < 0,05$). Entre os procedimentos invasivos a que os pacientes foram submetidos durante o internamento, nenhum representou um risco maior para infecção por ESBL, assim como os antimicrobianos utilizados antes da bacteremia.

Quanto ao desfecho clínico, não houve diferença significativa entre o número de pacientes que receberam alta e foram a óbito nos dois grupos. Também não houve diferença quanto ao número de óbitos relacionados à infecção. O único fator diferente no desfecho foi o número de dias que os pacientes permaneceram internados após o resultado, mostrando que a bacteremia por *Enterobacter* spp. aumenta a permanência nos hospitais e que a presença de ESBL faz com que o aumento seja ainda maior. Os resultados obtidos podem ser visualizados nas TABELAS 6 e 7.

Quando foi avaliada a influência do atraso ou ausência da terapia adequada no óbito e no óbito relacionado, não foi encontrada diferença significativa ($p = 0,12$ para óbito e $p = 0,42$ para óbito relacionado). Também não houve diferença

estatística quando as variáveis terapia empírica adequada e presença de ESBL foram avaliadas simultaneamente quanto à influência no óbito ($p = 0,13$) e no óbito relacionado ($p = 0,99$).

O resultado da cultura influenciou mudança na antibioticoterapia em 75% dos pacientes com *Enterobacter* produtor de ESBL e em 40,6% dos pacientes com *Enterobacter* não ESBL ($p = 0,0003$). Na maioria dos casos, a troca foi de cefalosporinas para carbapenêmicos entre os produtores de ESBL e de cefalosporinas para carbapenêmico ou cefepime para os não ESBL.

Dos 41 pacientes com bacteremia por *Enterobacter* spp. ESBL positivo, foi possível recuperar 33 amostras (12 *E. cloacae* e 21 *E. aerogenes*) para sequenciamento dos genes de resistência e epidemiologia por PFGE. Os resultados obtidos podem ser observados nas FIGURAS 21 e 22. Nota-se a prevalência de ESBL do tipo CTX-M em 29 das 33 amostras estudadas, das quais algumas amostras apresentavam a CTX-M associada com outras β -lactamases como TEM-1 e SHV-11 (não ESBLs). ESBLs do tipo SHV-12, TEM-136 e PER-2 foram encontradas em um número menor de cepas. Podemos observar também que *E. aerogenes* tem um perfil principalmente clonal (FIGURA 20) e foi predominante em UTI e semiUTI, enquanto *E. cloacae* é principalmente policlonal (FIGURA 19) e foi predominante em clínicas com pacientes imunocomprometidos.

TABELA 6 – FATORES DE RISCO E DESFECHO CLÍNICO DE *Enterobacter* spp. ESBL E NÃO ESBL.

	ESBL (n = 41) N (%)	Não ESBL (n = 164) N (%)	Odds Ratio OR	P
Internamento em UTI	27 (65,9)	79 (48,2)	2,08	0,042
Doenças do TGI	8 (19,5)	69 (42,1)	0,33	0,007
Doenças respiratórias	11 (26,8)	36 (22,0)	1,30	0,506
Neoplasia	12 (29,3)	46 (28,0)	1,06	0,876
Doenças do SNC	9 (22,0)	53 (32,3)	0,59	0,196
Doenças renais	5 (12,8)	27 (19,0)	0,63	0,369
Doenças cardiovasculares	18 (43,9)	80 (48,8)	0,82	0,575
Sonda vesical de demora	14 (35,0)	55 (33,5)	1,07	0,860
Cateter venoso central	17 (41,5)	87 (53,0)	0,63	0,184
Ventilação mecânica	27 (65,9)	82 (50,0)	1,93	0,068
Traqueostomia	16 (39,0)	42 (25,6)	1,86	0,088
Cirurgia	6 (14,6)	76 (46,3)	0,20	0,0002
Infecções anteriores	26 (63,4)	91 (55,5)	1,39	0,359
Pneumonia	23 (56,1)	51 (31,1)	2,83	0,003
Infecção trato urinário	10 (25,0)	32 (19,5)	1,37	0,441
Abdominal	1 (2,5)	13 (7,9)	0,30	0,197
Ferida cirúrgica	2 (5,0)	15 (9,2)	0,52	0,309
Antibioticoterapia prévia	37 (90,2)	157 (96,3)	0,36	0,117
Quinolona	9 (22,0)	26 (16,0)	1,47	0,371
Cefalosporina TG	6 (14,6)	56 (34,6)	0,32	0,013
Cefalosporina QG	19 (46,3)	67 (41,6)	1,21	0,584
Carbapenem	7 (17,1)	62 (38,5)	0,33	0,009
Pip/Tazo	5 (12,2)	30 (19,0)	0,59	0,308
Alta	23 (56,1)	83 (50,6)	1,25	0,529
Óbito	18 (43,9)	81 (49,4)	0,80	0,529
Óbito relacionado	8 (19,5)	22 (13,4)	1,56	0,323

FONTE: O autor (2010).

TABELA 7 – CORRELAÇÃO ENTRE PERMANÊNCIA HOSPITALAR E DESFECHO CLÍNICO COM INFECÇÃO POR *Enterobacter* spp. ESBL E NÃO ESBL.

	ESBL	Não ESBL	P
Permanência hospitalar (dias)	Média± Desvio padrão	Média± Desvio padrão	
Antes da cultura	23,6± 18,5	22,3±19,1	0,456
UTI antes da cultura	10,5±10,8	9,7±18,8	0,038
Após cultura (até a alta)	22,5±20,3	15,2±17,5	0,038

FONTE: O autor (2010).

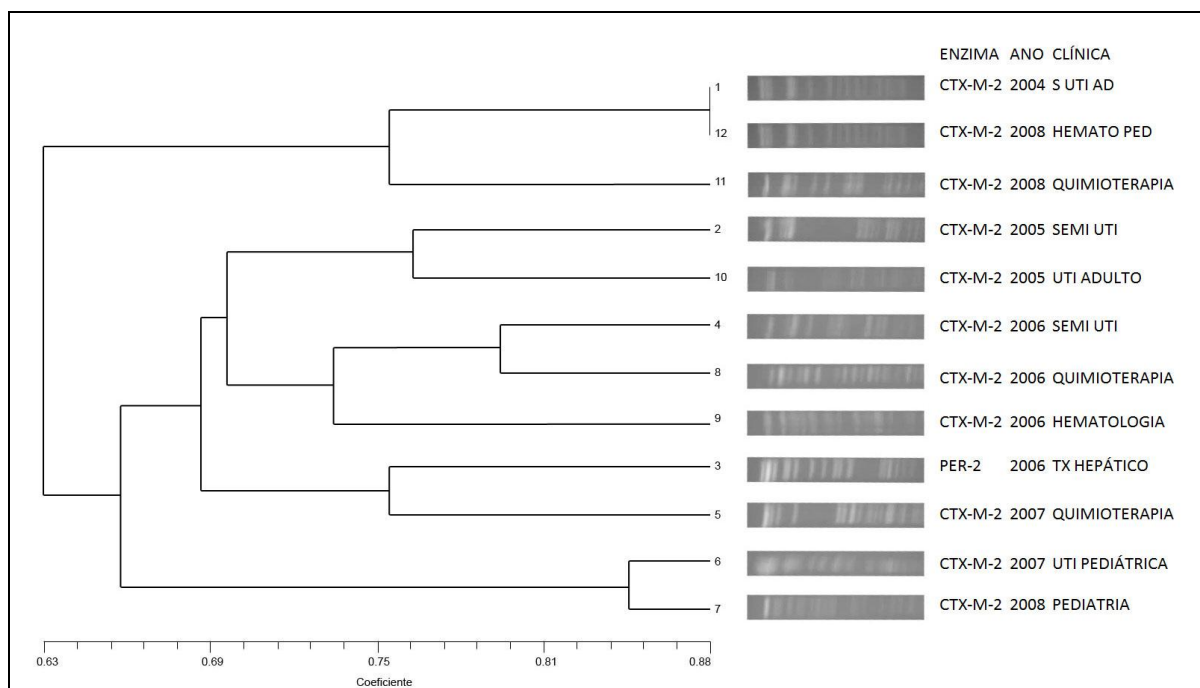


FIGURA 19 – DENDROGRAMA OBTIDO A PARTIR DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS DE AMOSTRAS DE *E. cloacae* PRODUTORAS DE ESBL, TIPOS DE ESBL, CLÍNICA DE INTERNAMENTO E ANO DO ISOLAMENTO DO MICRO-ORGANISMO.
 FONTE: O autor (2010).

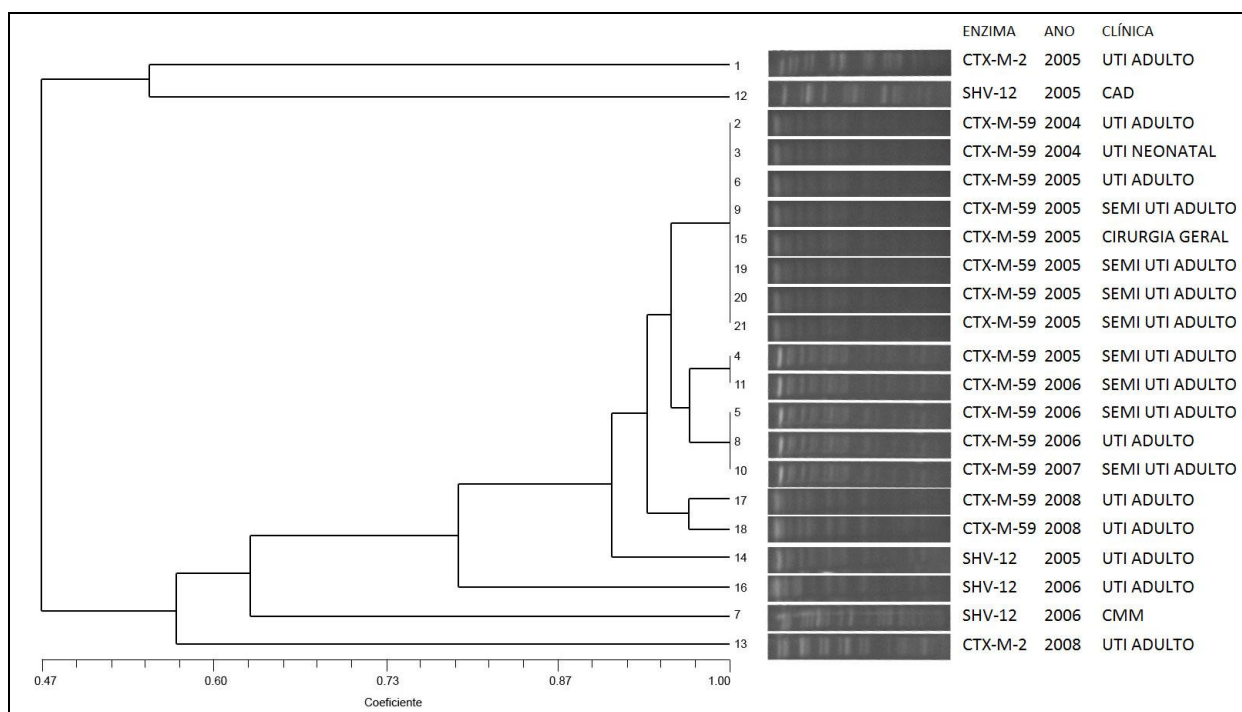


FIGURA 20 – DENDROGRAMA OBTIDO A PARTIR DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS EM PFGE DE AMOSTRAS DE *E. aerogenes* PRODUTORAS DE ESBL, TIPOS DE ESBL, CLÍNICA DE INTERNAMENTO E ANO DO ISOLAMENTO DO MICRO-ORGANISMO.
 FONTE: O autor (2010).

4.8.2 Discussão

A emergência de *Enterobacter* spp. em infecções da corrente sanguínea vem sendo descrita nos últimos anos. No presente estudo, *Enterobacter* spp. foi responsável por 4,5% das bacteremias no período de 2004 a 2008, com um aumento na frequência de isolamento no decorrer dos cinco anos avaliados. Um estudo realizado na Índia (GUPTA *et al.*, 2003) apresentou resultados semelhantes. Outro estudo realizado na Espanha, entre 1991 e 2006, apresentou uma média de 2,2%, porém, com aumento anual, que chegou a 3,4% em 2006 (MARCOS *et al.*, 2008). Esses resultados confirmam que *Enterobacter* spp. é um patógeno emergente e sua presença deve ser considerada em bacteremias hospitalares.

A predominância de *E. cloacae*, seguido de *E. aerogenes*, e a menor participação das outras espécies (*E. gergoviae* e *E. sakazakii*), como agentes de bacteremias, também é compatível com os resultados encontrados por outros autores (SANDERS; SANDERS, 1997; GUPTA *et al.*, 2003).

A produção de ESBL vem apresentando importância aumentada em *Enterobacter* spp.. Observou-se que dentre os *Enterobacter* spp. isolados de hemocultura, 19,4% eram produtores de ESBL. Um trabalho realizado na Coreia do Sul encontrou 43% dos *Enterobacter* spp. isolados de hemocultura com ESBL (PAI *et al.*, 2004), e outro em Hong-Kong encontrou 6,5% (HO *et al.*, 2005), mostrando que a ocorrência varia entre países, sendo maior onde a prevalência geral de ESBL em enterobactérias é maior.

Em estudos que comparam os fatores de risco para infecção por cepas produtoras de ESBL e não produtoras de ESBL, em espécies como *Klebsiella* spp., *E. coli* e *Proteus mirabilis*, nas quais esse é o principal mecanismo de resistência às cefalosporinas de amplo espectro, encontram-se fatores que favorecem a infecção por de cepas produtoras de ESBL como antibioticoterapia prévia, gravidade da doença de base, transmissão cruzada (GARCIA HERNANDEZ *et al.*, 2010), longo período de hospitalização (RODRIGUEZ-BANO *et al.*, 2010), idade avançada, doenças crônicas (MARCHAIM *et al.*, 2010), entre outros. Por outro lado, poucas diferenças foram encontradas entre os fatores de risco para bacteremia por *Enterobacter* spp. ESBL em comparação a *Enterobacter* spp. não ESBL. Provavelmente porque *Enterobacter* spp. possui outro mecanismo importante de resistência, a AmpC cromossômica, que também confere resistência, fazendo com

que esses fatores tenham menor influência na seleção dos produtores de ESBL nessas espécies.

A associação de doenças do trato gastrointestinal e cirurgias (maioria do aparelho digestivo) com bacteremias por não produtores de ESBL é compatível com o fato de que a infecção, nesses casos, tem como causa principal a translocação de *Enterobacter* spp. situado no trato gastrointestinal do paciente. A pneumonia foi um fator predisponente para bacteremia por produtores de ESBL, por ser uma infecção por cepas de origem hospitalar. Da mesma forma, o internamento e maior permanência em UTI foram relevantes na aquisição de *Enterobacter* produtor de ESBL, pela chance maior de aquisição de patógenos presentes no ambiente hospitalar. Essa afirmação pode ser confirmada pela clonalidade observada entre as cepas de *E. aerogenes* isoladas do sangue de pacientes da UTI e semiUTI que persistiram por anos no hospital.

Muitos estudos associam a produção de ESBL com maior mortalidade, maior permanência no hospital, atraso na terapia adequada e aumento dos custos do tratamento. A maioria desses trabalhos foi realizada comparando *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *P. mirabilis* ESBL e não ESBL (SCHWABER; CARMELI, 2007; MARCHAIM *et al.*, 2010; TUMBARELLO *et al.*, 2010). No presente trabalho, a mortalidade foi 43,9% e 49,4% para os pacientes com bacteremia por *Enterobacter* ESBL e não ESBL, respectivamente, sendo que 19,5% (ESBL) e 13,4% (não ESBL) dos óbitos puderam ser associados à infecção. A mortalidade associada à bacteremia por *Enterobacter*, em geral, é igual à mortalidade associada à bacteremia por outros bacilos Gram-negativos, variando de 12% a 30% (SANDERS; SANDERS, 1997; MARCOS *et al.*, 2008). A mortalidade devido à infecção encontrada neste estudo está dentro da média, não havendo diferença entre os isolados ESBLs e não ESBLs. Acreditamos que esse dado difere daqueles encontrados para outras espécies pelo perfil de multirresistência encontrado em isolados de *Enterobacter* spp., mesmo na ausência de ESBL.

Por outro lado, o trabalho confirmou que a presença de ESBL aumenta a permanência hospitalar e provavelmente os custos, que apesar de não terem sido diretamente avaliados, podem ser estimados como maiores, visto que os pacientes com bacteremia por *Enterobacter* spp. ESBL permaneceram internados em média sete dias a mais que aqueles com bacteremia por *Enterobacter* spp. não ESBL.

A maioria dos estudos que avaliam os fatores associados à mortalidade em infecções por bactérias produtoras de ESBL define como principal causa o atraso na antibioticoterapia correta (SCHWABER; CARMELI, 2007; MARCHAIM *et al.*, 2010). A avaliação da antibioticoterapia empírica usada e o óbito relacionado no presente trabalho demonstraram que os dados não se aplicam a infecções por *Enterobacter* ESBL da mesma forma que para *E. coli* e *Klebsiella*-ESBL.

A detecção de ESBL foi utilizada para ajuste da terapia em 75% dos pacientes. Mostrando que além da importância epidemiológica da detecção de ESBL, existe também a importância terapêutica, já que se essas amostras não tivessem sido relatadas como produtoras de ESBL, o tratamento poderia não ter sido alterado após liberação do resultado.

O tipo de ESBL predominante foi o CTX-M-2, tipo com maior prevalência no mundo, principalmente na América do Sul (GOVINDEN *et al.*, 2007). Foi encontrado um isolado com PER-2, outro tipo de ESBL importante na América do Sul (VILLEGAS *et al.*, 2008), mas que ainda não havia sido relatado no Brasil, dois isolados TEM-136 e um SHV-12, tipo comum em *Enterobacter* spp. nos EUA (TOWNE *et al.*, 2010).

A transmissão cruzada foi mais importante em *E. aerogenes* que em *E. cloacae*. A detecção de tipos de ESBLs diferentes em clones idênticos e tipos iguais de ESBLs em diferentes clones sugere que a transferência de plasmídeos é o mecanismo mais importante de disseminação da resistência, o que reforça a necessidade da detecção de ESBL nessas espécies. A detecção pode ajudar na implementação de medidas de controle, a fim de evitar que a prevalência aumente ainda mais, não só em *Enterobacter* spp., mas também nas demais espécies de bacilos Gram-negativos presentes no ambiente hospitalar, principalmente porque esses plasmídeos carregam não só genes para ESBL, mas, na maioria das vezes, múltiplos genes de resistência a outros antimicrobianos (THOMSON, 2010).

5 CONCLUSÃO

A prevalência de ESBL em enterobactérias é elevada no Hospital de Clínicas, tendo sido encontrada em diversas espécies de enterobactérias. A espécie com maior prevalência foi *E. aerogenes*, seguida de *K. pneumoniae* e *E. cloacae*. O tipo de ESBL predominante foi o tipo CTX-M, principalmente o subtipo CTX-M-2. O tipo SHV foi o segundo mais encontrado, sendo a maioria do subtipo SHV-12. As ESBLs TEM-136 e PER-2 foram encontradas em um pequeno número de isolados.

Os antimicrobianos com melhor atividade contra bactérias produtoras de ESBL foram imipenem e meropenem, seguidos de tigeciclina e ertapenem. Várias amostras produtoras de ESBL apresentaram-se sensíveis a cefalosporinas e aztreonam, segundo a interpretação atual recomendada pelo CLSI e EUCAST.

A detecção fenotípica de ESBL em *Enterobacter* spp. é possível com modificações como a redução da distância entre os discos no teste de duplo disco difusão, a redução do ponto de corte para ≥ 3 mm no disco combinado e inclusão de um disco de cefepime ou de um inibidor de AmpC no teste. Os melhores resultados foram obtidos com o teste de disco combinado realizado em ágar Mueller Hinton contendo cloxacilina.

As β -lactamases AmpC plasmidiana e carbapenemases (KPC, SPM e IMP) não foram encontradas nas amostras isoladas no período de 2003 a 2008. Apenas em 2010 surgiram os três primeiros casos de *E. coli* produtoras de AmpC plasmidiana e os três primeiros casos de *K. pneumoniae* produtoras de KPC no hospital estudado.

A análise da similaridade genética por PFGE evidenciaram que as amostras produtoras de AmpC eram não relacionadas, enquanto as amostras produtoras de KPC eram altamente relacionadas. As amostras produtoras de CTX-M foram identificadas como altamente relacionadas em *E. aerogenes* e não relacionadas, com presença de alguns grupos relacionados, nas demais espécies.

A presença de ESBL em *Enterobacter* spp. foi um fator importante, pois, apesar de não ter contribuído para o aumento da mortalidade, aumentou a permanência no hospital e, conseqüentemente, o custo do tratamento.

A detecção de ESBL continua sendo importante para fins epidemiológicos e, apesar das mudanças propostas pelos comitês internacionais, mais estudos são necessários antes de ser definida sua importância na escolha terapêutica.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Será realizado o sequenciamento dos genes das ESBLs do tipo CTX-M que não foram sequenciados (24 amostras) por terem sido detectados apenas no final do trabalho, não havendo tempo hábil para realizá-lo antes da defesa.

Será realizada a análise de similaridade genética das amostras produtoras de ESBL que ainda não foram incluídas (produtoras de SHV, TEM, PER e as produtoras de CTX-M não incluídas por terem sido detectadas tardiamente).

As 22 amostras com teste fenotípico positivo e genotípico negativo para produção de ESBL serão estudadas quanto à presença de outros tipos de ESBL ainda não pesquisados.

As amostras resistentes a carbapenêmicos serão estudadas quanto à redução na permeabilidade aos antimicrobianos.

O artigo sobre bacteremia por *Enterobacter* spp. ESBL *versus* não ESBL será submetido à avaliação para publicação no *American Journal of Hospital Infection Control*.

Um artigo sobre os resultados de prevalência de ESBL e tipos de ESBL presentes no hospital estudado será confeccionado a partir dos dados obtidos e submetido à avaliação para publicação em periódico científico a definir.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTAR-CURIEL, D., *et al.* Nosocomial bacteremia and urinary tract infections caused by extended-spectrum beta -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* with plasmids carrying both SHV-5 and TLA-1 genes. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 8, p. 1067-74, 2004.
- ALVAREZ-LERMA, F.; GRAU, S.; FERRANDEZ, O. Characteristics of doripenem: a new broad-spectrum antibiotic. **Drug Des Devel Ther**, v. 3, n., p. 173-90, 2009.
- AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 289, n. 1036, p. 321-31, 1980.
- ANDERSON, E. S.; DATTA, N. Resistance to Penicillins and Its Transfer in Enterobacteriaceae. **Lancet**, v. 1, n. 7382, p. 407-9, 1965.
- ANDERSON, K. F., *et al.* Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 8, p. 2723-5, 2007.
- ANDES, D.; CRAIG, W. A. Treatment of infections with ESBL-producing organisms: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. **Clin Microbiol Infect**, v. 11 Suppl 6, n., p. 10-7, 2005.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Nota técnica no 1/2010. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes, 2010.
- ARLET, G., *et al.* Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. **FEMS Microbiol Lett**, v. 134, n. 2-3, p. 203-8, 1995.
- BABIC, M.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on β -lactamases. **Drug Resist Updat**, v. 9, n. 3, p. 142-56, 2006.
- BARANIAK, A., *et al.* Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) in Poland. **J Antimicrob Chemother**, v. 50, n. 3, p. 393-6, 2002.
- BARTHELEMY, M., *et al.* Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1122, n. 1, p. 15-22, 1992.
- BASSETTI, M., *et al.* Tigecycline use in serious nosocomial infections: a drug use evaluation. **BMC Infect Dis**, v. 10, n., p. 287, 2010.
- BAUER, A. W., *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Tech Bull Regist Med Technol**, v. 36, n. 3, p. 49-52, 1966a.

BAUER, A. W., *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**, v. 45, n. 4, p. 493-6, 1966b.

BAUERNFEIND, A., *et al.* Sequences of β -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 2, p. 509-13, 1996a.

BAUERNFEIND, A., *et al.* Characterization of β -lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A β -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 3, p. 616-20, 1996b.

BAUGHMAN, R. P. The use of carbapenems in the treatment of serious infections. **J Intensive Care Med**, v. 24, n. 4, p. 230-41, 2009.

BERNARD, H., *et al.* A novel plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. **J Antimicrob Chemother**, v. 29, n. 5, p. 590-2, 1992.

BERTRAND, X., *et al.* Molecular epidemiology of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamase in a French university-affiliated hospital. **Int J Antimicrob Agents**, v. 22, n. 2, p. 128-33, 2003.

BHAT, S. V., *et al.* Failure of current cefepime breakpoints to predict clinical outcomes of bacteremia caused by gram-negative organisms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 12, p. 4390-5, 2007.

BHATTACHARYA, M.; PARAKH, A.; NARANG, M. Tigecycline. **J Postgrad Med**, v. 55, n. 1, p. 65-8, 2009.

BLACK, J. A.; MOLAND, E. S.; THOMSON, K. S. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC β -lactamases. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 7, p. 3110-3, 2005.

BOGAERTS, P., *et al.* Emergence and dissemination of BEL-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgium. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 4, p. 1584-5, 2007.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004.

BONNET, R., *et al.* Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 8, p. 2269-75, 2001.

BONNET, R., *et al.* A novel class A extended-spectrum β -lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 11, p. 3061-8, 2000a.

BONNET, R., *et al.* A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 7, p. 1936-42, 2000b.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 4, p. 933-51, table of contents, 2001.

BRANGER, C., *et al.* Epidemiological typing of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates responsible for five outbreaks in a university hospital. **J Hosp Infect**, v. 36, n. 1, p. 23-36, 1997.

BROLUND, A., *et al.* Development of a real-time SYBRGreen PCR assay for rapid detection of acquired AmpC in Enterobacteriaceae. **J Microbiol Methods**, v. 82, n. 3, p. 229-33, 2010.

BUSH, K. Characterization of β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 33, n. 3, p. 259-63, 1989a.

BUSH, K. Classification of β -lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 33, n. 3, p. 264-70, 1989b.

BUSH, K. Classification of β -lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 33, n. 3, p. 271-6, 1989c.

BUSH, K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin Infect Dis**, v. 32, n. 7, p. 1085-9, 2001.

BUSH, K. Extended-spectrum β -lactamases in North America, 1987-2006. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, n., p. 134-43, 2008.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 3, p. 969-76, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 6, p. 1211-33, 1995.

CANTON, R.; COQUE, T. M. The CTX-M β -lactamase pandemic. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 466-75, 2006.

CANTON, R., *et al.* IRT and CMT β -lactamases and inhibitor resistance. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, n., p. 53-62, 2008a.

CANTON, R., *et al.* Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, n., p. 144-53, 2008b.

CAO, V., *et al.* Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 12, p. 3739-43, 2002.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2227-38, 2009.

CARTER, M. W., *et al.* Detection of extended-spectrum β -lactamases in klebsiellae with the Oxoid combination disk method. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 11, p. 4228-32, 2000.

CARTWRIGHT, S. J.; WALEY, S. G. Purification of β -lactamases by affinity chromatography on phenylboronic acid-agarose. **Biochem J**, v. 221, n. 2, p. 505-12, 1984.

CARVALHAES, C. G., *et al.* Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 2, p. 249-51, 2010.

CELENZA, G., *et al.* Spread of bla(CTX-M-type) and bla(PER-2) β -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, n. 5, p. 975-8, 2006.

CERGOLE-NOVELLA, M. C., *et al.* First description of bla(CTX-M-14)- and bla(CTX-M-15)-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **Microb Drug Resist**, v. 16, n. 3, p. 177-84, 2010.

CHANAWONG, A., *et al.* SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. **J Antimicrob Chemother**, v. 48, n. 6, p. 839-52, 2001.

CHANAWONG, A., *et al.* Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 3, p. 630-7, 2002.

CLIMACO, E. C.; MINARINI, L. A.; DA COSTA DARINI, A. L. CTX-M-producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years? **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 68, n. 2, p. 186-9, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standards, eighth Edition; CLSI document M07-A8. Wayne, PA 2009a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement; CLSI document M100-S19. document M100-S19. Wayne, PA 2009b.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement M100-S20. Wayne, PA, USA 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement M100-S20b. Wayne, PA, USA 2010b.

COHEN STUART, J., *et al.* Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 7, p. 1377-81, 2010.

COLODNER, R., *et al.* Risk factors for the development of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 23, n. 3, p. 163-7, 2004.

CONEJO, M. C.; HERNANDEZ, J. R.; PASCUAL, A. Effect of porin loss on the activity of tigecycline against *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases or plasmid-mediated AmpC-type β -lactamases. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 61, n. 3, p. 343-5, 2008.

COQUE, T. M., *et al.* Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 2, p. 195-200, 2008.

CORKILL, J. E., *et al.* SHV-27, a novel cefotaxime-hydrolysing β -lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. **J Antimicrob Chemother**, v. 47, n. 4, p. 463-5, 2001.

CORMICAN, M. G.; MARSHALL, S. A.; JONES, R. N. Detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 8, p. 1880-4, 1996.

COUDRON, P. E. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 8, p. 4163-7, 2005.

DA FONSECA, E. L., *et al.* Emergence of bla_{GES-5} in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, n. 3, p. 576-7, 2007.

DA SILVA DIAS, R. C., *et al.* Prevalence of AmpC and other β -lactamases in enterobacteria at a large urban university hospital in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 60, n. 1, p. 79-87, 2008.

DAOUD, Z.; HAKIME, N. [Prevalence and susceptibility patterns of extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general university hospital in Beirut, Lebanon]. **Rev Esp Quimioter**, v. 16, n. 2, p. 233-8, 2003.

DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. **Nature**, v. 208, n. 5007, p. 239-41, 1965.

DE CHAMPS, C., *et al.* Clinical relevance of *Proteus mirabilis* in hospital patients: a two year survey. **J Antimicrob Chemother**, v. 45, n. 4, p. 537-9, 2000.

DE CHAMPS, C., *et al.* Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum- β -lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae in an intensive care unit. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 12, p. 2887-90, 1989.

DE OLIVEIRA GARCIA, D., *et al.* Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 5, p. 1790-3, 2008.

DING, H., *et al.* The prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children's hospitals in China. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 27, n. 10, p. 915-21, 2008.

DOCQUIER, J. D., *et al.* Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine- β -lactamase and VIM-2 metallo- β -lactamase. **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 5, p. 910-1, 2001.

DOI, Y.; PATERSON, D. L. Detection of plasmid-mediated class C β -lactamases. **Int J Infect Dis**, v. 11, n. 3, p. 191-7, 2007.

DOI, Y., *et al.* Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type β -lactamase by use of a boronic acid compound. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 12, p. 4083-6, 2008.

DOUMITH, M., *et al.* Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp.. clinical isolates from the UK. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 4, p. 659-67, 2009.

DRIEUX, L., *et al.* Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, n., p. 90-103, 2008.

DROPA, M., *et al.* Extended-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae isolated in a public hospital in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 51, n. 4, p. 203-9, 2009.

ENDIMIANI, A., *et al.* Evaluation of a commercial microarray system for detection of SHV-, TEM-, CTX-M-, and KPC-type β -lactamase genes in Gram-negative isolates. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 7, p. 2618-22, 2010.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. year. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.

FALAGAS, M. E.; KARAGEORGOPOULOS, D. E. Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms. **J Hosp Infect**, v. 73, n. 4, p. 345-54, 2009.

FALAGAS, M. E.; KARAGEORGOPOULOS, D. E.; DIMOPOULOS, G. Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of tigecycline. **Curr Drug Metab**, v. 10, n. 1, p. 13-21, 2009.

FALAGAS, M. E.; METAXAS, E. I. Tigecycline for the treatment of patients with community-acquired pneumonia requiring hospitalization. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 7, n. 8, p. 913-23, 2009.

FARMER, J. J., 3RD, *et al.* Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. **J Clin Microbiol**, v. 21, n. 1, p. 46-76, 1985.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Tygacil NDA 21-821/S-016. year. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/021821s016lbl.pdf.

FEVRE, C., *et al.* Six groups of the OXY β -lactamase evolved over millions of years in *Klebsiella oxytoca*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 8, p. 3453-62, 2005.

FIETT, J., *et al.* A novel complex mutant β -lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiellae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 6, p. 1499-505, 2000.

FORD, P. J.; AVISON, M. B. Evolutionary mapping of the SHV β -lactamase and evidence for two separate IS26-dependent blaSHV mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome. **J Antimicrob Chemother**, v. 54, n. 1, p. 69-75, 2004.

FRERE, J. M., *et al.* Is it necessary to change the classification of {beta}-lactamases? **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 6, p. 1051-3, 2005.

FRITSCHÉ, T. R., *et al.* Activity of tigecycline tested against a global collection of Enterobacteriaceae, including tetracycline-resistant isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 52, n. 3, p. 209-13, 2005.

GAILLOT, O., *et al.* Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 5, p. 1357-60, 1998.

GALANI, I., *et al.* Transferable plasmid mediating resistance to multiple antimicrobial agents in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Greece. **Clin Microbiol Infect**, v. 8, n. 9, p. 579-88, 2002.

GALDBART, J. O., *et al.* TEM-24 extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter aerogenes*: long-term clonal dissemination in French hospitals. **Clin Microbiol Infect**, v. 6, n. 6, p. 316-23, 2000.

GARCIA, C. S.; DE LA GANDARA, M. P.; GARCIA, F. J. [Extended-spectrum β -lactamases in enterobacteria other than *Escherichia coli* and *Klebsiella*]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 28 Suppl 1, n., p. 12-8, 2009.

GARCIA, C. S.; DE LA GANDARA, M. P.; GARCIA, F. J. [Extended-spectrum β -lactamases in enterobacteria other than *Escherichia coli* and *Klebsiella*]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 28 Suppl 1, n., p. 12-8, 2010.

GARCIA HERNANDEZ, A., *et al.* [Predictor factors of ESBL versus non-ESBL *Escherichia coli* bacteraemia and influence of resistance on the mortality of the patients.]. **Med Clin (Barc)**, v., n., p., 2010.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. PER-6, an extended-spectrum β -lactamase from *Aeromonas allosaccharophila*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 4, p. 1619-22, 2010.

GIRLICH, D., *et al.* TLA-2, a novel Ambler class A expanded-spectrum β -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 11, p. 4767-70, 2005.

GISKE, C. G., *et al.* Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 1, p. 1-4, 2009.

GLUPCZYNSKI, Y., *et al.* Evaluation of a new selective chromogenic agar medium for detection of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 2, p. 501-5, 2007.

GNIADKOWSKI, M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. **Clin Microbiol Infect**, v. 7, n. 11, p. 597-608, 2001.

GNIADKOWSKI, M. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, n., p. 11-32, 2008.

GOOSSENS, H.; GRABEIN, B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum β -lactamase- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 53, n. 4, p. 257-64, 2005.

GOVINDEN, U.; MOCKTAR, C. Geographical evolution of the CTX-M β -lactamases - an update. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 7, p. 9, 2007.

GOVINDEN, U., *et al.* Geographical evolution of the CTX-M β -lactamase - an update. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 7, p. 831-839, 2007.

GROTHUES, D.; TUMMLER, B. New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis: application to the analysis of *Pseudomonas* species. **Mol Microbiol**, v. 5, n. 11, p. 2763-76, 1991.

GRUTEKE, P., *et al.* Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum β -lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella*

pneumoniae causing a nosocomial outbreak. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 3, p. 1161-6, 2003.

GUPTA, N., *et al.* Enterobacter bacteremia. **J Assoc Physicians India**, v. 51, n., p. 669-72, 2003.

HALL, B. G.; BARLOW, M. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 6, p. 1050-1, 2005.

HAWKEY, P. M. Prevalence and clonality of extended-spectrum β -lactamases in Asia. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, n., p. 159-65, 2008.

HEDGES, R. W.; MATTHEW, M. Acquisition by Escherichia coli of plasmid-borne β -lactamases normally confined to Pseudomonas spp.. **Plasmid**, v. 2, n. 2, p. 269-78, 1979.

HERNANDEZ-ALLES, S., *et al.* Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of Klebsiella pneumoniae. **J Antimicrob Chemother**, v. 46, n. 2, p. 273-7, 2000.

HERNANDEZ, J. R.; CONEJO M. L, C.; PASCUAL, A. [Comparative activity of ertapenem against extended-spectrum β -lactamase-producing or plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing Klebsiella pneumoniae]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2010.

HERNANDEZ, J. R., *et al.* [Extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002)]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 21, n. 2, p. 77-82, 2003.

HIRAKATA, Y., *et al.* Regional variation in the prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 52, n. 4, p. 323-9, 2005.

HO, P. L., *et al.* Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamases among bloodstream isolates of Enterobacter spp.. in Hong Kong, 2000-2002. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 3, p. 326-32, 2005.

HO, P. L., *et al.* Detection and characterisation of extended-spectrum β -lactamases among blood stream isolates of Enterobacter species in Hong Kong. **Hong Kong Med J**, v. 15 Suppl 9, n., p. 4-5, 2009.

HOPE, R., *et al.* Efficacy of practised screening methods for detection of cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, n. 1, p. 110-3, 2007.

HUMENIUK, C., *et al.* β -lactamases of Kluyvera ascorbata, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 9, p. 3045-9, 2002.

JACK, G. W.; RICHMOND, M. H. A comparative study of eight distinct β -lactamases synthesized by gram-negative bacteria. **J Gen Microbiol**, v. 61, n. 1, p. 43-61, 1970.

JACOBY, G. A. AmpC β -lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 1, p. 161-82, Table of Contents, 2009.

JACOBY, G. A.; CARRERAS, I. Activities of beta-lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 34, n. 5, p. 858-62, 1990.

JACOBY, G. A.; MILLS, D. M.; CHOW, N. Role of β -lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 8, p. 3203-6, 2004.

JACOBY, G. A.; MUNOZ-PRICE, L. S. The new β -lactamases. **N Engl J Med**, v. 352, n. 4, p. 380-91, 2005.

JANDA, J. M., *et al.* Biochemical identification of citrobacteria in the clinical laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 8, p. 1850-4, 1994.

JARLIER, V., *et al.* Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Rev Infect Dis**, v. 10, n. 4, p. 867-78, 1988.

JEONG, S. H., *et al.* Broth microdilution method to detect extended-spectrum β -lactamases and AmpC β -lactamases in enterobacteriaceae isolates by use of clavulanic acid and boronic acid as inhibitors. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 11, p. 3409-12, 2009.

JEONG, S. H., *et al.* Boronic acid disk tests for identification of extended-spectrum β -lactamase production in clinical isolates of Enterobacteriaceae producing chromosomal AmpC β -lactamases. **Int J Antimicrob Agents**, v. 31, n. 5, p. 467-71, 2008.

JONES, R. N., *et al.* Reevaluation of Enterobacteriaceae MIC/disk diffusion zone diameter regression scattergrams for 9 beta-lactams: adjustments of breakpoints for strains producing extended spectrum β -lactamases. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 52, n. 3, p. 235-46, 2005.

JONES, R. N.; PFALLER, M. A. Antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. with resistance phenotypes consistent with an extended-spectrum β -lactamase in Europe. **Clin Microbiol Infect**, v. 9, n. 7, p. 708-12, 2003.

KAHLMETER, G. Breakpoints for intravenously used cephalosporins in Enterobacteriaceae--EUCAST and CLSI breakpoints. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, n., p. 169-74, 2008.

KANG, H. Y., *et al.* Characterization of conjugative plasmids carrying antibiotic resistance genes encoding 16S rRNA methylase, extended-spectrum β -lactamase,

and/or plasmid-mediated AmpC β -lactamase. **J Microbiol**, v. 47, n. 1, p. 68-75, 2009.

KARAS, J. A., *et al.* Treatment failure due to extended spectrum β -lactamase. **J Antimicrob Chemother**, v. 37, n. 1, p. 203-4, 1996.

KELESIDIS, T., *et al.* Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, n. 5, p. 895-904, 2008.

KIRATISIN, P.; HENPRASERT, A. Genotypic analysis of plasmid-mediated β -lactamases amongst Enterobacteriaceae other than *Escherichia* spp.. and *Klebsiella* spp.. that are non-susceptible to a broad-spectrum cephalosporin. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36, n. 4, p. 343-7, 2010.

KNOTHE, H., *et al.* Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, n. 6, p. 315-7, 1983.

KOHLER, J., *et al.* In vitro activities of the potent, broad-spectrum carbapenem MK-0826 (L-749,345) against broad-spectrum β -lactamase-and extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 5, p. 1170-6, 1999.

KOLAYLI, F., *et al.* PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp.. **FEMS Microbiol Lett**, v. 249, n. 2, p. 241-5, 2005.

KONG, K. F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. **APMIS**, v. 118, n. 1, p. 1-36, 2010.

KOTAPATI, S., *et al.* Clinical implications of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Klebsiella* species and *Escherichia coli* on cefepime effectiveness. **J Infect**, v. 51, n. 3, p. 211-7, 2005.

LAGO, A.; FUENTEFRÍA, S. R.; FUENTEFRÍA, D. B. [ESBL-producing enterobacteria in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 4, p. 430-4, 2010.

LEAVITT, A., *et al.* Ertapenem resistance among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 4, p. 969-74, 2009.

LEE, K., *et al.* Evaluation of efficiency of screening extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in hospitals where the bacteria are increasingly prevalent. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 10, p. 3696-9, 2001.

LEE, S. Y.; KUTI, J. L.; NICOLAU, D. P. Cefepime pharmacodynamics in patients with extended spectrum β -lactamase (ESBL) and non-ESBL infections. **J Infect**, v. 54, n. 5, p. 463-8, 2007.

LEIBOVICI, L.; VIDAL, L.; PAUL, M. Aminoglycoside drugs in clinical practice: an evidence-based approach. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 2, p. 246-51, 2009.

LIAO, C. H., *et al.* In vitro activities of 16 antimicrobial agents against clinical isolates of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in two regional hospitals in Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 39, n. 1, p. 59-66, 2006.

LIVERMORE, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 4, p. 557-84, 1995.

LIVERMORE, D. M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **J Antimicrob Chemother**, v. 47, n. 3, p. 247-50, 2001.

LIVERMORE, D. M. Defining an extended-spectrum β -lactamase. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, n., p. 3-10, 2008.

LIVERMORE, D. M. β -lactamases- the Threat Renews. **Curr Protein Pept Sci**, v. 10, n. 5, p. 397-400, 2009a.

LIVERMORE, D. M. Has the era of untreatable infections arrived? **J Antimicrob Chemother**, v. 64 Suppl 1, n., p. i29-36, 2009b.

LIVERMORE, D. M.; BROWN, D. F. Detection of β -lactamase-mediated resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 48 Suppl 1, n., p. 59-64, 2001.

LIVERMORE, D. M., *et al.* CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. **J Antimicrob Chemother**, v. 59, n. 2, p. 165-74, 2007.

LIVERMORE, D. M., *et al.* Activity of ertapenem (MK-0826) versus Enterobacteriaceae with potent β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 10, p. 2831-7, 2001.

LIVERMORE, D. M.; PEARSON, A. Antibiotic resistance: location, location, location. **Clin Microbiol Infect**, v. 13 Suppl 2, n., p. 7-16, 2007.

LOPEZ-CERERO, L., *et al.* Comparative assessment of inoculum effects on the antimicrobial activity of amoxicillin-clavulanate and piperacillin-tazobactam with extended-spectrum β -lactamase-producing and extended-spectrum β -lactamase-non-producing *Escherichia coli* isolates. **Clin Microbiol Infect**, v. 16, n. 2, p. 132-6, 2009.

MABILAT, C.; COURVALIN, P. Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 34, n. 11, p. 2210-6, 1990.

MACGOWAN, A. Breakpoints for extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: pharmacokinetic/pharmacodynamic considerations. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, n., p. 166-8, 2008.

MAGLIO, D., *et al.* Determination of the in vivo pharmacodynamic profile of cefepime against extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* at various inocula. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 6, p. 1941-7, 2004.

MAMMERI, H., *et al.* Molecular characterization of AmpC-producing *Escherichia coli* clinical isolates recovered in a French hospital. **J Antimicrob Chemother**, v. 61, n. 3, p. 498-503, 2008a.

MAMMERI, H., *et al.* Contribution of extended-spectrum AmpC (ESAC) β -lactamases to carbapenem resistance in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 282, n. 2, p. 238-40, 2008b.

MARCHAIM, D., *et al.* National multicenter study of predictors and outcomes of bacteremia upon hospital admission caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 12, p. 5099-104, 2010.

MARCHAIM, D., *et al.* Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 4, p. 1413-8, 2008.

MARCOS, M., *et al.* Effect of antimicrobial therapy on mortality in 377 episodes of *Enterobacter* spp.. bacteraemia. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, n. 2, p. 397-403, 2008.

MARKOVSKA, R., *et al.* Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Sofia, Bulgaria. **Clin Microbiol Infect**, v. 10, n. 8, p. 752-5, 2004.

MARTINEZ-MARTINEZ, L. Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, n., p. 82-9, 2008.

MATSUMOTO, Y., *et al.* Novel plasmid-mediated β -lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 32, n. 8, p. 1243-6, 1988.

MATSUMOTO, Y.; INOUE, M. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 2, p. 307-13, 1999.

MATTHEW, M. Plasmid-mediated β -lactamases of Gram-negative bacteria: properties and distribution. **J Antimicrob Chemother**, v. 5, n. 4, p. 349-58, 1979.

MCKINNON, P. S.; PALADINO, J. A.; SCHENTAG, J. J. Evaluation of area under the inhibitory curve (AUC) and time above the minimum inhibitory concentration (T>MIC) as predictors of outcome for cefepime and ceftazidime in serious bacterial infections. **Int J Antimicrob Agents**, v. 31, n. 4, p. 345-51, 2008.

MENDES, R. E., *et al.* Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 2, p. 544-7, 2007.

MHAND, R. A., *et al.* Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella typhimurium* by phenotypic and genotypic typing methods. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 11, p. 3769-73, 1999.

MINARINI, L. A., *et al.* Prevalence of community-occurring extended spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Brazil. **Curr Microbiol**, v. 54, n. 5, p. 335-41, 2007.

MINARINI, L. A., *et al.* Predominance of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 65, n. 2, p. 202-6, 2009.

MIRIAGOU, V., *et al.* IS26-associated *In4*-type integrons forming multiresistance loci in enterobacterial plasmids. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 8, p. 3541-3, 2005.

MOHANTY, S., *et al.* Use of the cefepime-clavulanate ESBL Etest for detection of extended-spectrum β -lactamases in AmpC co-producing bacteria. **J Infect Dev Ctries**, v. 4, n. 1, p. 24-9, 2010.

MOLAND, E. S., *et al.* Prevalence of newer β -lactamases in gram-negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to 2002. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 9, p. 3318-24, 2006.

MONTEIRO, J., *et al.* First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 1, p. 333-4, 2009.

MOROSINI, M. I., *et al.* Antibiotic coresistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae and in vitro activity of tigecycline. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 8, p. 2695-9, 2006.

MOTTA, R. N., *et al.* Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase-producing strains of Enterobacteriaceae isolated from diabetes foot infections in a Brazilian diabetic center. **Braz J Infect Dis**, v. 7, n. 2, p. 129-34, 2003.

MOUTON, J. W. Why the AUC/MIC ratio should not be used to predict the effects of beta-lactams. **Clin Infect Dis**, v. 35, n. 2, p. 209-10, 2002.

MOUTON, J. W.; PUNT, N. Use of the $t > MIC$ to choose between different dosing regimens of beta-lactam antibiotics. **J Antimicrob Chemother**, v. 47, n. 4, p. 500-1, 2001.

MOUTON, J. W.; VINKS, A. A. Continuous infusion of beta-lactams. **Curr Opin Crit Care**, v. 13, n. 5, p. 598-606, 2007.

MULLER, S., *et al.* Characterization of Extended-Spectrum β -lactamases and qnr Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in German Isolates of Enterobacter Species. **Microb Drug Resist**, v., n., p., 2010.

MULVEY, M. R., *et al.* Characterization of the first extended-spectrum β -lactamase-producing Salmonella isolate identified in Canada. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 1, p. 460-2, 2003.

NAAS, T., *et al.* Evaluation of a DNA microarray, the check-points ESBL/KPC array, for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and KPC carbapenemases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 8, p. 3086-92, 2010.

NAAS, T., *et al.* Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase bla KPC gene. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 4, p. 1257-63, 2008.

NAAS, T.; NORDMANN, P. OXA-type β -lactamases. **Curr Pharm Des**, v. 5, n. 11, p. 865-79, 1999.

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

NAVON-VENEZIA, S., *et al.* Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant Escherichia coli clones in Israel. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 9, p. 3098-101, 2006.

NAVON-VENEZIA, S., *et al.* Occurrence and phenotypic characteristics of extended-spectrum β -lactamases among members of the family Enterobacteriaceae at the Tel-Aviv Medical Center (Israel) and evaluation of diagnostic tests. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 1, p. 155-8, 2003.

NICOLAS-CHANOINE, M. H., *et al.* Intercontinental emergence of Escherichia coli clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. **J Antimicrob Chemother**, v. 61, n. 2, p. 273-81, 2008.

NICOLAS-CHANOINE, M. H.; JARLIER, V. Extended-spectrum β -lactamases in long-term-care facilities. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, n., p. 111-6, 2008.

NIJSSEN, S., *et al.* Beta-lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European Enterobacteriaceae isolates. **Int J Antimicrob Agents**, v. 24, n. 6, p. 585-91, 2004.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 67, n. 4, p. 593-656, 2003.

NOGUEIRA, K. S., *et al.* Occurrence of extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 10, n. 6, p. 390-5, 2006.

NORDMANN, P., *et al.* Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 37, n. 5, p. 962-9, 1993.

O'HARA C, M. Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and other aerobic gram-negative bacilli. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 1, p. 147-62, 2005.

O'HARA, C. M.; BRENNER, F. W.; MILLER, J. M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 4, p. 534-46, 2000.

PAGANI, L., *et al.* Multiple CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 9, p. 4264-9, 2003.

PAGANI, L., *et al.* Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum β -lactamase in Northern Italy. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 6, p. 2523-9, 2004.

PAGANI, L., *et al.* Emerging extended-spectrum β -lactamases in *Proteus mirabilis*. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 4, p. 1549-52, 2002.

PAI, H., *et al.* Identification of CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 10, p. 3747-9, 2001.

PAI, H., *et al.* High prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing strains among blood isolates of *Enterobacter* spp. collected in a tertiary hospital during an 8-year period and their antimicrobial susceptibility patterns. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 8, p. 3159-61, 2004.

PAI, H., *et al.* Survey of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 6, p. 1758-63, 1999.

PARK, Y. K., *et al.* Two distinct clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Korean hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 64, n. 4, p. 389-95, 2009.

PARTRIDGE, S. R.; HALL, R. M. Evolution of transposons containing blaTEM genes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 3, p. 1267-8, 2005.

PASTERAN, F., *et al.* Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* Strains in the Americas. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 9, p. 3222-4, 2006.

PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **Am J Infect Control**, v. 34, n. 5 Suppl 1, p. S20-8; discussion S64-73, 2006.

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

PATERSON, D. L.; DEPESTEL, D. D. Doripenem. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 2, p. 291-8, 2009.

PATERSON, D. L., *et al.* Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 6, p. 2206-12, 2001.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009.

PAVEZ, M., *et al.* Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC β -lactamase in Brazil. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 12, p. 1590-2, 2008.

PEDUZZI, J., *et al.* Characterization and amino acid sequence analysis of a new oxyimino cephalosporin-hydrolyzing class A β -lactamase from *Serratia fonticola* CUV. **Biochim Biophys Acta**, v. 1341, n. 1, p. 58-70, 1997.

PEIRANO, G., *et al.* Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 2, p. 265-8, 2009.

PENA, C., *et al.* An outbreak of hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia, including strains producing extended-spectrum β -lactamase. **J Hosp Infect**, v. 47, n. 1, p. 53-9, 2001.

PEREZ-PEREZ, F. J.; HANSON, N. D. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 6, p. 2153-62, 2002.

PETERSON, L. R. Antibiotic policy and prescribing strategies for therapy of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: the role of piperacillin-tazobactam. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, n., p. 181-4, 2008.

PFALLER, M. A.; SEGRETI, J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum β -lactamases. **Clin Infect Dis**, v. 42 Suppl 4, n., p. S153-63, 2006.

PICAO, R. C., *et al.* Diversity of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 9, p. 3908-13, 2009a.

PICAO, R. C., *et al.* Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 5, p. 2225-6, 2009b.

PITOUT, J. D. Infections with extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae: changing epidemiology and drug treatment choices. **Drugs**, v. 70, n. 3, p. 313-33, 2010.

PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **Lancet Infect Dis**, v. 8, n. 3, p. 159-66, 2008.

PITOUT, J. D., *et al.* Modification of the double-disk test for detection of enterobacteriaceae producing extended-spectrum and AmpC β -lactamases. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 8, p. 3933-5, 2003.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. Klebsiella spp.. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

POIREL, L., *et al.* BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In120 in Pseudomonas aeruginosa. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 9, p. 3743-8, 2005a.

POIREL, L., *et al.* Genetic environment and expression of the extended-spectrum β -lactamase blaPER-1 gene in gram-negative bacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 5, p. 1708-13, 2005b.

POIREL, L.; GNIADKOWSKI, M.; NORDMANN, P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase CTX-M-3. **J Antimicrob Chemother**, v. 50, n. 6, p. 1031-4, 2002.

POIREL, L., *et al.* Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from Klebsiella pneumoniae. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 3, p. 622-32, 2000.

POIREL, L., *et al.* Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an Escherichia coli integron gene. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 3, p. 573-81, 1999.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, n., p. 75-81, 2008.

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

POOLE, K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. **Clin Microbiol Infect**, v. 10, n. 1, p. 12-26, 2004a.

POOLE, K. Resistance to beta-lactam antibiotics. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, n. 17, p. 2200-23, 2004b.

POTRON, A., *et al.* Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum CARB-type β -lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 7, p. 3010-6, 2009.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 3, p. 440-58, table of contents, 2007.

QUINTEROS, M., *et al.* Extended-spectrum β -lactamases in enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 9, p. 2864-7, 2003.

RADICE, M., *et al.* Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 2, p. 602-4, 2002.

RAHAL, J. J. Extended-spectrum β -lactamases: how big is the problem? **Clin Microbiol Infect**, v. 6 Suppl 2, n., p. 2-6, 2000.

RAJNI, E., *et al.* Occurrence and detection of AmpC beta lactamases among clinical isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* causing UTI. **J Commun Dis**, v. 40, n. 1, p. 21-5, 2008.

RANDALL, L. P., *et al.* Evaluation of CHROMagar CTX, a novel medium for isolating CTX-M-ESBL-positive Enterobacteriaceae while inhibiting AmpC-producing strains. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 2, p. 302-8, 2009.

RAPOPORT, M., *et al.* CMY-2-type plasmid-mediated AmpC β -lactamase finally emerging in Argentina. **Int J Antimicrob Agents**, v. 31, n. 4, p. 385-7, 2008.

RAWAT, D.; NAIR, D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. **J Glob Infect Dis**, v. 2, n. 3, p. 263-74, 2010.

REINERT, R. R., *et al.* Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, n. 5, p. 1018-29, 2007.

RICHMOND, M. H.; SYKES, R. B. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. **Adv Microb Physiol**, v. 9, n., p. 31-88, 1973.

ROBERTS, J. A.; LIPMAN, J. Optimizing use of beta-lactam antibiotics in the critically ill. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 28, n. 6, p. 579-85, 2007.

ROBERTS, J. A., *et al.* Continuous infusion of beta-lactam antibiotics in severe infections: a review of its role. **Int J Antimicrob Agents**, v. 30, n. 1, p. 11-8, 2007.

ROBERTS, J. A., *et al.* A systematic review on clinical benefits of continuous administration of beta-lactam antibiotics. **Crit Care Med**, v. 37, n. 6, p. 2071-8, 2009.

RODRIGUEZ-BANO, J.; NAVARRO, M. D. Extended-spectrum β -lactamases in ambulatory care: a clinical perspective. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, n., p. 104-10, 2008.

RODRIGUEZ-BANO, J., *et al.* Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 3, p. 1089-94, 2004.

RODRIGUEZ-BANO, J., *et al.* Risk factors and prognosis of nosocomial bloodstream infections caused by extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 5, p. 1726-31, 2010.

ROSSOLINI, G. M.; D'ANDREA, M. M.; MUGNAIOLI, C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, n., p. 33-41, 2008.

SADER, H. S.; BIEDENBACH, D. J.; JONES, R. N. Global patterns of susceptibility for 21 commonly utilized antimicrobial agents tested against 48,440 Enterobacteriaceae in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 47, n. 1, p. 361-4, 2003.

SANDERS, C. C., *et al.* Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae with Vitek ESBL test. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 12, p. 2997-3001, 1996.

SANDERS, W. E., JR.; SANDERS, C. C. Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, n. 2, p. 220-41, 1997.

SAUVAGE, E., *et al.* The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. **FEMS Microbiol Rev**, v. 32, n. 2, p. 234-58, 2008.

SAVJANI, J. K.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, K. T. Mechanisms of resistance: useful tool to design antibacterial agents for drug - resistant bacteria. **Mini Rev Med Chem**, v. 9, n. 2, p. 194-205, 2009.

SCHWABER, M. J.; CARMELI, Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, n. 5, p. 913-20, 2007.

SCHWABER, M. J., *et al.* Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum β -lactamases in non-*Escherichia coli* and Non-*Klebsiella* spp.. of Enterobacteriaceae. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 294-8, 2004.

SEPUTIENE, V., *et al.* Tigecycline - how powerful is it in the fight against antibiotic-resistant bacteria? **Medicina (Kaunas)**, v. 46, n. 4, p. 240-8, 2010.

SHAH, A. A., *et al.* Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. **Res Microbiol**, v. 155, n. 6, p. 409-21, 2004.

SHAHID, M., *et al.* Beta-lactams and β -lactamase-inhibitors in current- or potential-clinical practice: a comprehensive update. **Crit Rev Microbiol**, v. 35, n. 2, p. 81-108, 2009.

SHEHABI, A. A., *et al.* High incidence of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to extended-spectrum B-lactam drugs in intensive care units. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 36, n. 1, p. 53-6, 2000.

SILVA, J., *et al.* TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 4, p. 997-1003, 2000.

SILVA, J., *et al.* Outbreak of infection with extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 9, p. 3193-6, 2001.

SINGH, N., *et al.* Risk of resistant infections with Enterobacteriaceae in hospitalized neonates. **Pediatr Infect Dis J**, v. 21, n. 11, p. 1029-33, 2002.

SINHA, P., *et al.* Prevalence of extended spectrum beta lactamase and AmpC beta lactamase producers among *Escherichia coli* isolates in a tertiary care hospital in Jaipur. **Indian J Pathol Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 367-9, 2008.

SONG, W., *et al.* Detection of extended-spectrum β -lactamases by using boronic acid as an AmpC β -lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp.. and *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 4, p. 1180-4, 2007a.

SONG, W., *et al.* Use of boronic acid disk methods to detect the combined expression of plasmid-mediated AmpC β -lactamases and extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., and *Proteus mirabilis*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 57, n. 3, p. 315-8, 2007b.

SPELDOOREN, V., *et al.* Discriminatory detection of inhibitor-resistant β -lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 4, p. 879-84, 1998.

STURENBURG, E., *et al.* Evaluation of the MicroScan ESBL plus confirmation panel for detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of oxyimino-cephalosporin-resistant Gram-negative bacteria. **J Antimicrob Chemother**, v. 54, n. 5, p. 870-5, 2004.

SUAREZ, C.; GUDIOL, F. [Beta-lactam antibiotics]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 27, n. 2, p. 116-29, 2009.

SZABO, D., *et al.* Molecular epidemiology of a cluster of cases due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase in the premature intensive care unit of a Hungarian hospital. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 12, p. 4167-9, 1999.

SZABO, D., *et al.* In vitro and in vivo activities of amikacin, cefepime, amikacin plus cefepime, and imipenem against an SHV-5 extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 4, p. 1287-91, 2001.

TAM, V. H., *et al.* Pharmacodynamics of cefepime in patients with Gram-negative infections. **J Antimicrob Chemother**, v. 50, n. 3, p. 425-8, 2002.

TAN, T. Y., *et al.* Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 1, p. 146-9, 2009.

TAN, T. Y., *et al.* Detection of plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*. **J Clin Pathol**, v. 61, n. 5, p. 642-4, 2008.

TENOVER, F. C., *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 9, p. 2233-9, 1995.

TENOVER, F. C., *et al.* Identification of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *proteus* species can potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 2, p. 294-9, 2009.

TENOVER, F. C., *et al.* Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum β -lactamases: survey of laboratories in Connecticut. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 12, p. 4065-70, 1999.

THOMSON, D. J. P. A. C. J. Molecular approaches for the detection and Identification of β -lactamases. In: N. W. A. A. P. Johnson (Ed.). Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications. Totowa, New Jersey: Humana Press, v.1, 1998. Molecular approaches for the detection and Identification of β -lactamases, p.495-512

THOMSON, K. S. Controversies about extended-spectrum and AmpC β -lactamases. **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 2, p. 333-6, 2001.

THOMSON, K. S. Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 4, p. 1019-25, 2010.

THOMSON, K. S.; MOLAND, E. S. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 12, p. 3548-54, 2001.

THOMSON, K. S.; SANDERS, C. C. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, n. 9, p. 1877-82, 1992.

TOLLENTINO, F. M., *et al.* High Prevalence of bla(CTX-M) Extended Spectrum β -lactamase Genes in Klebsiella pneumoniae Isolates from a Tertiary Care Hospital: First report of bla(SHV-12), bla(SHV-31), bla(SHV-38), and bla(CTX-M-15) in Brazil. **Microb Drug Resist**, v., n., p., 2010.

TOWNE, T. G., *et al.* Detection of SHV-type extended-spectrum β -lactamase in Enterobacter isolates. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 1, p. 298-9, 2010.

TRANIER, S., *et al.* The high resolution crystal structure for class A β -lactamase PER-1 reveals the bases for its increase in breadth of activity. **J Biol Chem**, v. 275, n. 36, p. 28075-82, 2000.

TUMBARELLO, M., *et al.* Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 6, p. 1987-94, 2007.

TUMBARELLO, M., *et al.* Costs of bloodstream infections caused by Escherichia coli and influence of extended-spectrum- β -lactamase production and inadequate initial antibiotic therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 10, p. 4085-91, 2010.

TURNER, P. J., *et al.* The MYSTIC (meropenem yearly susceptibility test information collection) programme. **Int J Antimicrob Agents**, v. 13, n. 2, p. 117-25, 1999.

VAARA, M. Polymyxins and their novel derivatives. **Curr Opin Microbiol**, v. 13, n. 5, p. 574-81, 2010.

VARELA, C., *et al.* Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in group-1 β -lactamase-producing isolates. **Clin Microbiol Infect**, v. 7, n. 5, p. 278-82, 2001.

VIGNOLI, R., *et al.* Enteropathogenic Escherichia coli strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum β -lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 6, p. 2940-3, 2005.

VILLEGAS, M. V., *et al.* Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, n., p. 154-8, 2008.

VILLEGAS, M. V., *et al.* First identification of Pseudomonas aeruginosa isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 4, p. 1553-5, 2007.

VILLEGAS, M. V., *et al.* First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from South America. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 8, p. 2880-2, 2006.

VINUE, L., *et al.* Prevalence and diversity of extended-spectrum β -lactamases in faecal Escherichia coli isolates from healthy humans in Spain. **Clin Microbiol Infect**, v. 15, n. 10, p. 954-7, 2009.

VON DOLINGER BRITO, D., *et al.* An Outbreak of Nosocomial Infection Caused by ESBLs Producing *Serratia marcescens* in a Brazilian Neonatal Unit. **Braz J Infect Dis**, v. 3, n. 4, p. 149-155, 1999.

WANG, A., *et al.* Occurrence of qnr-positive clinical isolates in *Klebsiella pneumoniae* producing ESBL or AmpC-type β -lactamase from five pediatric hospitals in China. **FEMS Microbiol Lett**, v. 283, n. 1, p. 112-6, 2008a.

WANG, Q., *et al.* Characterization of a novel AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase from an *Escherichia coli* strain isolated in China. **Curr Microbiol**, v. 57, n. 6, p. 558-63, 2008b.

WEBSTER, D. P., *et al.* Emergence of carbapenem resistance due to porin loss in an extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae* strain during meropenem therapy. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36, n. 6, p. 575-6, 2010.

WEI, Z. Q., *et al.* Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 2, p. 763-5, 2007.

WIENER, J., *et al.* Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. **JAMA**, v. 281, n. 6, p. 517-23, 1999.

WINOKUR, P. L., *et al.* Russian *Klebsiella pneumoniae* isolates that express extended-spectrum β -lactamases. **Clin Microbiol Infect**, v. 6, n. 2, p. 103-8, 2000.

WOODFORD, N., *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp.. **Int J Antimicrob Agents**, v. 27, n. 4, p. 351-3, 2006.

WOODFORD, N.; FAGAN, E. J.; ELLINGTON, M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, n. 1, p. 154-5, 2006.

WOODFORD, N., *et al.* Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, n. 6, p. 1261-4, 2008.

WU, T. L., *et al.* Dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in pediatric intensive care units. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 10, p. 4836-8, 2003.

YANG, D.; GUO, Y.; ZHANG, Z. Combined porin loss and extended spectrum β -lactamase production is associated with an increasing imipenem minimal inhibitory concentration in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains. **Curr Microbiol**, v. 58, n. 4, p. 366-70, 2009.

YIGIT, H., *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 4, p. 1151-61, 2001.

ZANETTI, G., *et al.* Cefepime versus imipenem-cilastatin for treatment of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients: a multicenter, evaluator-blind, prospective, randomized study. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 11, p. 3442-7, 2003.

ZHANEL, G. G., *et al.* Comparative review of the carbapenems. **Drugs**, v. 67, n. 7, p. 1027-52, 2007.

ANEXOS**ANEXO 1 – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HC-UFPR**

Curitiba, 10 de setembro de 2010.

Ilmo (a) Sr. (a)
Libera Maria Dalla Costa
Neste

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "PREVALENCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE 2-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) EM ESTEROBACTERIAS ISOLADAS NO HOSPITAL DE CLINICAS DE CURITIBA", foi analisado com pendência pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 27 de julho de 2010. Após, analisadas as pendências encaminhadas pela pesquisadora, este CEP/HC, considera o projeto aprovado em 03 de setembro de 2010. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0207.0.208.000-10
Registro CEP: 2288.182/2010-07

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 10 de março de 2011.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Renato Tambara Filho".

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXO 2 – PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA PESQUISA DE GENES DE β -LACTAMASES

Preparo do DNA alvo (sala 2)

Crescer os micro-organismos usados na PCR em placas de ágar não seletivo por 18 horas a 36,5-37°C;

Distribuir 500 μ l de água Milli-Q estéril em tubos de 1,5 ml e fazer uma suspensão bacteriana turva;

Adicionar um tubo com amostra positiva, outro com amostra negativa e o terceiro com água (sem DNA).

Ferver os tubos por 15 minutos a 100° C;

Centrifugá-los por 5 minutos em microcentrífuga a 2000 rpm;

Remover uma alíquota do sobrenadante (que contem o DNA) e estocar à temperatura de 4°C até o uso.

Preparo dos iniciadores (sala 1)

1- Dissolver os iniciadores (obtidos liofilizados) em água para PCR até a concentração final de 100 η mol/ μ L;

2- Preparar a mistura dos iniciadores (“primer mix”), diluindo os iniciadores sense e antisense de cada reação (gene único ou multiplex) em uma proporção 5 μ L de cada iniciador para 100 μ L da mistura (concentração final 5 η mol/ μ L);

3- Estocar os primers diluídos em freezer a – 20°C.

Preparo da mistura de PCR (sala 1)

1- Retirar os tubos com as soluções de dNTPs, MgCl₂ e iniciadores do freezer a – 20°C e aguardar o descongelamento. Após o descongelamento, manter as soluções em banho de gelo;

2- Numerar os tubos de reação correspondentes às amostras a serem testadas, um controle positivo, um controle negativo e um tubo branco (que conterà todos os reagentes, exceto o DNA alvo);

3- Preparar a Mistura de Reação de PCR em um microtubo, adicionando os reagentes na ordem descrita no QUADRO 1;

6- Homogeneizar bem em vortex e pulsar em microcentrífuga;

- 7- Distribuir 23 μ l da mistura de PCR a cada tubo de reação, previamente numerados;
- 8- Levar os tubos para a sala 2.

Volume	100 μ l
N° de reações	4
1. Água para PCR (Sigma, Estados Unidos)	75
2. Tampão da Taq DNA pol 10X (Invitrogen, Carlsbad, USA)	10
4. MgCl ₂ (50mM) (Invitrogen, Carlsbad, USA)	4
5. dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, USA)	
dATPs (10mM)	2.5
dGTPs (10mM)	2.5
dCTPs (10mM)	2.5
dTTPs (10mM)	2.5
5. Mistura de iniciadores (Prodimol, Brasil)	4
6. TAQ DNA POLIMERASE (Invitrogen, Carlsbad, USA)	0,5

QUADRO 1 – REATIVOS USADOS NO PREPARO DA MISTURA DE PCR.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

- 1- Adicionar 2 μ l da amostra (DNA alvo armazenado a 4°C) ao tubo de reação contendo 23 μ l da mistura de PCR (volume final da reação 25 μ l);
- 2- Homogeneizar bem em vortex e pulsar em microcentrífuga;
- 3- Fechar bem os tubos e levá-los para a sala 3;
- 4- Ligar o termociclador e conferir o programa a ser utilizado (selecionar o programa de acordo com a reação a ser realizada);
- 5- Pressionar a tecla *start* e deixar a reação prosseguir;
- 6- Depois de remover os tubos do termociclador, os produtos de PCR devem ser analisados imediatamente em gel de agarose ou serem estocados a 4°C.

Condições de corrida

A pesquisa dos genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA} é realizada por multiplex, usando as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 25 segundos, 52°C por 40 segundos, e 72°C por 50 segundos; e uma extensão final a 72°C por 6 minutos. Para pesquisa dos outros genes para produção de ESBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{PER}, *bla*_{BES}, *bla*_{GES}), as condições de amplificação são as seguintes: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 25 segundos, 58°C por 40 segundos, e 72°C por 50 segundos; e uma extensão final a 72°C por 6 minutos.

Para pesquisa dos genes AmpC é utilizada uma PCR multiplex e as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguidos de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento do primer a 64°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto. Após o último ciclo, extensão final a 72°C por 7 minutos.

As condições de amplificação para pesquisa de KPC são as seguintes: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 25 segundos, 62°C por 40 segundos e 72°C por 50 segundos; e uma extensão final a 72°C por 6 minutos. Para MβL, as condições foram: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos; 36 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos; e uma extensão final a 72°C por 6 minutos.

Análise dos produtos

- 1- Preparar gel de agarose a 1% em tampão TBE a 0,5X (adequado para análise de produtos de PCR, que apresentam tamanho menor que 1Kb);
- 2- Remover uma alíquota do produto de PCR de 4 µl de cada amostra;
- 3- Misturar 4 µl de "Stop mix" (50mM EDTA pH8, 25% Ficoll, 0,25% azul de bromofenol) a cada amostra (fazer isso sobre um pedaço de parafilme);
- 4- Carregar o gel com 8 µl de cada amostra;
- 5- Incluir 4 µl de marcador de PM linear (2 µl de 123bp ladder ou 2 µl de 100bp ladder (ou 123 bp) misturados com 4 µl PM + 4 µl de tampão de corrida ("Stop mix");
- 6- Proceder à eletroforese a 110 V por aproximadamente 1 hora
- 7- Corar o gel em solução de brometo de etídio;
- 8- Observar em transiluminador de UV e fotografar.

ANEXO 3 – FLUXOGRAMA DA PESQUISA DE β -LACTAMASES EM ENTEROBACTÉRIAS

