

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALESSANDRA VALE DAUR

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS FENOTÍPICOS DE DETECÇÃO DE BETA
LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO EM *Klebsiella pneumoniae*,
Klebsiella oxytoca E *Escherichia coli*.

CURITIBA

2009

ALESSANDRA VALE DAUR

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DETECÇÃO DE BETA LACTAMASE DE
ESPECTRO ESTENDIDO EM *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* E
Escherichia coli.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dra. Cristina Leise B. Monteiro

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

Prof^a Dra. Laura Lúcia Cogo

CURITIBA

2009

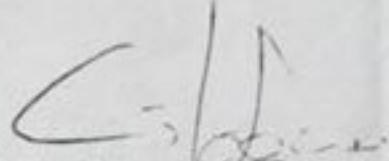
TERMO DE APROVAÇÃO

“Avaliação de métodos de detecção fenotípica de beta lactamase de espectro estendido em *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*”

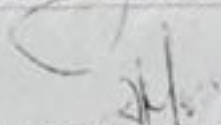
por

ALESSANDRA VALE DAUR

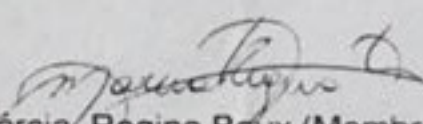
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:



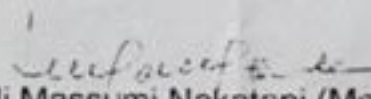
Prof^ª. Dr^ª. Cristina Leise Bastos Monteiro (Orientadora e Presidente)



Prof^ª. Dr^ª. Juliana Ferreira de Moura (Membro Titular)

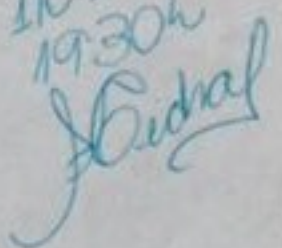


Prof^ª. Dr^ª. Márcia Regina Beux (Membro Titular)



Prof^ª. Dr^ª. Sueli Massumi Nakatani (Membro Titular)

Curitiba, 31 de março de 2009

Recebido em
 11/04/09
 19:30h


**Dedico este trabalho à todos que torceram por mim,
e principalmente a minha família e meus amigos**

AGRADECIMENTOS

À orientadora Prof^a Dra. Cristina L. B. Monteiro pela oportunidade e amizade.

À coordenadora do curso do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, Prof^a Dra. Edilene Alcântara de Castro, pelo suporte técnico e científico para a conclusão do curso.

À Prof^a Dra. Libera Maria Dalla Costa pela confiança e apoio.

À Laura Lúcia Cogo e Keite Nogueira, que fizeram muito mais que contribuir para este trabalho, pela amizade, paciência, por tudo que me ensinaram, expressei minha enorme admiração e gratidão.

A todos os funcionários da Seção de Bacteriologia e Central de Preparo de Meios e Reagentes do Hospital de Clínicas que deram força e tiveram muita compreensão para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos meus amigos do Hospital Geral de Curitiba, Cristian, Eduardo, Dani, Jana, Silvia, Silke, Maurício, Flávia e Renata pelo incentivo. Principalmente ao meu chefe, TC Tonet que compreendeu todas as mudanças de horários e à meu amigo Chico que além de muita força e incentivo me ajudou nas identificações e antibiogramas.

À Isabella e Hilston pelo carinho.

Ao Higor pelo amor, compreensão e pela companhia.

À minha irmã Fernanda e seu marido Guilherme, pelo carinho, união, e exemplo de persistência.

À minha mãe Sandra e meu Pai Antônio pelos exemplos de moral e de valores humanos vivenciados desde meus primeiros anos de vida e pelos exemplos de determinação, pelo estímulo e apoio para que pudesse fazer mais esta conquista.

A todos que indiretamente ajudaram na elaboração deste trabalho.

A Deus por me dar força e saúde e principalmente por colocar pessoas tão maravilhosas na minha vida.

"Cada um tem de mim exatamente o que cativou, e cada um é responsável pelo que cativou, não suporto falsidade e mentira, a verdade pode machucar, mas é sempre mais digna. Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão. Perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem mais se atreve e a vida é muito para ser insignificante. Eu faço e abuso da felicidade e não desisto dos meus sonhos. O mundo está nas mãos daqueles que tem coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos."

Charles Chaplin

RESUMO

A produção de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBL) tem emergido como um importante mecanismo de resistência a antimicrobianos β -lactâmicos e sua prevalência, embora elevada, ainda é subestimada, devido às dificuldades na detecção laboratorial desta enzima. Este trabalho tem como objetivo avaliar os diferentes métodos fenotípicos de detecção laboratorial de ESBL em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli* provenientes de pacientes internados no Hospital de Clínicas da UFPR, previamente caracterizadas por métodos moleculares, além de avaliar os melhores substratos para a pesquisa de ESBL, a detecção fenotípica das enzimas AmpC e KPC e avaliar as concentrações inibitórias mínimas e sensibilidades dos diferentes antimicrobianos testados. Foram analisadas 160 amostras de *E. coli* (32), *K. pneumoniae* (122) e *K. oxytoca* (6) previamente caracterizadas por métodos moleculares. Os testes de dupla difusão e discos combinados detectaram 96,3% e 99,4% das amostras produtoras de ESBL, respectivamente. No método de triagem a cefpodoxima (99,4%) foi o melhor substrato, seguido da cefotaxima (97,5%) e no teste de dupla difusão o substrato que obteve maior positividade na detecção de ESBL foi a ceftriaxona (92,5%), seguido pelo cefepime (91,3%), aztreonam (89,4%) e ceftazidima (80,6%). Em relação aos substratos utilizados na técnica de discos combinados, a maior positividade apresentada foi de 93,1% para cefotaxima+ácido clavulânico, seguido de 91,9% para cefpodoxima+ácido clavulânico e de 77,5% para ceftazidima+ácido clavulânico. A pesquisa fenotípica de outras β -lactamases demonstrou que 8,8% das amostras podem ser produtoras de AmpC e 4,4% de KPC, as quais serão analisadas futuramente por métodos moleculares. Entre os antimicrobianos avaliados o meropenem obteve a maior potência ($CIM_{50} < 0,06 \mu\text{g/mL}$), seguido do ertapenem ($CIM_{50} = 0,06 \mu\text{g/mL}$), e imipenem ($CIM_{50} = 0,12 \mu\text{g/mL}$). A maior sensibilidade foi observada para o imipenem (100%) e meropenem (100%). A tigeciclina apresentou alta atividade ($CIM_{90} = 1 \mu\text{g/mL}$), potência ($CIM_{50} = 0,5 \mu\text{g/mL}$) e sensibilidade (99,4%). Para todas as cefalosporinas e aztreonam a CIM_{50} e CIM_{90} foram elevadas. A sensibilidade às cefalosporinas de terceira geração e aztreonam variaram de 5,3 a 10%, enquanto o cefepime apresentou 20% de sensibilidade. Neste trabalho conclui-se que a avaliação dos métodos para a detecção de ESBL depende da expressão fenotípica da β -lactamase presente, sendo importante testar a maior variedade possível de substratos nos laboratórios de microbiologia.

Palavras-chave: β -lactamase. Detecção fenotípica. Discos combinados. Dupla difusão.

ABSTRACT

Production of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) has emerged as an important mechanism of resistance to β -lactam antimicrobial and its prevalence, although high, is still underestimated due to difficulties in laboratorial detection of this enzyme. This study aims to evaluate the different phenotypic methods of laboratorial detection of ESBL in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* and *Escherichia coli* from patients at the Hospital de Clinicas of UFPR previously characterized by molecular methods, and evaluate the best substrates for the detection of ESBL, the phenotypic detection of KPC and AmpC enzymes, evaluate the minimum inhibitory concentrations and sensitivities of different antimicrobial agents tested. We analyzed 160 samples of *E. coli* (32), *K. pneumoniae* (122) and *K. oxytoca* (6). Tests for double disk synergy test and combination disk method detected 96.3% and 99.4% of samples producing ESBL, respectively. At the screening method cefpodoxime (99.4%) was the best substrate, followed by cefotaxime (97.5%) and the double disk synergy test the substrate that obtain more positive in the detection of ESBL was ceftriaxone (92.5%), followed by cefepime (91.3%), aztreonam (89.4%) and ceftazidime (80.6%). For the substrates used in the combination disc method, the highest positivity was 93.1% presented to cefotaxime+clavulanic acid, followed by 91.9% to cefpodoxime+clavulanic acid and 77.5% for ceftazidime + clavulanic acid. In the study of other phenotypic β -lactams showed that 8.8% of the samples may be producing AmpC and 4.4% KPC which will be further analyzed by molecular methods. Among the antimicrobial evaluated meropenem got the highest power ($MIC_{50}<0.06$ $\mu\text{g/mL}$), followed by ertapenem ($MIC_{50}=0.06$ $\mu\text{g/mL}$) and imipenem ($MIC_{50}=0.12$ $\mu\text{g/mL}$). The highest sensitivity was observed for imipenem (100%) and meropenem (100%). Tigecycline showed high activity ($MIC_{50}=0.5$ $\mu\text{g/mL}$), power ($MIC_{90}=1.0$ $\mu\text{g/mL}$) and sensitivity (99.4%). Sensitivity to third generation cephalosporins and aztreonam ranged from 5.3 to 10%, while cefepime showed 20% of sensitivity. This work concluded that the evaluation of methods for detection of ESBL depends on the phenotypic expression of present β -lactam and is important to test the largest possible variety of substrates in microbiology laboratories.

Key words: β -lactam. Phenotypic detection. Combination disk method. double disk synergy test.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MECANISMO DE AÇÃO DAS β -LACTAMASES.....	23
FIGURA 2 - ESQUEMA DE CLASSIFICAÇÃO PROPOSTA POR BUSH, JACOBY E MEDEIROS.....	26
FIGURA 3 - GRUPOS E SUBTIPOS DAS ENZIMAS CTX-M.....	30
FIGURA 4 - TESTE DE DISCO DIFUSÃO.....	42
FIGURA 5 - TESTE DE DISCOS COMBINADOS.....	43
FIGURA 6 - DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESBL PELO MÉTODO DE TIRAS DE E-TEST®.....	44
FIGURA 7 – ESQUEMA SIMPLIFICADO PARA REALIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	58
FIGURA 8 - RESULTADO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS DAS PCR.....	59
FIGURA 9 - TESTE DE TRIAGEM.....	60
FIGURA 10 - TESTE DE DISCO APROXIMAÇÃO.....	62
FIGURA 11- TESTE DE DISCO COMBINADO POSITIVO.....	64
FIGURA 12- TESTE DE HODGE.....	67

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	TESTE DE TRIAGEM PARA DETECÇÃO DE ESBL NO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	61
GRÁFICO 2 -	TESTE DE TRIAGEM PARA DETECÇÃO DE ESBL POR ESPÉCIE ESTUDADA.....	62
GRÁFICO 3 -	AMOSTRAS IDENTIFICADAS PELO TESTE DE DISCO COMBINADO E DUPLO DISCO DIFUSÃO.....	65
GRÁFICO 4 -	PORCENTAGEM DE ISOLADOS RESISTENTES À CEFOXITINA...	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	INICIALIZADORES UTILIZADOS NA PCR.....	48
TABELA 2 -	QUANTIDADES DE REAGENTES PARA REALIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	49
TABELA 3 -	SOLUÇÕES ESTOQUE DE ANTIMICROBIANOS.....	55
TABELA 4 -	DILUIÇÕES UTILIZADAS PARA AMOSTRAS TESTE.....	56
TABELA 5 -	DILUIÇÕES PARA ATCC <i>ESCHERICHIA COLI</i> 25922.....	56
TABELA 6 -	POSITIVIDADE PELO TESTE DE DUPLO DISCO DIFUSÃO.....	63
TABELA 7 -	AVALIAÇÃO DA POSITIVIDADE DO TESTE DE DUPLA DIFUSÃO..	63
TABELA 8 -	POSITIVIDADE DE DETECÇÃO PELO MÉTODO DE DISCOS COMBINADOS.....	64
TABELA 9 -	CONJUNTO DE POSITIVIDADES DE DETECÇÃO DO MÉTODO DE DISCOS COMBINADOS.....	65
TABELA 10 -	POTÊNCIA (CIM ₅₀), ATIVIDADE (CIM ₉₀) E PERFIL DE SENSIBILIDADE DOS ANTIMICROBIANOS TESTADOS EM AMOSTRAS PRODUTORAS DE ESBL.....	68

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	- Graus Celsius
AC	- Ácido Clavulânico
ATCC	- American Type Culture Collection
ATM	- Aztreonam
BHI	- Infusão Cérebro Coração
CaC	- Ceftazidima + Ácido Clavulânico
CAZ	- Ceftazidima
CcL	- Cefpodoxima + Ácido Clavulânico
CeC	- Cefoxitina + Ácido Clavulânico
CFO	- Cefoxitina
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CIM ₅₀	- Mínima concentração capaz de inibir 50% dos isolados
CIM ₉₀	- Mínima concentração capaz de inibir 90% dos isolados
CLSI	- Clinical Laboratory Standards International
CPD	- Cefpodoxima
CPM	- Cefepime
CRO	- Ceftriaxona
CTI	- Centro de Terapia Intensiva
CTX	- Cefotaxima
CTX-M	- β –lactamase tipo Cefotaximase
DC	- Disco Combinado
DD	- Disco Difusão
EDTA	- Ácido etilenodiaminotracético
ERT	- Ertapenem
ESBL	- Extended Spectrum β -Lactamase
EUCAST	- <i>European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing</i>
IEF	- Eletroforese de Ponto Isoelétrico
IPM	- Imipenem
KPC	- <i>Klebsiella pneumoniae carbapenémicosase</i>
mg	- Miligrama
mM	- Mili Mol
OMP	- Porina da membrana externa
PB	- Pares de base
PBP	- Proteína Ligadora de Penicilina
pCMB	- <i>p</i> -cloromercuribenzoato
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PI	- Ponto Isoelétrico
PM	- Peso Molecular
RPM	- Rotação por minuto
SHV	- β –lactamase tipo <i>Sulphydryl reagent variable</i>
TEM	- β –lactamase tipo Temoniera
β	- Beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 OBJETIVOS.....	18
1.1.1 Objetivo Geral.....	18
1.1.2 Objetivos Específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	19
2.2 MECANISMO DE RESISTÊNCIA.....	20
2.2.1 Redução da afinidade pelos sítios de ligação da droga (PBPs).....	20
2.2.2 Alteração da permeabilidade da membrana externa.....	20
2.2.3 Degradação da droga.....	21
2.3 MECANISMO DE AÇÃO DAS BETA-LACTAMASES.....	22
2.4 CLASSIFICAÇÃO DAS BETA-LACTAMASES.....	24
2.5 BETA-LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO.....	26
2.5.1 Tipos de ESBLs.....	27
2.5.1.1 SHV.....	27
2.5.1.2 TEM.....	28
2.5.1.3 CTX-M.....	29
2.6 OUTROS TIPOS DE BETA-LACTAMASES.....	31
2.6.1 AmpC.....	31
2.6.2 KPC.....	33
2.7 EPIDEMIOLOGIA DAS ESBLs.....	34
2.7.1 Incidência.....	34
2.7.2 Transmissão e profilaxia.....	35
2.7.3 Reservatórios não-hospitalares.....	36
2.8 ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS.....	37
2.9 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ESBL.....	39
2.9.1 Teste de Triagem.....	39
2.9.2 Pontos de Corte Indicativos da Produção de ESBL.....	40
2.9.3 Testes Fenotípicos Confirmatórios.....	40
2.9.3.1 Teste de Dupla Difusão.....	41

2.9.3.2 Teste de Discos Combinados.....	42
2.9.3.3 E-test ®.....	43
2.9.3.4 Métodos Automatizados.....	45
2.9.3.5 Teste Tridimensional.....	45
2.9.4 Métodos de Determinação Molecular.....	46
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1 AMOSTRAS.....	47
3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENES DE RESISTÊNCIA.....	47
3.2.1 Preparo do DNA alvo.....	48
3.2.2 Preparo da “PCR-Master Mix”.....	49
3.2.3 Análise dos Produtos.....	50
3.3 TESTES FENOTÍPICOS DE TRIAGEM.....	50
3.4 TESTES FENOTÍPICOS CONFIRMATÓRIOS.....	51
3.4.1 Teste de Dupla Difusão.....	51
3.4.2 Teste de Discos Combinados.....	52
3.5 TESTE FENOTÍPICO PARA DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE AmpC.....	52
3.6 TESTE FENOTÍPICO PARA DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE KPC.....	53
3.6.1 Teste de Triagem para KPC.....	53
3.6.2 Teste Fenotípico Confirmatório - Teste de Hodge.....	53
3.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	54
3.7.1 Procedimento para Realização da Concentração Inibitória Mínima.....	54
3.7.1.1 Preparo das Soluções de Antibióticos.....	55
3.7.1.2 Controle de Qualidade.....	56
3.7.1.3 Procedimento para Preparação das Placas de Agar Mueller-Hinton Contendo os Antimicrobianos da CIM.....	57
3.7.3.4 Procedimento para Inoculação dos Isolados Bacterianos.....	57
4 RESULTADOS.....	59
4.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENES DE RESISTÊNCIA.....	59
4.2 TESTES FENOTÍPICOS DE TRIAGEM.....	60
4.3 TESTES FENOTÍPICOS CONFIRMATÓRIOS.....	62
4.4 TESTE FENOTÍPICO PARA DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE AmpC.....	66
4.5 TESTE FENOTÍPICO PARA DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE KPC.....	66
4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	67
5 DISCUSSÃO.....	69

6 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXO.....	89
ANEXO 1 - Procedência dos meios de cultura, discos e antibióticos utilizados no teste de sensibilidade aos antimicrobianos por disco difusão e concentração inibitória mínima.....	89
	81

1 INTRODUÇÃO

A família *Enterobacteriaceae* é composta por mais de 30 gêneros e 130 espécies de bacilos gram-negativos, que podem ser responsáveis por qualquer tipo de doença infecciosa, além de serem isolados a partir de várias amostras clínicas. Neste grupo, os gêneros mais freqüentemente isolados são *Escherichia spp*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Proteus spp*, entre outros (SCHWABER *et al.*, 2004).

Desde a década de 1940 as infecções causadas por estas bactérias começaram a ser tratadas por um grupo especial de medicamentos, os antimicrobianos. A cada introdução de um novo agente, tem sido observado o surgimento de eficientes mecanismos bacterianos capazes de neutralizá-los (LOWY, 2003) resultando nas últimas décadas, em um rápido aumento da resistência, apresentada por estes microrganismos (DZIDIC e BEDEKOVIC, 2003).

Uma das classes de antimicrobianos mais usualmente prescrita na prática terapêutica são os β -lactâmicos. Entre eles as cefalosporinas de terceira e quarta geração, monobactâmicos e carbapenêmicos são os mais utilizados no tratamento de infecções causadas por enterobactérias em pacientes hospitalizados (MENEZES E SILVA *et al.*, 2006).

A resistência bacteriana freqüentemente encontrada face aos antimicrobianos β -lactâmicos é, na maioria das vezes, devida à produção de β -lactamase, podendo ser, associada ou não, à redução na permeabilidade de membrana devido à mutação em porinas (LIVERMORE, 1995).

O aumento da resistência aos antimicrobianos entre as bactérias gram-negativas é um exemplo notável de como as bactérias podem alterar, manter e expressar novas informações genéticas que conferem resistência a uma ou a várias drogas (WALSH *et al.*, 2005).

Entre membros da família *Enterobacteriaceae* a produção de β -lactamase de espectro estendido (ESBL – Extended Spectrum β -Lactamase) tem emergido como um importante mecanismo de resistência a antimicrobianos β -lactâmicos. Estas enzimas hidrolisam praticamente todos os β -lactâmicos, exceto carbapenêmicos e cefamicinas (cefexitina), são mediadas por genes plasmidiais não

induzíveis e são inibidas por compostos como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (DALMARCO, 2006).

As ESBL são derivadas das enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV que sofreram mutações pontuais, com substituição de aminoácidos em sua estrutura, acarretando na amplificação da atividade hidrolítica das enzimas originais (BRADFORD, 2001). Existem outras ESBL que não sofreram mutações pontuais, como a CTX-M, o grupo mais importante, que contém mais de 80 variantes distribuídas em cinco grupos. Outras variantes raramente encontradas são BES-1, BEL-1, TLA-1 e TLA-2, e SFO-1 (POIREL *et al.*, 2008).

Os plasmídios que possuem o gene que codifica a produção de ESBL também podem conter genes que codificam resistência a outros antimicrobianos como aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclina, quinolonas e cloranfenicol (LIVERMORE, 1995).

A presença da enzima ESBL ocorre principalmente em *Klebsiella spp* e *Escherichia coli*, mas pode ser produzidas por outros membros da família *Enterobacteriaceae*, como *Citrobacter spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Proteus spp*, entre outros (CANTÓN *et al.*, 2008).

Diversos testes fenotípicos para detecção de ESBL foram criados baseados no sinergismo entre uma cefalosporina de terceira geração e um inibidor de β -lactamase, como o clavulanato. Podem ser citados como exemplos teste de dupla difusão, discos combinados e E-test® (KAHLMETER, 2008).

As ESBLs têm mostrado variável expressão fenotípica. Enquanto uma ESBL pode ter maior capacidade para hidrolisar drogas como a ceftriaxona ou cefotaxima, outra pode ter maior capacidade de hidrolisar a ceftazidima ou aztreonam. A detecção laboratorial de cepas produtoras de ESBL é muito desafiadora, pois são necessários diversos substratos específicos. A presença de ESBL em uma bactéria, nem sempre produz resistência às cefalosporinas detectável pelos testes de sensibilidade aos antimicrobianos realizados *in vitro*, ocorrendo, porém, a resistência *in vivo* quando as infecções são tratadas com esses antimicrobianos (MACKENZIE *et al.*, 2002).

Embora cepas bacterianas produtoras de ESBL tenham sido descritas em quase todos os continentes, acredita-se que os dados de prevalência sejam subestimados, isso porque os testes de sensibilidade aos antimicrobianos

rotineiramente utilizados têm dificuldades em detectar a produção de ESBL nestas amostras (GALES *et al.*, 1997).

A presença de falhas na detecção de ESBL além de dificultar a identificação correta de surtos, interfere diretamente na tomada de medidas de controle para prevenir sua disseminação em ambientes hospitalares, tornando imprescindível o conhecimento de métodos laboratoriais que ajudem em uma correta detecção e identificação destes mecanismos de resistências.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os diferentes métodos fenotípicos de detecção laboratorial de ESBL em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli* provenientes de pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, previamente caracterizadas por métodos moleculares.

1.1.2 Objetivos específicos

- Verificar a sensibilidade dos métodos confirmatórios utilizados na detecção de ESBL.
- Determinar o melhor substrato entre as cefalosporinas e/ou monobactams utilizados na rotina laboratorial para os testes de triagem e confirmatórios.
- Avaliar as Concentrações Inibitórias Mínimas e sensibilidades dos diferentes antimicrobianos testados.
- Determinar a presença de outras β -lactamases presentes através de métodos fenotípicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

As enterobactérias representam no ambiente hospitalar, um grande problema a ser enfrentado, principalmente por apresentarem resistência a várias classes de antimicrobianos, dificultando assim, a conduta terapêutica. Estudos de vigilância de resistência aos antimicrobianos nestes ambientes demonstram que em países da América Latina a resistência em bacilos gram-negativos é mais preocupante que em gram-positivos (SADER, 2000).

A resistência a esses medicamentos pode ser caracterizada como intrínseca ou natural, e é tipicamente característica da espécie e adquirida, cujas espécies em seu estado original são sensíveis a um determinado antimicrobiano e que, por pressão seletiva, passam a ser resistentes. Na resistência intrínseca, os microrganismos não apresentam o alvo apropriado para o antimicrobiano ou possuem barreiras naturais que previnem o agente de alcançar o alvo. A resistência adquirida reflete uma verdadeira modificação na composição genética de uma bactéria, o que faz com que um antimicrobiano eficaz deixe de ser ativo contra determinado microrganismo (KAYE *et al.*, 2000). A resistência adquirida se deve a modificações genéticas por mutação pontual, aquisição exógena de DNA, como transformação, transdução e conjugação, ou rearranjos intra-moleculares no DNA, como transposons e integrons (STEINKE e DAVEY, 2001).

As bactérias podem desenvolver múltiplos mecanismos de resistência contra um único agente ou a classes de agentes. Uma única alteração bacteriana pode resultar no desenvolvimento de resistência a diferentes antimicrobianos (KAYE *et al.*, 2000) e em algumas cepas, os mecanismos podem co-existir tornando-as multirresistentes aos antimicrobianos (STEINKE e DAVEY, 2001).

Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos, segundo Walsh (2000), podem ser classificados quanto à redução da afinidade pelos sítios de ligação da droga, alteração da permeabilidade da membrana externa e degradação da droga, os quais serão explicados a seguir.

2.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

2.2.1 Redução da afinidade pelos sítios de ligação da droga (PBPs)

Durante a síntese da parede celular as bactérias mantêm a pressão osmótica interna, pois apresentam estrutura da parede celular rígida. A união de precursores da parede celular ocorre por catálise de enzimas específicas e de proteínas reguladoras, as PBPs. Quando a bactéria está exposta ao antibiótico e este se liga às PBPs, enzimas autolíticas são liberadas na membrana da célula, degradam a parede celular e levam à lise celular (ROSSI E ANDREAZZI, 2005).

As β -lactamases nas bactérias gram-negativas estão localizadas no espaço periplasmático, podendo alcançar maiores concentrações e agir mais eficazmente sobre os β -lactâmicos que estão atravessando este espaço para atingir seu alvo. O alvo destes antibióticos são as PBPs. A redução da afinidade dos antimicrobianos pelas PBPs, situadas na membrana citoplasmática bacteriana ocorre por substituição de um aminoácido e esta alteração impede a ligação da droga (RICE, 2001).

A modificação das PBPs é o principal mecanismo de resistência bacteriana aos β -lactâmicos observada em cocos gram-positivos e algumas bactérias fastidiosas gram-negativas como *Neisseria gonorrhoeae* (SANDERS e SANDERS, 1992).

2.2.2 Alteração da permeabilidade da membrana externa

A alteração de permeabilidade da membrana externa pode constituir um mecanismo de resistência nas bactérias gram-negativas, mas não nas gram-positivas, pois estas não possuem membrana externa. A perda de uma proteína de membrana ou porina da membrana externa (OMP) pode reduzir o acesso do antibiótico ao espaço periplasmático uma vez que os β -lactâmicos têm que cruzar a membrana externa das bactérias gram-negativas através de OMPs. Em bactérias mutantes estas porinas podem não ser produzidas e ocorre a impermeabilidade da

membrana (BRADFORD, 2001). As OMPs de microrganismos gram-negativos são capazes de formar canais constituídos de água no seu interior que permitem a difusão de solutos hidrofílicos através da membrana externa e a extrusão de produtos não utilizados pela célula bacteriana. As porinas chamadas de clássicas ocorrem na membrana externa como trímeros de 36 a 38 kDa (RICE, 2001).

As OMPs são geralmente divididas em duas classes: porinas não específicas que permitem a difusão de moléculas hidrofílicas de baixo peso molecular e porinas específicas, as quais facilitam a difusão de substratos específicos.

A taxa de entrada de um β -lactâmico pelos canais de porina depende do seu tamanho, carga e hidrofobicidade. Moléculas de alto peso molecular, maiores de 800Da, negativamente carregadas e lipofílicas apresentam dificuldade na entrada da célula bacteriana. Por outro lado, moléculas pequenas, ziteriônicas e com características hidrofílicas apresentam rápida penetração. Moléculas pequenas e ziteriônicas como ampicilina, cefaloridina e imipenem penetram mais facilmente a membrana externa bacteriana (NIKAIDO, 1994).

Dentre as diferentes OMPs que se encontram na membrana externa estão OprC, OprD e OprE e a maior e mais abundante delas, a OprF, formada por polipeptídeo de 36-kDa. Provavelmente é a mais utilizada pela maioria dos β -lactâmicos para penetrar a bactéria. As OMPs, OprC e OprE são canais inespecíficos, no entanto, são utilizadas por alguns antimicrobianos (VILA e MARCO, 2002).

2.2.3 Degradação da droga

As β -lactamases são enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, o qual é responsável pela atividade antimicrobiana, e são produzidas por uma grande variedade de diferentes espécies com características distintas. Nas bactérias gram-positivas estas enzimas são secretadas para o meio extracelular, e por estarem em menor concentração neste meio possuem menor atividade. Nas bactérias gram-negativas estas enzimas são armazenadas no espaço

periplasmático, fato que favorece sua maior concentração e o alcance mais fácil de seu alvo (ROSSI E ANDREAZZI, 2005).

As PBPs também reagem com os β -lactâmicos para formar ésteres de serina, diferentes daqueles formados pelas β -lactamases. Elas possuem atividade hidrolítica fraca quando atuam nos β -lactâmicos e podem proteger a célula bacteriana se a entrada da droga for restringida pela impermeabilidade da membrana (LIVERMORE, 1995).

2.3 MECANISMO DE AÇÃO DAS BETA-LACTAMASES

A primeira β -lactamase foi identificada em *E. coli* antes mesmo do uso da penicilina e até hoje, em bactérias gram-negativas, a produção desta enzima continua sendo o principal fator de resistência (GRUPTA, 2007). As β -lactamases são enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, impossibilitando a atividade antimicrobiana (LIVERMORE, 1995).

A enzima β -lactamase se associa de forma não covalente ao anel β -lactâmico do antimicrobiano, e então o 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 alterados e inativados (LIVERMORE, 1995), conforme demonstrado na figura abaixo.

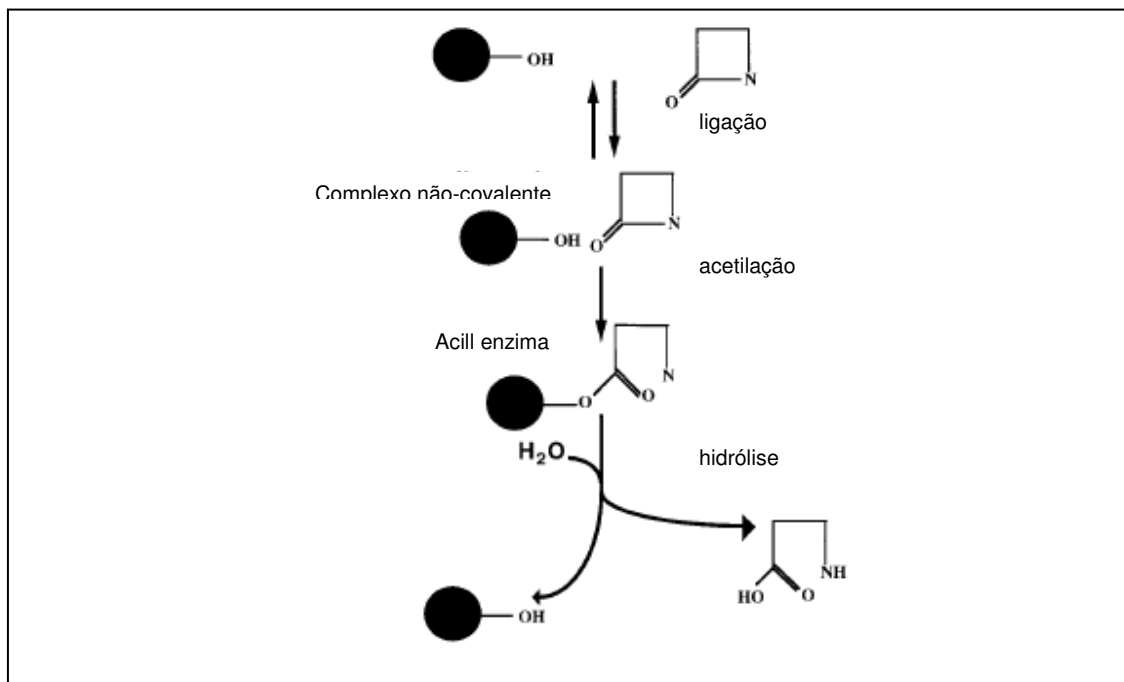


FIGURA 1 - MECANISMO DE AÇÃO DAS β-LACTAMASES

FONTE – Modificado a partir de Livermore (1995)

LEGENDA: ●-OH : enzima β-lactamase

Livermore (1995) denomina de β-lactamases primárias as enzimas codificadas no cromossomo bacteriano, que são naturais à espécie e secundárias às enzimas que são codificadas devido à inserção cromossomal ou adquiridas por plasmídios. A distribuição das enzimas em plasmídios ou transposons garante sua transmissibilidade e disseminação.

Muitas bactérias gram-negativas possuem uma resistência natural, mediada por cromossomos. Estas enzimas podem ter evoluído a partir de proteínas ligadoras de penicilina, com as quais apresentam seqüências homólogas. Provavelmente esta evolução resulta à pressão seletiva exercida pelos β-lactâmicos em organismos do solo encontrados no ambiente (GHUYSEN, 1991).

A habilidade das β-lactamases conferirem resistência ou não depende de alguns fatores, como: localização, cinética, a quantidade e condições físico-químicas do meio. Em relação à localização ocorre uma diferença entre as gram-positivas e as gram-negativas, já que na primeira as enzimas se encontram extracelularmente e dependendo das condições de crescimento algumas enzimas podem aderir à membrana citoplasmática. Nas gram-negativas as β-lactamases se encontram em grande quantidade no espaço periplasmático, mostrando a razão pela qual a

produção dessas enzimas é a principal forma de resistência aos antimicrobianos. A quantidade de enzima também é de grande importância, pois quanto maior for a concentração maior será a resistência ao antimicrobiano e, em relação às condições físico-químicas, não há estudos comprovando sua importância *in vivo*, porém fatores como pH, substrato utilizado e concentração de íons podem interferir no perfil de sensibilidade dos microrganismos *in vitro* (LIVERMORE, 1995).

2.4 CLASSIFICAÇÃO DAS BETA-LACTAMASES

A classificação da estrutura molecular das β -lactamases foi proposta primeiramente por Ambler em 1980, quando somente quatro seqüências de aminoácidos eram conhecidas. Nesta época, uma única classe de serina β -lactamase foi designada de classe A, que incluía os *Staphylococcus aureus* PC1 penicilinase, em contraste com a classe B de metalo β -lactamase presente em *Bacillus cereus*. A classe D, que envolve as enzimas que hidrolisam a oxacilina, foi segregada das outras serinas β -lactamases depois de 1980 (BUSH, JACOBY e MEDEIROS, 1995).

Bush, Jacoby e Medeiros (1995) propuseram uma classificação funcional baseada em características estruturais e bioquímicas. Desta maneira, as β -lactamases foram divididas em quatro grupos de acordo com o substrato que é hidrolisado e a sensibilidade a determinados inibidores. O Grupo 1 compreende as cefalosporinases que não são inibidas pelo ácido clavulânico. O Grupo 2, onde se encontram as β -lactamases, são geralmente inibidos no seu sítio ativo pelos inibidores de β -lactamases e compreende as classes moleculares A e D. O grupo 3, composto pelas metalo β -lactamases, são pouco inibidas por todas as classes de inibidores de β -lactamases, exceto EDTA e *p*-cloromercuribenzoato (*p*CMB) e o grupo 4 é formado pelas penicilinas não inibidas pelo ácido clavulânico.

Algumas tentativas foram feitas para conservar os grandes grupos, no entanto, três mudanças foram assinaladas. Devido ao número de TEM e SHV, derivados das β -lactamases continuaram a aumentar, decidiu-se a derivação da classificação dessas enzimas em grupos que retém o prefixo "2b". No lugar da designação do grupo 2b as ESBLs foram substituídas para o grupo 2be para mostrar

que essas enzimas são derivadas do grupo 2b e possuem uma atividade de espectro estendido. Igualmente, as β -lactamases estruturalmente derivadas do grupo 2b com redução da afinidade por inibidores de β -lactamases tem sido colocadas em um novo grupo, o 2br. Um terceiro grupo de enzimas foi adicionado no esquema, 2f β -lactamases, que é composto por enzimas que hidrolisam carbapenêmicos e são pouco inibidas pelo ácido clavulânico. A tabela a seguir, representa o esquema de classificação proposto por Bush, Jacoby e Medeiros.

Grupo de Bush, Jacoby e Medeiros	Classe molecular	Substrato preferido	Inibido por		Enzimas representantes
			AC	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	-	-	AmpC, MIR-1
2 ^a	A	Penicilinas	+	-	Penicilinases de gram-positivos
2b	A	Cefalosporinas Penicilinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilinas Cefalosporinas (de 1 ^a , 2 ^a , 3 ^a e 4 ^a geração) Monobactâmicos	+	-	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6, K1 de <i>Klebsiella oxytoca</i>
2br	A	Penicilinas	+/-	-	TEM-30 a TEM-36, TRC-1
2c	A	Penicilinas Carbapenêmicos	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penicilinas Oxacilina	+/-	-	OXA-1 a OXA-11, PSE-2
2e	A	Cefalosporinas	+	-	Cefalosporinases induzíveis de <i>Proteus vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas Cefalosporinas Carbapenêmicos	+	-	NMC-a de <i>Enterobacter cloacae</i> , SMC-1 de <i>Serratia marcescens</i>
3	B	Todos os β -lactamâmicos	-	+	L1 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , CcrA de <i>Bacteroides fragilis</i>
4	ND	Penicilinas	-	?	Penicilinases de <i>Burkholderia cepacea</i>

FIGURA 2 - ESQUEMA DE CLASSIFICAÇÃO PROPOSTA POR BUSH, JACOBY E MEDEIROS

FONTE - Bush, Jacoby e Medeiros (1995)

LEGENDA - * AC: ácido clavulânico, ND: não determinada, (+): inibida, (-): não inibida, (+/-): pouco inibida.

2.5 BETA-LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO

A persistente exposição das bactérias aos β -lactâmicos tem levado a uma superprodução ou a mutações nas β -lactamases. Com isso, as β -lactamases tornam-se capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e

monobactâmicos, passando a ser chamadas de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (BRADFORD, 2001; GUPTA, 2007; LIVERMORE, 2008).

As ESBLs foram inicialmente descobertas em *Klebsiella spp* e *E. coli*, mas também podem estar presentes em outros gêneros da família *Enterobacteriaceae*, como *Citrobacter spp*, *Proteus spp* e *Salmonella spp* (AUGUSTI *et al.*, 2007).

O gene responsável por esta resistência pode estar inserido em plasmídios, sendo facilmente transferido entre enterobactérias e contribuindo para a disseminação das ESBLs. Plasmídios que carregam os genes de β -lactamase, freqüentemente carregam genes de resistência de outras classes de antimicrobianos, como as sulfonamidas e aminoglicosídeos (NOGUEIRA *et al.*, 2006).

As ESBLs têm demonstrado variável expressão fenotípica, enquanto uma ESBL tem maior capacidade para hidrolisar drogas como a ceftriaxona ou a cefotaxima, outra pode ter maior capacidade de hidrolisar a ceftazidima ou o aztreonam. Assim, a detecção laboratorial de cepas produtoras de ESBL é muito desafiadora, pois são necessários múltiplos substratos para sua detecção.

2.5.1 Tipos de ESBLs

2.5.1.1 SHV

A enzima SHV é uma ESBL produzida por *Enterobacteriaceae*, principalmente em *Klebsiella spp* e foi assim denominada em função da estrutura química sulfidril variável em seu sítio ativo. São codificadas por plasmídios, portanto, facilmente transferidas para outras bactérias. Entretanto, também podem ocorrer β -lactamases codificadas em cromossomos (ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

A SHV tem ponto isoelétrico entre 7,0 e 8,2, não é capaz de hidrolisar as cefamicinas e carbapenêmicos, mas hidrolisa as oximinocefalosporinas e é inibida pelos inibidores de β -lactamase (BRADFORD, 2001).

Há relativamente poucos derivados de SHV-1 e a maioria dos fenótipos ESBL são caracterizados pela substituição de serina por glicina na posição 238. A família SHV é mais freqüentemente encontrada em *K. pneumoniae*, contudo, esta

enzima também já foi relatada em *Citrobacter koseri*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (BRADFORD, 2001).

A SHV-2 é a primeira β -lactamase capaz de hidrolisar os antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro. Foi identificada pela primeira vez em uma linhagem de *K. ozaneae* isolada na Alemanha (BRADFORD, 2001). Logo após sua descoberta também houve seu isolamento em outros países como a Argentina, Chile, China, Grécia, França e Tunísia (PHILIPPON *et al.*, 1989). A SHV-6 foi inicialmente identificada em *K. pneumoniae* em 1991 na França e tem capacidade de hidrolisar ceftazidima e monobactâmicos, porém não a cefotaxima (BRADFORD, 2001).

Em um estudo realizado na Europa, Babini e Livermore (2000) identificaram a presença do gene SHV em 84% das amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL estudadas, demonstrando a importância clínica deste tipo de β -lactamase.

2.5.1.2 TEM

As variantes de ESBL de maior interesse clínico provêm da família TEM, enzima assim nomeada em homenagem ao primeiro isolado bacteriano coletado de uma menina grega chamada Temoniera. Estas enzimas são capazes de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas.

A TEM e SHV têm discreta diferença estrutural e esta diferença está relacionada a mudanças de aminoácidos junto ao sítio ativo da enzima. Estas mudanças podem alterar sua configuração, o ponto isoelétrico ou as propriedades de ligação do sítio ativo, aumentar a afinidade da enzima e a habilidade hidrolítica pelo substrato oximino. A β -lactamase plasmidial mais comum é a TEM-1 encontrada em enterobactérias com capacidade de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de primeira geração, como a cefalotina e cefaloridina (PHILIPPON *et al.*, 1989).

A TEM-2 é a primeira β -lactamase derivada da TEM-1 pela substituição de um aminoácido, mas não ocorre alteração de sua atividade sobre o substrato. A primeira a mudar o espectro de hidrólise foi a TEM-3. Tanto a TEM-1 como a TEM-2 tem ponto isoelétrico (PI) entre 5,5 e 6,3; mas isoladamente o PI não permite a

diferenciação de todas as variantes de TEM (PHILIPPON *et al.*, 1994; BRADFORD, 2001).

O fato da TEM-1 ser mediada por plasmídio e transposons facilita sua disseminação para outras espécies bacterianas. O primeiro grande surto devido a bactérias produtoras de ESBL, especificamente por produtores de TEM-3, ocorreu em Clermont-Ferrand, entre 1985-1987. Outros surtos também ocorreram em Chicago, Nova Iorque, São Francisco e Boston, na década de 90 (LIVERMORE, 1995).

As enzimas do tipo TEM são mais comuns em *E. coli* e *K. pneumoniae*, mas também já foram identificadas em *E. aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri* e *Salmonella spp*. Dentre as enzimas desta família a TEM-12 tem menor poder hidrolítico, pois apresenta grande suscetibilidade a oximinoaminotiazolil cefalosporinas (BRADFORD, 2001).

2.5.1.3 CTX-M

A CTX-M também é uma enzima plasmidial pertencente à classe A de Ambler e confere resistência a todas as cefalosporinas de espectro ampliado. Esta enzima tem maior atividade hidrolítica à cefotaxima que à ceftazidima e é inibida pelos inibidores de β -lactamase, sendo mais sensível ao tazobactam que ao ácido clavulânico (LIVERMORE, 1995; BABIC *et al.*, 2006).

As enzimas CTX-M podem ter surgido por aquisição de genes cromossomais pré-existentes de *Kluyvera spp*. Estas enzimas têm somente 40% de semelhança com a TEM e SHV e formam um grupo de ESBL com ampla emergência (BABIC *et al.*, 2006).

Na América do Sul é relatada como tipo predominante (LIVERMORE e BROWN, 2001), inclusive no Brasil (BONNET, 2004). Na Itália foi detectada em *Proteus vulgaris* (PAGANI *et al.*, 2003). Já foi encontrada também em *Citrobacter freundii* na Polônia (GNIADKOWSKI *et al.*, 1998) e em outras espécies de enterobactérias, ocorrendo na Europa, África, Ásia, América do Sul e mais recentemente na América do Norte (BONNET, 2004).

Atualmente esta família é composta por mais de 80 enzimas, que estão separadas de acordo com a similaridade da seqüência de aminoácidos, em cinco grupos, os quais podem ser visualizados na Tabela 2.

GRUPO	SUBTIPOS
grupo CTX-M-1	CTX-M-1; CTX-M-3; CTX-M-10; CTX-M-11; CTX-M-12; CTX-M-15; CTX-M-22; CTX-M-23; CTX-M-28; CTX-M-29; CTX-M-30; CTX-M-32; CTX-M-33; CTX-M-34; CTX-M-36; CTX-M-37; CTX-M-42; CTX-M-52; CTX-M-53; CTX-M-54; CTX-M-55; CTX-M-57 e UOE-1
grupo CTX-M-2	CTX-M-2; CTX-M-4; CTX-M-5; CTX-M-6; CTX-M-7; CTX-M-20; CTX-M-31; CTX-M-35; CTX-M-43 e CTX-M-44.
grupo CTX-M-8	CTX-M-8; CTX-M-40 e CTX-M-63
grupo CTX-M-9	CTX-M-9; CTX-M-13; CTX-M-14; CTX-M-16; CTX-M-17; CTX-M-19; CTX-M-21; CTX-M-24; CTX-M-27; CTX-M-38; CTX-M-45; CTX-M-46; CTX-M-47; CTX-M-48; CTX-M-49; CTX-M-50 e CTX-M-51
grupo CTX-M-25	CTX-M-25, CTX-M-26; CTX-M-39 e CTX-M-41

FIGURA 3 – GRUPOS E SUBTIPOS DAS ENZIMAS CTX-M

FONTE - ROSSOLINI *et al.* (2008)

Os membros do mesmo grupo exibem similaridade maior que 94% entre suas seqüências de aminoácidos, enquanto entre grupos diferentes a semelhança é menor que 90% (BONNET, 2004).

Estudos cinéticos mostram que enzimas do tipo CTX-M hidrolisam cefalotina ou cefaloridina melhor que benzil-penicilina, e possuem maior afinidade por

cefotaxima que por ceftazidima. A CIM para ceftazidima varia entre 0,5 a 2 µg/mL, enquanto a CIM da cefotaxima varia de 8 a 256 µg/mL, existindo alguma hidrólise da ceftazidima, mas não suficiente para conferir resistência aos produtores. São inibidas por tazobactam mais eficientemente que por sulbactam ou clavulonato (ROSSOLINI *et al.*, 2008).

Novas enzimas CTX-M são descritas constantemente, sendo difícil a sua atualização. No endereço eletrônico <<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>> é possível observar mais de 80 enzimas descritas, sendo que nem todas foram publicadas.

A maior preocupação atualmente é a detecção da CTX-M em isolados também presentes em infecções comunitárias (BABIC *et al.*, 2006).

2.6 OUTROS TIPOS DE BETA-LACTAMASES

2.6.1 Amp C

As β-lactamases do tipo AmpC são enzimas constitutivas em determinadas espécies bacterianas, podendo, em alguns casos, ser transferidas por plasmídios. São capazes de hidrolisar β-lactâmicos de amplo espectro e apresentam atividade contra cefamicinas. Contudo, não são capazes de hidrolisar cefepime, cefpirome e carbapenêmicos. Essas enzimas pertencem ao grupo 1 de Bush ou classe C de Ambler e não são inibidas por inibidores de β-lactamase como o ácido clavulânico. O modo de expressão normalmente observado na AmpC cromossômica é o modo cromossômico-induzível. Contudo, a produção dessa enzima, em alguns casos, independe do agente indutor. Para que seja mantida a produção da AmpC em níveis elevados, faz-se necessário a ocorrência de duas mutações separadas, uma aumentando a eficiência do gene promotor e outra inativando o gene repressor. Quando presente em plasmídios, a enzima AmpC encontra-se sempre em modo ativado (SADER, 2000; PAI *et al.*, 2004; ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

Os primeiros relatos de bactérias produtoras β-lactamase do tipo AmpC ocorreram em 1988, sendo encontradas exclusivamente em nível de expressão

cromossômica e, desde então, várias enzimas AmpC mediadas por plasmídios passaram a ser relatadas em *Klebsiella spp*, *E. coli*, *Salmonella spp*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp* e *Proteus mirabilis*. Em alguns microrganismos gram-negativos como *E. coli* e *Shigella spp* ocorre a produção de AmpC constitutivamente em quantidades insuficientes para causar resistência aos antimicrobianos de amplo espectro (LIVERMORE, 1995). Em outros como *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp* e *Serratia marcescens* a AmpC é produzida de forma induzida, determinando resistência às cefalosporinas de terceira geração. O poder de indução é variável: as cefalosporinas de primeira geração, ampicilina e carbapenêmicos são fortes indutores enquanto que as cefalosporinas de segunda e terceira gerações são indutores fracos. A indução da produção de AmpC ocorre pela exposição do microrganismo a um antimicrobiano indutor que, uma vez removido, fará com que a produção de AmpC retorne aos níveis basais (ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

A resistência às cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração pode ocorrer durante o tratamento, especialmente em infecções com alto inóculo bacteriano. Isso porque, durante o tratamento, o gene regulador da enzima deixa de exercer sua atividade repressora permitindo a expressão do gene e a síntese de grande quantidade de AmpC. Por outro lado, uma simples mutação ocorrida no gene repressor pode fazer com que o mesmo perca sua função regulatória e a bactéria passará a expressar AmpC constitutivamente, resultando na falência terapêutica (THOMSON, 2001). Nesses casos, recomenda-se a associação de um aminoglicosídeo ao β -lactâmico ou a utilização de um β -lactâmico mais estável a essas enzimas, tais como as cefalosporinas de quarta geração ou carbapenêmicos. Embora a resistência também possa ocorrer para estes últimos, eles são estáveis à hidrólise pela enzima AmpC e a produção de grandes quantidades de AmpC não é suficiente para levar à resistência, sendo necessária a associação com a diminuição da permeabilidade da membrana externa (LIVERMORE, 1995).

As amostras com altos níveis de expressão de AmpC são também de difícil identificação, pois podem impedir o reconhecimento de uma ESBL, especialmente em espécies ou linhagens de *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Aeromonas spp*, *M. morgani*, *C. freundii*, *Hafnia alvei* e *P. aeruginosa*, que codificam cromossomalmente AmpC. Nestes organismos, o clavulanato poderá atuar como indutor de grande produção de AmpC e aumentar a resistência de um isolado a

outras drogas usadas na triagem e produzem resultado falso-negativo na detecção de ESBL. Para estes microrganismos os inibidores preferíveis são o tazobactam e o sulbactam, por serem menos indutores da produção de AmpC (THOMSON, 2001).

2.6.2 KPC

As enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemicosase*) são carbapenemases pertencentes à classe A de Ambler e ao subgrupo 2f de Bush, Jacoby e Medeiros. Estas enzimas são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam e, possuem a habilidade de hidrolisar uma grande variedade de β -lactâmicos como cefalosporinas, penicilinas, aztreonam e inclusive, os carbapenêmicos. Diferenciam-se das demais carbapenemases do grupo 2f por serem de origem plasmidial e terem a capacidade de hidrolisar todas as cefalosporinas (QUEENAN e BUSH, 2007).

O grupo KPC tem um alto potencial de disseminação devido à sua localização em plasmídeo e é mais freqüentemente encontrada em *K. pneumoniae*, uma bactéria com grande capacidade de acumular e ser responsável pela transferência de genes de resistência. Esta disseminação dificulta o controle de epidemias, e preocupa os profissionais da área de saúde, pois o tratamento destas infecções é extremamente difícil, elevando as taxas de mortalidade (QUEENAN e BUSH, 2007).

No grupo das KPC existem quatro variantes, sendo elas, KPC-1, KPC-2, KPC-3 e KPC-4 (NAAS *et al.*, 2008). KPC-1 é o primeiro membro da família das KPC e foi isolada nos Estados Unidos em 1996, de uma *K. pneumoniae* resistente à imipenem, meropenem, aztreonam e cefalosporinas de amplo espectro (YIGIT *et al.*, 2001). Em seguida KPC-2, isolada na América do Norte, encontradas em isolados de *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *K. oxytoca* e *Enterobacter spp* (YIGIT *et al.*, 2003) e KPC-3, encontrada na cidade de Nova York, nos anos de 2001 a 2004, em amostra de *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* (BRATU *et al.*, 2005). E ainda, em 2004, foi isolada a KPC-4, encontrada na Escócia, em isolados de *Enterobacter spp* e a KPC-5 encontrada em *K. pneumoniae* na cidade de Porto Rico (WOLTER *et al.*, 2009).

Recentemente foram descritos no endereço eletrônico <<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>> outros subtipos de KPC, a KPC-6, KPC-7 e KPC-8 como novas variantes desta enzima, porém estes trabalhos ainda não foram publicados.

2.7 EPIDEMIOLOGIA DAS ESBLs

2.7.1 Incidência

A incidência mundial das bactérias produtoras de ESBL é muito difícil de ser determinada, devido principalmente às diferenças entre os métodos de detecção e interpretação utilizados entre os países e instituições de saúde envolvidas. Assim, considera-se que a ocorrência de ESBL é mundialmente sub-estimada (STEWART *et al.*, 2000).

As primeiras epidemias de infecções hospitalares por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL foram descritas na França, no final da década de 80. Desde então, foram documentados em todo o mundo numerosos casos de surtos nosocomiais causados por estas bactérias. Entre os anos de 1988 e 1990 foram detectados na Espanha os primeiros relatos de enterobactérias produtoras de ESBL. O surto mais importante descrito até o momento naquele país ocorreu entre os anos de 1993 e 1995, no hospital de Bellvitge. O surto foi devido à disseminação clonal de uma cepa de *K. pneumoniae* produtora de ESBL e atingiu 150 pacientes, dos quais 69,6% estavam internados na UTI (MENEZES e SILVA *et al.*, 2006).

Sader (2000) ressaltou que a prevalência de ESBL varia de acordo com as diferentes regiões geográficas e até inter-hospitais. Estudos realizados por Piddock e colaboradores (1997) com mais de 3000 isolados de *Enterobacteriaceae* obtidas em 43 hospitais britânicos, demonstrou que somente 1% dos microrganismos produziam ESBL. Por outro lado, Lyon e colaboradores encontraram um aumento na produção de ESBL entre 1990 e 1995 em isolados de hemocultura na cidade de Hong Kong, Japão, e enfatizaram a importância do uso apropriado de métodos de triagem a fim de detectar essas enzimas. Livermore e Yuan (1996), observaram que 23% dos

isolados de *Klebsiella* sp vindas das unidades de tratamento intensivo de 35 hospitais europeus são produtoras de ESBL.

Um aumento significativo no surgimento de ESBL tem sido reportado em várias regiões do mundo, incluindo América do Norte, com incidência de ESBL em *Klebsiella* spp, *E.coli* e *Proteus mirabilis* de 44%, 4,7% e 9,5%, respectivamente (WINOKUR *et al.*, 2001; MATHAI *et al.*, 2001). Na América Latina, índices mais elevados foram encontrados em *Klebsiella* spp (47,3%), *E.coli* (25,4%) e *Proteus mirabilis* (35,5%) (GALES *et al.*, 2002b). Villegas e colaboradores (2008) relataram a alta prevalência mundial de ESBL, sendo de 3% na Suécia, superior a 25% na Grécia, Turquia e Portugal e superior a 30% na América do Sul. Considerando alguns países em conjunto, como Brasil, Colômbia e Venezuela, os mesmos apresentaram de 30 a 60% de prevalência em *Klebsiella* spp produtoras de ESBL, e no Uruguai e Chile, *E. coli* produtoras de ESBL representou de 4,5 a 12% dos isolados desta espécie.

Segundo Augusti e colaboradores (2007), a prevalência de *K. pneumoniae* e *E. coli* resistentes às cefalosporinas de terceira geração chegou a 8,9% e 3,2%, respectivamente, nos Estados Unidos, e alcançou valores ainda maiores em grandes hospitais universitários desse país.

Em estudos realizados na América Latina, utilizando isolados nosocomias, Gales e colaboradores (2002) observaram que 39% dos isolados de *K. pneumoniae* eram produtoras de ESBL. Estudo semelhante foi realizado por Nogueira e colaboradores (2006), os quais encontraram a ocorrência de 31,1% de ESBL em diversas espécies de enterobactérias.

2.7.2 Transmissão e profilaxia

As cepas produtoras de ESBL disseminaram-se rapidamente por todo o mundo e, quando estabelecidas em uma região, freqüentemente passam a ser o mecanismo de resistência prevalente. A transmissão pelas mãos dos profissionais é relevante, sendo o trato gastrintestinal dos pacientes um importante reservatório (WINOKUR *et al.*, 2000). Alguns surtos foram resultantes de contaminação de

aparelhos e insumos diagnósticos, como termômetros e gel usado em ultrasonografia (GNIADKOWSKI *et al.*, 1998).

A transmissão horizontal do gene de resistência é facilitada por estar freqüentemente codificada em plasmídios que podem ser facilmente transferidos entre as cepas (PAI *et al.*, 2004). Além da transmissão das cepas resistentes inter-pacientes, também ocorre a aquisição de resistência por cepas susceptíveis. As Unidades de terapia intensiva geralmente são os epicentros da produção de ESBLs e é importante ressaltar que a transferência inter-hospitais de cepas genotipicamente relacionadas pode ocorrer (MONNETT, 2004).

Alguns fatores de risco relacionados à aquisição de bactérias produtoras de ESBL incluem pacientes internados em estado grave, com permanência prolongada em hospitais e realização de procedimentos invasivos (PATERSON E BONOMO, 2005). O uso de antimicrobianos de amplo espectro como cefalosporinas de terceira geração, quinolonas, e aminoglicosídeos também foi associada à emergência de ESBLs (GUPTA, 2007; LEE *et al.*, 2003).

Para o controle destes surtos hospitalares têm sido aplicadas medidas como a restrição do consumo de cefalosporinas de terceira geração, isolamento dos pacientes colonizados ou infectados e educação da equipe que lida diretamente com os pacientes quanto ao cuidado com a manipulação destes e a correta lavagem das mãos. A descontaminação intestinal seletiva, também pode ser utilizada como medida de controle de surtos, porém pode ocasionar o desenvolvimento de novas resistências ou a seleção de outros microrganismos multirresistentes (MENEZES e SILVA *et al.*, 2006).

2.7.3 Reservatórios não-hospitalares

Os microrganismos produtores de ESBL são usualmente encontrados em ambientes hospitalares, principalmente nas unidades de tratamento intensivo. A sua incidência vem aumentando em ambientes cirúrgicos, pediátricos e neonatais, além dos oncológicos. Porém, situações inusitadas vêm sendo reportadas com mais freqüência nos Estados Unidos e França, a exemplo do aparecimento deste fenômeno em locais até então sem relatos de transmissão destes microrganismos,

como centros de reabilitação, casas de repouso, assim como pacientes ambulatoriais portadores de doenças crônicas.

O primeiro relato de uma possível ESBL comunitária foi descrito em 1998 na Irlanda, em uma cepa de *E. coli* resistente a ácido nalidíxico, causando infecção urinária em um paciente que não tinha histórico de internação hospitalar, porém fazia uso de múltiplos antibióticos. O tipo desta enzima não foi identificado (CORMICAN *et al.*, 1998).

Recentemente estudos realizados no Canadá (PITOUT *et al.*, 2004), Itália (BRIGANTE *et al.*, 2005), Espanha (RODRIGUES-BANO *et al.*, 2004), e na Inglaterra (WOODFORD *et al.*, 2004) relataram casos de infecções comunitárias causadas por bactérias produtoras de ESBL. Estas bactérias eram principalmente *E. coli*, produtoras da enzima CTX-M, exibindo co-resistência a sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina e ciprofloxacina.

Outro estudo realizado no Canadá identificou e avaliou os riscos para aquisição de infecções comunitárias causadas por bactérias produtoras de ESBL, e conclui que a idade avançada, sexo feminino, e doenças como diabetes, incontinência urinária, hemodiálise e problemas cardíacos são importantes fatores para o desenvolvimento destas infecções (LAUPLAND *et al.*, 2008).

2.8 ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

A utilização de β -lactâmicos em associação com inibidores de β -lactamase, foi considerado, inicialmente o tratamento de escolha para infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL, porém, não demorou muito para se verificar sua ineficácia *in vivo* (WARREN *et al.*, 2008). Observou-se que estes fármacos estão sujeitos ao aumento da CIM com o aumento do inóculo bacteriano, ocorrendo falha terapêutica. Também pode ocorrer perda de porinas na membrana externa bacteriana, o que leva também à redução da atividade inibitória destes fármacos (DALMARCO *et al.*, 2006).

Cefalosporinas de terceira geração não podem ser utilizadas em infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL, pois mesmo com a aparente sensibilidade em testes *in vitro*, as mesmas não sofrem ação destes antimicrobianos

in vivo. Somente alguns grupos de β -lactâmicos conservam sua atividade frente às enterobactérias produtoras de ESBL, como as cefamicinas, que são freqüentemente ativas e poderiam ser usadas (MARTINEZ-MARTINEZ, 2008), porém a prática mostra uma baixa resposta terapêutica, seu uso não é aconselhado assim como o das cefalosporinas de quarta geração (JASSER, 2006).

Os aminoglicosídeos podem ser utilizados no tratamento, caso a cepa estudada seja sensível nos testes laboratoriais. Porém, os genes que codificam as ESBL são transmitidos por plasmídios, que muitas vezes, estão associados a genes de resistência a outros antimicrobianos, como por exemplo, os aminoglicosídeos, onde a maioria dos microrganismos produtores de ESBL também são resistentes a estas drogas, principalmente à gentamicina (OTEO *et al.*, 2002).

Outra opção utilizada no tratamento de infecções por ESBL seriam as quinolonas. Inicialmente acreditava-se que a resistência a esta classe de antimicrobianos era somente codificada por cromossomos (PATERSON *et al.*, 2000), porém alguns estudos vêm demonstrando que esta resistência também pode estar presente em plasmídio (MARTINEZ-MARTINEZ *et al.*, 1998). As quinolonas ainda são consideradas uma opção terapêutica, principalmente em infecções urinárias, quando os microrganismos causadores da infecção, apresentam sensibilidade a este grupo de antimicrobianos (JASSER, 2006).

A tigeciclina, a mais nova opção terapêutica para estas bactérias multirresistentes, é uma gliciliciclina semi-sintética derivada da minociclina. Embora seu mecanismo de ação seja semelhante às tetraciclinas, por inibição da fração 30S do ribossomo, inibindo a síntese de proteínas bacterianas (CURCIO e ISTÚRIZ, 2006), sua ação não é afetada por nenhum mecanismo de resistência observado na tetraciclina, como por exemplo, a produção de bombas de efluxo e proteção ribossomal. Este antimicrobiano pode ser utilizado contra bactérias gram-negativas refratárias ao tratamento, além disso, bactérias resistentes a outras classes de antimicrobianos, não apresentam resistência cruzada à tigeciclina (CASTANHEIRA *et al.* 2008).

Entre os antimicrobianos acima citados, o grupo de escolha utilizado no tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL são os carbapenêmicos, os quais incluem os fármacos imipenem, meropenem e ertapenem. Os carbapenêmicos possuem ação uniforme contra este tipo de microrganismo, seja *in vitro* ou *in vivo*, e são altamente estáveis à atividade hidrolítica das ESBLs, além

de apresentar ótima penetração através da membrana externa, principalmente devido a seu peso molecular compacto e forma estrutural muito peculiar (BELL *et al.*, 2002).

Apesar de ser a terapia de escolha em infecções ocasionadas por microrganismos produtores de ESBL, o uso de carbapenêmicos deve ser cauteloso, visto que este grupo de antimicrobianos induz fortemente a produção de β -lactamase do tipo AmpC, associados com perda de porina e/ou superprodução de bombas de efluxo; ou ainda pela produção de carbapenemases, enzimas capazes de degradar os carbapenêmicos, reduzindo significativamente as opções terapêuticas contra estes patógenos (CASTANHEIRA *et al.*, 2008).

2.9 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ESBL

Atualmente, no Brasil, a identificação de bactéria produtoras de ESBL segue as metodologias propostas pelo CLSI (*Clinical Laboratory Standards International*), a qual utiliza antimicrobianos como marcadores para detectar a possível presença de ESBL. É importante ressaltar a existência de outros grupos normatizadores por muitos países como o EUCAST (*European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*), e também BSAC, CA-SFM, CRG, DIN, NWGA e SRGA (KAHLMETER, 2008).

2.9.1 Teste de Triagem

O teste de triagem pode ser realizado em conjunto com a rotina do antibiograma, tomando-se cuidado de incluir os antimicrobianos marcadores. Qualquer halo menor ou igual ao descrito pelo CLSI (2008) é indicativo da produção de ESBL. Os antimicrobianos preconizados pelo CLSI (2008) como marcadores para triagem de ESBL são: aztreonam, cefotaxima, ceftazidima, cefpodoxima e ceftriaxona.

É importante salientar que não é recomendado o uso de apenas um dos antibióticos no teste de triagem, pois haveria uma grande diminuição na sensibilidade do teste, devido à diferença da preferência pelos substrato nas enzimas ESBL. No teste de triagem podem ocorrer resultados falso-positivos e por isso é importante a realização de testes confirmatórios, que se baseiam na inibição da enzima pelo ácido clavulânico (NOGUEIRA *et al.*, 2006).

2.9.2 Pontos de Corte Indicativos da Produção de ESBL

Utilizando os métodos de Disco-Difusão, Microdiluição ou E-test®, a diminuição de susceptibilidade a alguns antimicrobianos β -lactâmicos é um indício da produção de ESBL. Segundo o CLSI (2008), amostras que apresentem CIM superior ou igual a 2 $\mu\text{g/mL}$ para ceftazidima, cefpodoxima, aztreonam, cefotaxima ou ceftriaxona, por testes dilucionais, devem consideradas possíveis produtoras de ESBL. Nos testes de disco-difusão, os pontos de corte são halos de inibição inferior ou igual a 22 mm para ceftazidima, inferior ou igual a 17 para cefpodoxima, inferior ou igual 27 para cefotaxima e aztreonam, e inferior ou igual a 25 para ceftriaxona no caso de *E. coli* e *Klebsiella spp* Para *Proteus mirabilis* os pontos de corte são inferior ou igual a 17 para cefpodoxima, cefoxitina, e ceftazidima. Além de sugerir também a realização de um teste confirmatório (CLSI, 2008).

2.9.3 Testes Fenotípicos Confirmatórios

O CLSI recomenda que os microrganismos produtores de ESBL sejam reportados como resistentes a todas as penicilinas, cefalosporinas e aztreonam, mesmo que se mostrem sensíveis a esses antimicrobianos nos testes convencionais. Os padrões do CLSI referem-se especificamente às bactérias *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli*, que são as principais produtoras de ESBL e ao *Proteus mirabilis*, incluído recentemente devido ao aumento da incidência nessa

espécie. No entanto, a enzima ESBL tem sido encontrada em muitas outras espécies de enterobactérias (DRIEUX *et al.*, 2008).

Para os testes fenotípicos confirmatórios, quanto maior o número de substratos utilizados, maior será a sensibilidade do teste, visto que a utilidade de cada substrato vai depender do tipo da enzima que a bactéria possui. Nenhum destes testes é 100% sensível ou específico na detecção de ESBL em isolados clínicos de bactérias gram-negativas (BUSH, 2001).

2.9.3.1 Teste de Dupla Difusão

O teste confirmatório para detecção ESBL foi realizado pela primeira vez por Jarlier em 1988, nomeado por teste de dupla difusão (DD). 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 o ácido clavulânico. A produção de ESBL é indicada por uma deformação, ou aumento nos halos de inibição ao redor dos discos dos β -lactâmicos, também designada por “zona fantasma” (DRIEUX *et al.*, 2008), conforme demonstrado na FIGURA 4.

O teste de DD foi inicialmente utilizado em estudos epidemiológicos para avaliar a propagação de enterobactérias produtoras de ESBL em hospitais franceses (LEGRAND *et al.*, 1989). Este método, confiável para a detecção de ESBL, necessita algumas vezes, do ajuste do espaço entre os discos, sendo importante notar que a redução da distância entre o disco contendo o clavulanato e o disco das cefalosporinas de terceira geração, como por exemplo, a mudança para 20 mm melhora significativamente sensibilidade do ensaio (THOMSON E SANDERS, 1992; TZELEPI *et al.*, 2000).

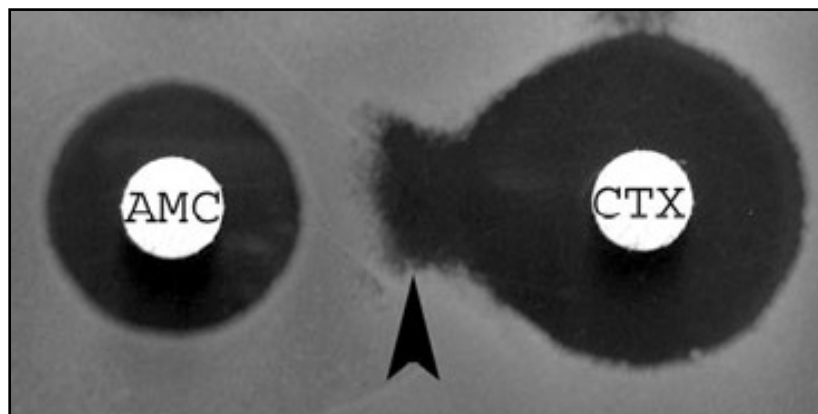


FIGURA 4 - TESTE DE DISCO DIFUSÃO

FONTE - DRIEUX *et al.* (2008)

LEGENDA - CTX: cefotaxima; AMC: ácido clavulânico

NOTA - A seta demonstra o aparecimento do fenômeno conhecido como zona fantasma que caracteriza a produção de ESBL pela cepa bacteriana isolada

2.9.3.2 Teste de Discos Combinados

O método consiste em adicionar inibidores de β -lactamase, como o ácido clavulânico ou sulbactam, a discos de 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 superior ou igual a 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, 2008; CARTER *et al.*, 2000), o resultado deste teste está demonstrado na FIGURA 5.

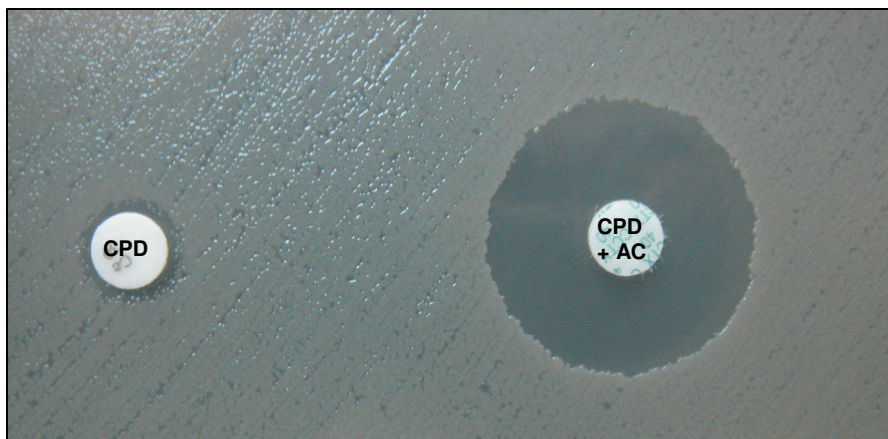


FIGURA 5 – TESTE DE DISCOS COMBINADOS

FONTE – O autor (2008)

LEGENDA – CPD: Cefpodoxima (cefalosporina de terceira geração); AC: ácido clavulânico

2.9.3.3 E-test ®

O método utiliza uma fita plástica que contém concentrações crescentes do agente antimicrobiano em estudo depositado em uma placa de Mueller Hinton semeada com o inóculo bacteriano padronizado com a escala 0,5 de MacFarland. Neste caso, em um dos lados da fita existe a cefalosporina, e do outro a cefalosporina associada a uma concentração fixa de 2 mg/mL de ácido clavulânico. A bactéria será considerada produtora de ESBL quando a leitura apresentar uma diminuição de pelo menos duas diluições logarítmicas ou quando a razão entre os dois *breakpoints* for igual ou maior a 8 mm, da cefalosporina/ácido clavulânico em relação ao CIM da cefalosporina isolada. O método se baseia no aumento da sensibilidade em presença do ácido clavulânico, como recomenda o CLSI para testes confirmatórios de presença de ESBL (DRIEUX *et al.*, 2008). A figura abaixo mostra o resultado do E-test ®.

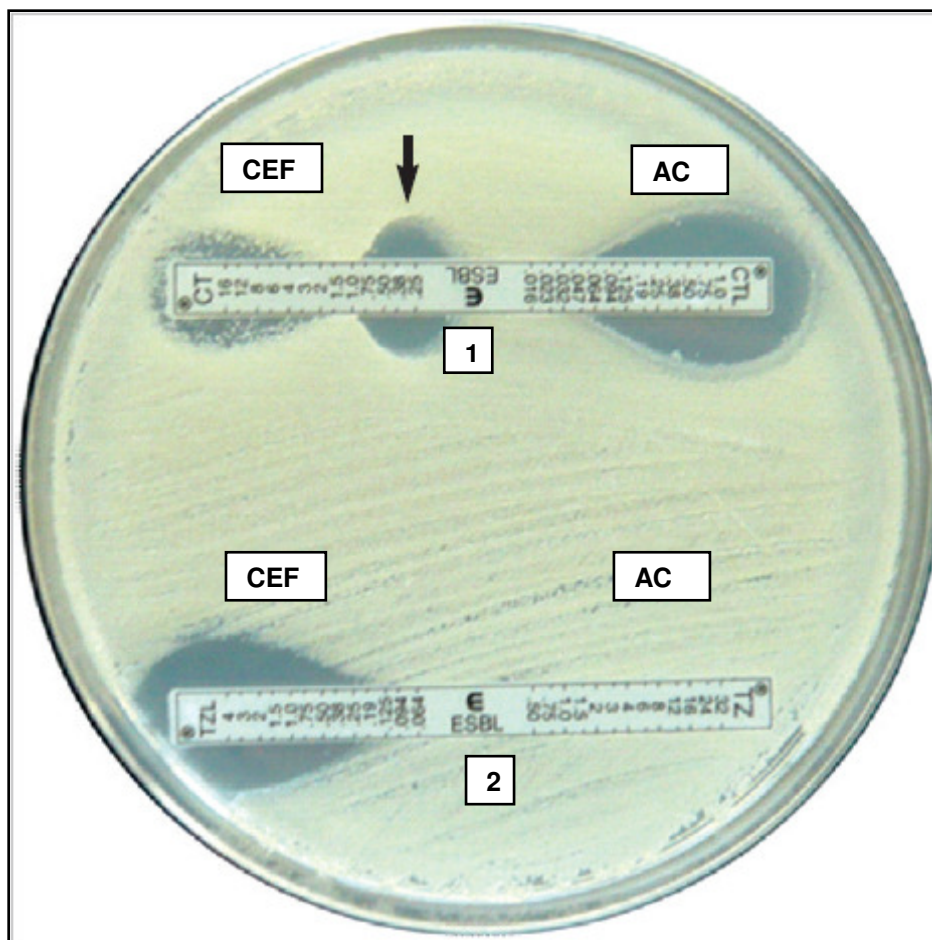


FIGURA 6 – DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESBL PELO MÉTODO DE TIRAS DE E-TEST®
FONTE - Harada *et al.* (2008)

NOTA: Fita 1: teste positivo para a presença de ESBL, onde é observada a presença da zona fantasma entre a extremidade contendo a cefalosporina (CEF) e a extremidade que contém o ácido clavulânico (AC). Fita 2: teste negativo para ESBL.

O teste é fácil de ser realizado e sua interpretação é simples. A sensibilidade e especificidade para este método foi primeiramente relatada em 96% e 100%, respectivamente. Devido, principalmente ao seu elevado custo, este teste se tornou praticamente inviável para uso em laboratório de rotina (LINSOTT *et al.*, 2005).

2.9.3.4 Métodos Automatizados

Existem ainda os métodos automatizados para identificação bacteriana, nos quais está incluída a detecção da produção de ESBL. O equipamento Phoenix (Becton-Dickinson Biosciences, Sparks, MD) utiliza um *software* para interpretar o crescimento bacteriano em resposta à ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona e cefpodoxima, com ou sem o clavulanato. O equipamento Vitek 2 (BioMérieux, Marcy L'Etoile, France) utiliza um cartão contendo ceftazidima e cefotaxima sozinhos e em combinação com clavulanato. Ceftazidima ou a cefotaxima com inibidores de β -lactamase são muitas vezes usados no MicroScan Walkaway-96 (Dade Behring, Inc., West Sacramento, CA). Os três sistemas automatizados foram recentemente comparados com o teste fenotípico confirmatório convencional em relação à habilidade em detectar a produção de ESBL. O sistema de maior sensibilidade foi Phoenix (99%), seguido pelo Vitek 2 (86%) e MicroScan (84%). No entanto, a especificidade foi mais variável, oscilando de 52% (Phoenix) a 70% (Vitek 2) (BONOMO *et al.*, 2007).

2.9.3.5 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 das β -lactamases (THOMSON e SANDERS, 1992).

2.9.4 Métodos de Determinação Molecular

Os testes já citados para detecção de ESBL se baseiam na detecção da presença da enzima através de suas características fenotípicas. Contudo, outros mecanismos de resistência aos β -lactâmicos, incluindo enzimas AmpC, alteração de porinas, hiperprodução de K1, podem estar presentes isoladamente ou em conjunto com as ESBL, interferindo no resultado destes testes (PITOUT *et al.*, 2008).

Há casos em que as enzimas conferem baixa resistência e não são detectadas por testes fenotípicos. Nestes casos, o ideal é utilizar técnicas que identificam especificamente as enzimas responsáveis ou os genes responsáveis pela produção da enzima (BRADFORD, 2001).

As técnicas moleculares também são importantes epidemiologicamente, para se determinar qual enzima é mais prevalente em determinada região. Além disso, há casos em que um mesmo isolado clínico expressa múltiplas enzimas, sendo necessário a utilização de técnicas moleculares para detectar quais enzimas estão presentes (PITOUT *et al.*, 2008).

Os testes mais específicos para pesquisa de ESBL incluem as técnicas que detectam os genes responsáveis pela produção da enzima, como o método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), bem como técnicas para detecção direta da enzima através da Eletroforese de Ponto Isoelétrico (PI) (BRADFORD, 2001).

O método molecular mais simples e mais utilizado para detectar as enzimas é a PCR, usando iniciadores específicos para os genes de β -lactamases. Esses iniciadores são escolhidos de forma a se anelar com regiões 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 seqüenciamento têm sido sugeridos, por exemplo: PCR-RFLP (*Restriction Fragment Leng Polymorphism*) e PCR-SSCP (*Single-Strand Conformational Polymorphism*). Porém, o método padrão continua sendo o seqüenciamento da cadeia específica dos nucleotídeos dos genes das β -lactamases (BRADFORD, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Foram analisadas um total de 160 amostras de *E. coli* (32), *K. oxytoca* (06) e *K. pneumoniae* (122), produtoras de ESBL do tipo TEM, SHV e/ou CTX-M previamente caracterizadas por PCR. Os isolados foram obtidos de urina, sangue, líquido, líquido peritoneal, abscessos e aspirado traqueal, de pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná no período de janeiro de 2006 a maio de 2008.

Em todas as amostras foi realizada uma primeira identificação utilizando o sistema Vitek®, realizado testes de triagem para detecção de ESBL, durante a rotina do laboratório e, após a confirmação da presença de ESBL, estas amostras foram criopreservadas em BHI (Infusão Cérebro Coração), contendo 15% (v/v) de glicerol, acondicionadas a - 80°C até a realização dos testes posteriores (JANIS, 1994).

Os isolados foram identificados com o número seqüencial desvinculado do protocolo do laboratório, não sendo possível a identificação do paciente. Foi relacionado ainda o tipo de amostra clínica na qual o microrganismo foi isolado e a origem (unidades de internação para pacientes hospitalizados ou emergência).

Todas as amostras foram submetidas à confirmação da identificação do gênero e espécie por provas bioquímicas clássicas, tais como, triptofano, glicose, produção de gás, produção de gás sulfídrico, utilização de aminoácidos como ornitina e lisina, fermentação de açúcares como glicose, ramnose e celubiose, crescimento em citrato, prova do indol, entre outros, seguindo literatura padronizada (O'HARA, 2005).

3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENES DE RESISTÊNCIA

A detecção dos genes de resistência nas bactérias produtoras de ESBL foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), conforme descrito no a

seguir. Os genes codificadores das enzimas de ESBL pesquisados neste trabalho foram *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram baseados nas regiões conservadas de cada gene, seguindo-se a seqüência consenso, estão inseridos na TABELA 1.

TABELA 1 – INICIALIZADORES UTILIZADOS NA PCR

Genes	Seqüência	Referência
TEM	F- 5' ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG 3' R- 5' CCA ATG CTT AAT TCA GTG ACG 3'	-
SHV	F- 5' TCA GCG AAA AAC ACC TTG 3' R- 5' TCC CGC AGA TAA ATC ACC A 3'	-
CTX-M grupo 1	F- 5' AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC 3' R- 5' AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT 3'	WOODFORD <i>et al.</i> , 2006
CTX-M grupo 2	F- 5' CGACGCTAC CCCTGC TAT T 3' R- 5' CCAGCGTCAGAT TTT TCA GG 3'	WOODFORD <i>et al.</i> , 2006
CTX-M grupo 9	F- 5' CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG 3' R- 5' ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC 3'	WOODFORD <i>et al.</i> , 2006
CTX-M grupo 8	F- 5' TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC 3' R- 5' AAC CCA CGA TGT GGG TAG C 3'	WOODFORD <i>et al.</i> , 2006
CTX-M grupo 25	F- 5' GCA CGA TGA CAT TCG GG 3' R- 5' AAC CCA CGA TGT GGG TAG C 3'	WOODFORD <i>et al.</i> , 2006

LEGENDA – F: “forward”; R: “reverse”

3.2.1 Preparo do DNA alvo

- No setor de Bacteriologia, subcultivar os microrganismos a serem pesquisados em ágar não seletivo por uma noite a 35°C

- Numerar tubos Eppendorf de 1,5 mL
- Distribuir 500 µL de água Milli-Q estéril
- Preparar uma suspensão densa
- Com as tampas fechadas, levar as suspensões para a sala 2
- Ferver por 15 minutos
- Centrifugar por 10 minutos em microcentrífuga a 3000 rpm
- Remover uma alíquota do sobrenadante (que contém o DNA) e estocar a temperatura de 4 °C até o momento do uso
- Usar uma alíquota de 2 µL em cada reação de PCR

3.2.2 Preparo da “PCR-master mix”

O volume total da reação de PCR utilizada foi de 25 µL. Esta mistura é realizada na Sala 1.

- Retirar os tubos com as soluções de dNTPs, MgCl₂ e “primer mix” do freezer a -20 °C, aguardar o descongelamento, mantendo as soluções em banho de gelo.
- Numerar os tubos de reação a serem testados, um controle positivo, um controle negativo e um tubo branco (que tem todos os reagentes exceto do DNA alvo).
- Prepare a PCR-Master Mix em tubo Eppendorf adicionando os reagentes na ordem descrita na tabela abaixo.

TABELA 2 – QUANTIDADES DE REAGENTES PARA A PCR

Volume Final	100 µL	200 µL	300 µL	600 µL	1000 µL
N° reações	4	8	12	24	40
Água Milli-Q estéril	75	150	225	450	750
Tampão da Taq DNA pol 10X	10	20	30	60	100
MgCl ₂ (50mM)	4	8	12	24	40
dATPs (10mM)	2,5	5	7,5	15	25
dGTPs (10mM)	2,5	5	7,5	15	25
dCTPs (10mM)	2,5	5	7,5	15	25
dTTPs (10mM)	2,5	5	7,5	15	25
Primer mix	4	8	12	24	40
Taq DNA pol	0,5	1	1,5	3	5

- Adicionar 2 μL da amostra (DNA alvo armazenado a 4 °C)
- Homogeneizar em vortex e pulse em microcentrífuga
- Fechar bem os tubos, e levar para a Sala 3
- Ligar o termociclador e conferir programa desejado
- Transferir os tubos para o termociclador, fechar, programar e ligar o equipamento

3.2.3 Análise dos produtos

- Preparar o gel de agarose a 2% em tampão TBE a 0,5X
- Remover uma alíquota de 4 μL de cada produto da PCR
- Misturar 4 μL de “Stop mix” (50 mM EDTA pH 8, 25% Ficoll, 0,25% azul de bromofenol) a cada amostra, sobre um pedaço de parafilme
- Carregar o gel de agarose com 5 μL de cada amostra
- Incluir 4 μL de marcador de PM linear
- Proceder a eletroforese aproximadamente por 1 a 1,5 horas
- Corar o gel em brometo de etídio e, em seguida, visualizar a reação em câmara de U.V.

3.3 TESTES FENOTÍPICOS DE TRIAGEM

Para a realização dos testes de detecção dos mecanismos de resistência, os inóculos bacterianos de cada isolado clínico foram preparados por suspensão direta, em soro fisiológico (NaCl 0,9%), a partir de colônias isoladas em placa de ágar não seletivo com 18 a 24 horas de crescimento. A turvação da suspensão foi ajustada para a escala 0,5 de McFarland, que contém aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, utilizando-se um densitômetro, com comprimento de onda de 625 nm. Foram utilizadas placas de Petri descartáveis medindo 150 x 15 mm contendo uma camada de 3 a 4 mm de ágar Mueller Hinton (Oxoid - Basingstoke, United Kingdom), preparadas seguindo as instruções do fabricante. Após a inoculação da

suspensão em ágar Mueller Hinton, os discos de antimicrobianos foram colocados em cada placa e incubados a 37°C por 18 a 24 horas.

As amostras suspeitas de produção de ESBL, de acordo com CLSI, 2008, foram aquelas que apresentaram ponte de corte do halo de inibição de ≤ 17 mm para cefpodoxima (Himédia ®, Mumbai, Índia), ≤ 22 mm para ceftazidima (Himédia ®, Mumbai, Índia), ≤ 25 mm para ceftriaxona (Newprov, Pinhais, Brasil), ≤ 27 mm para cefotaxima (Himédia ®, Mumbai, Índia) e ≤ 27 mm para aztreonam (Newprov, Pinhais, Brasil).

Além do método de difusão em ágar, conforme acima descrito, o método de triagem também pode ser realizado por determinação da concentração inibitória mínima. O CLSI (2008) determina que as amostras suspeitas da produção de ESBL apresentam CIM ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ para ceftazidima, cefepime, cefotaxima e aztreonam.

Após os testes de triagem as amostras foram encaminhadas para a realização dos testes fenotípicos confirmatórios.

3.4 TESTES FENOTÍPICOS CONFIRMATÓRIOS

Para realização dos testes fenotípicos confirmatórios de dupla difusão e de discos combinados, os inóculos bacterianos de cada isolado clínico foram preparados de acordo com o teste fenotípico de triagem, e em seguida, depositados os discos de acordo com as técnicas descritas a seguir.

3.4.1 Teste de Dupla Difusão

Nas placas contendo Mueller Hinton foram adicionados os discos de cefepime (30 μg) (Newprov, Pinhais, Brasil), ceftriaxona (30 μg) (Newprov, Pinhais, Brasil), ceftazidima (30 μg) (Himédia ®, Mumbai, Índia) e aztreonam (30 μg) (Newprov, Pinhais, Brasil) a 20 mm de um disco de amoxicilina / ácido clavulânico (10 μg) (Newprov, Pinhais, Brasil) e incubados a 35° \pm 1 °C por 18 a 24 horas.

O sinergismo entre a cefalosporina e o inibidor da β -lactamase foi testado utilizando-se um disco de amoxicilina / ácido clavulânico frente aos substratos avaliados e o critério de interpretação foi a observação da formação de um alargamento do halo, ou presença de uma “zona fantasma”, entre os discos das cefalosporinas e do ácido clavulânico, que indica a produção de ESBL (CLSI 2008; DRIEUX *et al.*, 2008).

3.4.2 Teste de Discos Combinados

Na prova de discos combinados (DC) foram utilizados discos contendo ceftazidima (30 μ g) (Himédia ®, Mumbai, Índia), cefpodoxima (30 μ g) (Himédia ®, Mumbai, Índia), cefotaxima (30 μ g) (Himédia ®, Mumbai, Índia), ceftazidima + ácido clavulânico (30 μ g / 10 μ g) (Himédia ®, Mumbai, Índia), cefpodoxima + ácido clavulânico (30 μ g / 10 μ g) (Himédia ®, Mumbai, Índia) e cefotaxima + ácido clavulânico (30 μ g / 10 μ g) (Himédia ®, Mumbai, Índia). As placas foram incubadas a 35° \pm 1 °C por 18 a 24 horas. O teste indica a presença de ESBL quando há aumento igual ou superior a 5 mm comparando os discos das cefalosporinas de terceira geração com e sem o ácido clavulânico, inseridos na mesma placa.

Para as amostras que apresentaram resultados inconclusivos, também foi realizado o teste de DC com discos de cefpodoxima + ácido clavulânico (30 μ g/10 μ g) da marca BIORAD ® (Marnes-La-Coquette, França).

3.5 TESTE FENOTÍPICO PARA DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE AmpC

Foram adicionados discos de imipenem (30 μ g) (Newprov, Pinhais, Brasil) e ceftazidima (30 μ g) (Himédia ®, Mumbai, Índia) a uma distância de 2 cm, e do mesmo modo disco de cefoxitina a 2 cm de discos de ceftriaxona (30 μ g) (Newprov, Pinhais, Brasil), em placas de Petri, incubadas a 35° \pm 1 °C por 18 a 24 horas.

De acordo com o CLSI 2008, a produção de AmpC é indicada quando há um achatamento do halo entre os discos de cefalosporina.

3.6 TESTE FENOTÍPICO PARA DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE KPC

3.6.1 Teste de Triagem para KPC

Discos de imipenem (30 μ g) (Newprov, Pinhais, Brasil) e ertapenem (Merck Sharp & Dohme, Clermont, França) foram adicionados ao ágar de Mueller Hinton, incubados a 35° \pm 1 °C por 18 a 24 horas. De acordo com o CLSI (2008) as amostras suspeitas da produção de KPC são aquelas que produzem no teste de difusão em ágar, halos de inibição \leq 17 mm e/ou concentração inibitória mínima (CIM) \geq 2 μ g/mL.

3.6.2 Teste Fenotípico Confirmatório - Teste de Hodge

Para as amostras nas quais o teste de triagem foi positivo para produção de KPC, também foi realizado o teste de Hodge. Uma suspensão direta de *E. coli* ATCC 25922 foi preparada em soro fisiológico (NaCl 0,9%), a partir de colônias isoladas em placa de ágar não seletivo, ajustada para a escala 0,5 de McFarland, que contém aproximadamente 1,5 X 10⁸ UFC/mL, desta suspensão foi realizada uma diluição 1:10 em soro fisiológico. Em seguida com auxílio de um swab esta diluição foi inoculada na superfície de uma placa de ágar Mueller Hinton, no centro da placa foi adicionado um disco de imipenem. Ao redor deste disco foram feitas estrias estreitas com as amostras a serem testadas e incubadas a 37°C por 18 a 24 horas.

O teste de Hodge foi considerado positivo quando houve um alargamento da área de crescimento bacteriano na inserção com o limite externo do halo de inibição, como descrito no Consenso em Detecção de Resistência Bacteriana (2008).

3.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A Concentração Inibitória Mínima (CIM), menor concentração de um antimicrobiano capaz de impedir o crescimento visível de um microrganismo, foi determinada pelo método de diluição em ágar. O procedimento foi realizado segundo normas do CLSI 2008, submetendo-se um inóculo bacteriano de concentração padronizada a concentrações crescentes de antimicrobiano.

Foram utilizados Mueller Hinton (Oxoid - Basingstoke, United Kingdom) como meio de cultura adicionado com ertapenem (Sigma Chemical CO - Louis, USA), meropenem (Sigma Chemical CO - Louis, USA), imipenem (Sigma Chemical CO - Louis, USA), ceftazidima (Sigma Chemical CO - Louis, USA), cefepime (Sigma Chemical CO - Louis, USA), cefotaxima (Sigma Chemical CO - Louis, USA) e aztreonam (Sigma Chemical CO - Louis, USA). Para a tigeciclina (Sigma Chemical CO - Louis, USA) foi utilizado Mueller Hinton da marca Difco (Sparks, USA).

Após 18 a 24 horas de incubação em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, verificou-se o crescimento do microrganismo. O controle de qualidade do método foi realizado utilizando-se as cepas referência de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 700603 e *E. coli* ATCC 25922.

3.7.1 Procedimentos para Realização da Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Foi realizado teste de suscetibilidade por diluição em ágar, para determinação da concentração inibitória mínima das amostras de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, frente aos seguintes antimicrobianos: ertapenem, meropenem, imipenem, ceftazidima, cefepime, cefotaxima, aztreonam e tigeciclina, pelo método da Microdiluição em caldo (CLSI, 2008, M100 S-18).

3.7.1.1 Preparo das Soluções de Antibióticos

A concentração da solução-estoque foi calculada a partir da maior concentração testada para cada antimicrobiano, do volume de ágar Mueller Hinton utilizado nas placas e do volume final da solução-estoque (TABELA 3). A quantidade em mg do antimicrobiano necessária para preparar as soluções foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Vol. do Solvente (mL)} \times \text{Conc. da Solução Estoque } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potência do antibiótico } (\mu\text{g/mL})}$$

TABELA 3 – SOLUÇÕES ESTOQUE DE ANTIMICROBIANOS

Agente antimicrobiano	Forma /Lote	Concentração da SE($\mu\text{g/mL}$)	Concentração I _o ($\mu\text{g/mL}$) no MHA	Potencia do ATB	Solvente utilizado
Cefotaxima	Sal	12.800	256	1000	Água
Ceftazidima	Sal	6.400	128	894	Água
Aztreonam	Sal	3.200	128	1000	Água
Cefepime	Med	6.400	128	-	Água
Imipenem	Med	3.200	64	-	Água
Meropenem	Med	3.200	64	-	Água
Ertapenem	Med	1.600	32	-	Água
Tigeciclina	Med	1.600	32	-	Água

LEGENDA – Med: medicamento; SE: solução estoque; MHA: ágar Mueller Hinton; ATB: antimicrobiano

As soluções de antimicrobianos foram esterilizadas por membrana filtrante de 0,22 μm de diâmetro (Millipore®), divididas em alíquotas e estocadas a – 70°C.

Foram realizadas diluições seriadas a partir da solução-estoque com água ultrapura estéril (tipo Milli Q). Diluiu-se a solução-estoque até a maior concentração a

ser testada, e as concentrações seguintes foram obtidas com diluições seriadas 1:2 até alcançar a menor concentração desejada (TABELA 4).

TABELA 4 - DILUIÇÕES UTILIZADAS PARA AMOSTRAS TESTE

ATB/ [] µg/mL	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Cefotaxima	256	128	64	32	16	8	4	2
Ceftazidima	128	64	32	16	8	4	2	1
Aztreonam	128	64	32	16	8	4	2	1
Cefepime	128	64	32	16	8	4	2	1
Imipenem	64	32	16	8	4	2	1	0,5
Meropenem	64	32	16	8	4	2	1	0,5
Ertapenem	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Tigeciclina	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25

3.7.1.2. Controle de Qualidade

Conforme recomendação do CLSI (2008) foi testada a cepa-padrão de *E. coli* ATCC 25922, e realizadas diluições mostradas na Tabela 5.

TABELA 5 - DILUIÇÕES PARA ATCC *E.coli* 25922

ATB/ [] µg/mL	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
Cefotaxima	0,12	0,06	0,03	-	-	-	-	-
Ceftazidima	0,5	0,25	0,12	0,06	-	-	-	-
Aztreonam	0,25	0,12	0,06	-	-	-	-	-
Cefepime	0,12	0,06	0,03	0,016	-	-	-	-
Imipenem	0,25	0,125	0,06	-	-	-	-	-
Meropenem	0,25	0,125	0,06	-	-	-	-	-
Ertapenem	0,25	0,125	0,06	0,03	-	-	-	-
Tigeciclina	0,25	0,125	0,06	0,03	-	-	-	-

3.7.1.3. Procedimento para Preparação das Placas de Ágar Mueller Hinton Contendo os Antimicrobianos para Determinação da CIM

O ágar Mueller-Hinton foi preparado conforme instruções do fabricante. Foram distribuídas alíquotas em frascos de vidro, com tampas de rosca estéreis. O volume distribuído em cada frasco foi de 49 mL de meio de cultura, medido em proveta. Após resfriar em banho-maria até aproximadamente 55 °C, foi adicionado 1 mL da solução diluída do antimicrobiano, totalizando 50 mL, volume necessário para atingir a espessura preconizada de 4 a 5 mm do ágar em placas de 150 mm de diâmetro. Após a homogeneização, o meio foi distribuído em placas descartáveis estéreis.

Para ertapenem, meropenem, imipenem, ceftazidima, cefepime, cefotaxima e aztreonam foi utilizado o ágar Mueller Hinton da marca Oxoid (Basingstoke, United Kingdom), e para tigeciclina foi necessário a utilização da marca Difco (Sparks, USA), para que a estabilidade do antimicrobiano não fosse afetada.

3.7.1.4 Procedimento para Inoculação dos Isolados Bacterianos

As amostras bacterianas foram inoculadas em ágar nutriente por 24 horas (um dia antes da realização do CIM). A concentração do inóculo bacteriano foi ajustado na escala 0,5 de McFarland, em NaCl 0,9% estéril, utilizando turbidímetro.

Na seqüência, realizou-se a diluição do inóculo até atingir a concentração final recomendada por “spot” de 5-8 mm (10^4 UFC/mL). Para obter esta concentração, o inóculo inicial foi diluído 1:10 em solução NaCl 0,9% estéril, obtendo a concentração de 10^7 UFC/mL. Após a inoculação no ágar Mueller Hinton, os “spots” atingiram a concentração de aproximadamente 10^4 UFC/mL, pois os inoculadores depositam entre 1-2 μ L da amostra sobre a superfície do ágar.

Foram distribuídas alíquotas de 100 μ L do inóculo diluído em placas tipo ELISA de 96 poços com fundo em “U”. Um multiinoculador (ou replicador) de Steer com 96 pinos foi utilizado para a inoculação simultânea das amostras alíquotadas na

placa. As amostras foram inoculadas inicialmente em uma placa controle sem antimicrobiano, conforme FIGURA 7.

As placas foram inoculadas partindo da placa de menor para a de maior concentração do antimicrobiano. No final, foi inoculada outra placa controle sem antimicrobiano, para avaliar a eventual contaminação e o carreamento de antimicrobianos durante o procedimento. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos para secagem. Após este período as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas.

A concentração inibitória mínima foi determinada como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento bacteriano visível.

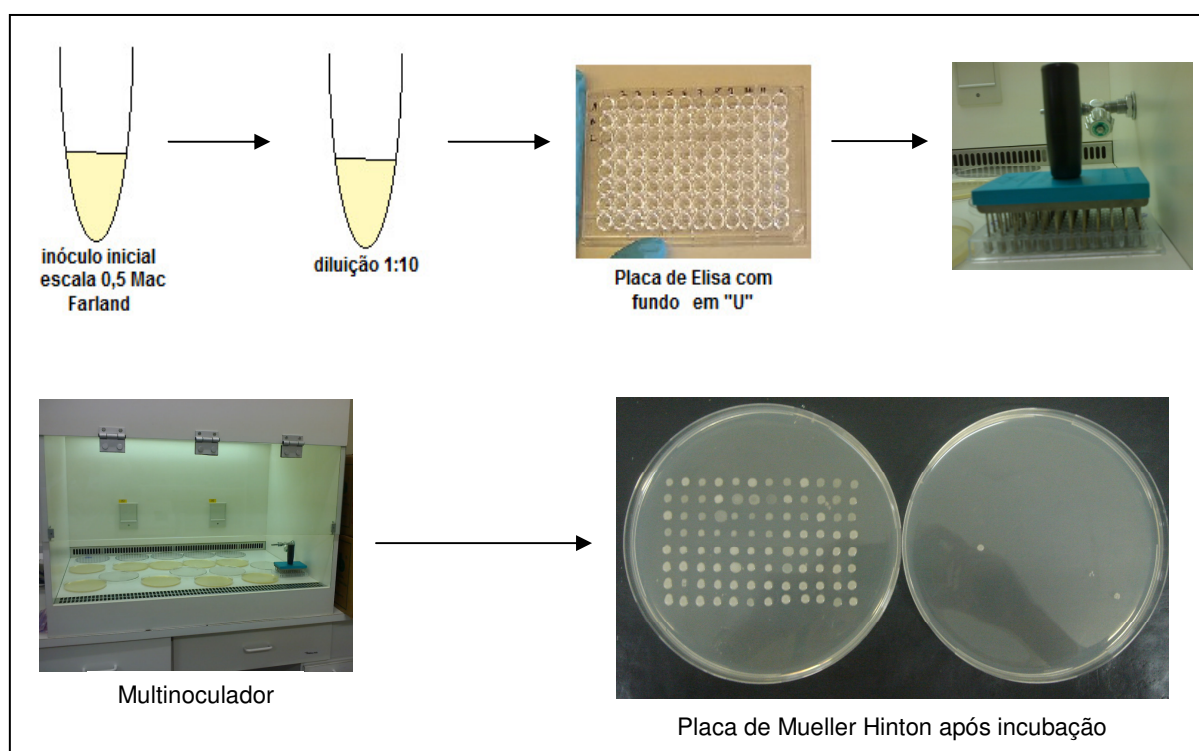


FIGURA 7 – ESQUEMA SIMPLIFICADO PARA REALIZAÇÃO DA CIM

FONTE – O autor, 2008

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS GENES DE RESISTÊNCIA

Os produtos amplificados das amostras para os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e/ou *bla*_{CTX-M} estão representados nas figuras abaixo.

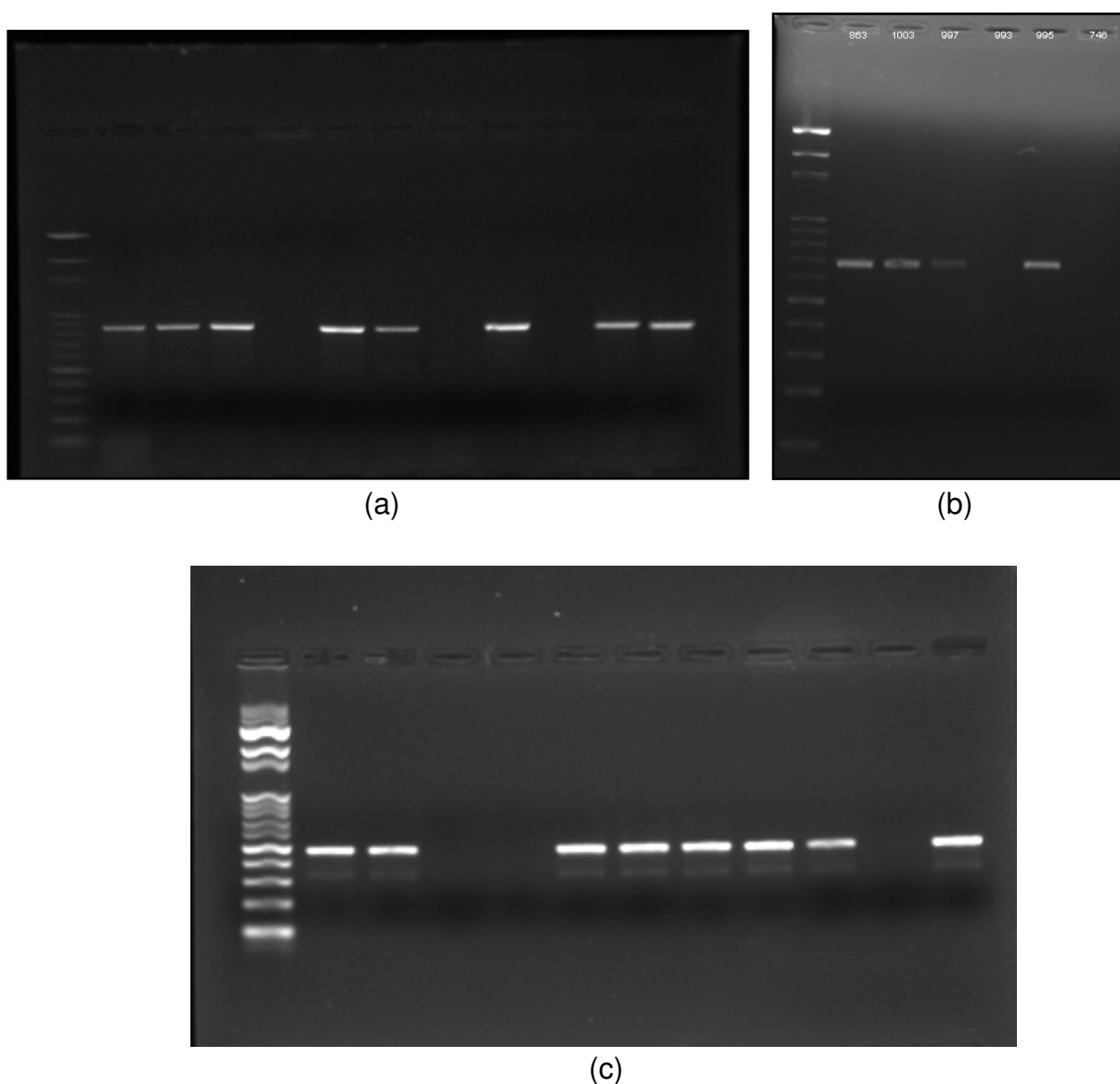


FIGURA 8 – RESULTADO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS DAS PCR

NOTA – (a) representa o gene *bla*_{TEM}; (b) representa o gene *bla*_{CTX-M}; (c) representa o gene *bla*_{SHV}

FONTE - O autor (2008)

4.2 TESTES FENOTÍPICOS DE TRIAGEM

A diminuição dos halos de inibição foi observada nos testes de triagem em todas as amostras estudadas, mostrando diferenças entre cada substrato. A FIGURA 9 representa o método de triagem para detecção de ESBL nas amostras analisadas.

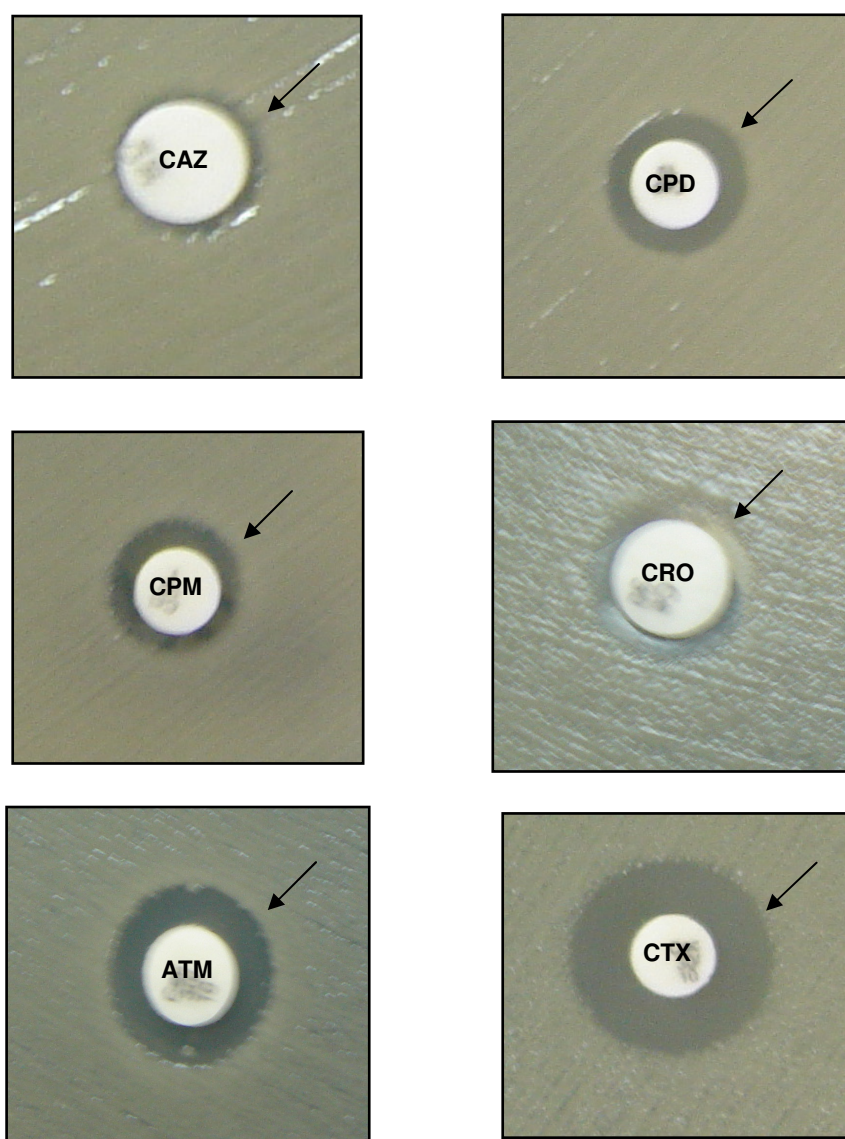


FIGURA 9 – TESTE DE TRIAGEM

NOTA – as setas mostram os halos de inibição diminuídos aos antimicrobianos no teste de triagem

LEGENDA – CAZ: ceftazidima; CPD: cefpodoxima; CPM: cefepime; CTX: ceftazidima; ATM: aztreonam; CRO: ceftriaxona.

FONTE – O autor (2008)

Das 160 amostras incluídas no estudo, 159 (99,4%) apresentaram sensibilidade diminuída à cefpodoxima, 156 (97,5%) cefotaxima, 153 (95,6%) ceftazidima, 153 (95,6%) ao aztreonam, 150 (93,8%) ceftriaxona e 131 (81,9%) cefepime, sendo estas amostras possíveis produtoras de ESBL, como observado no GRÁFICO 1.

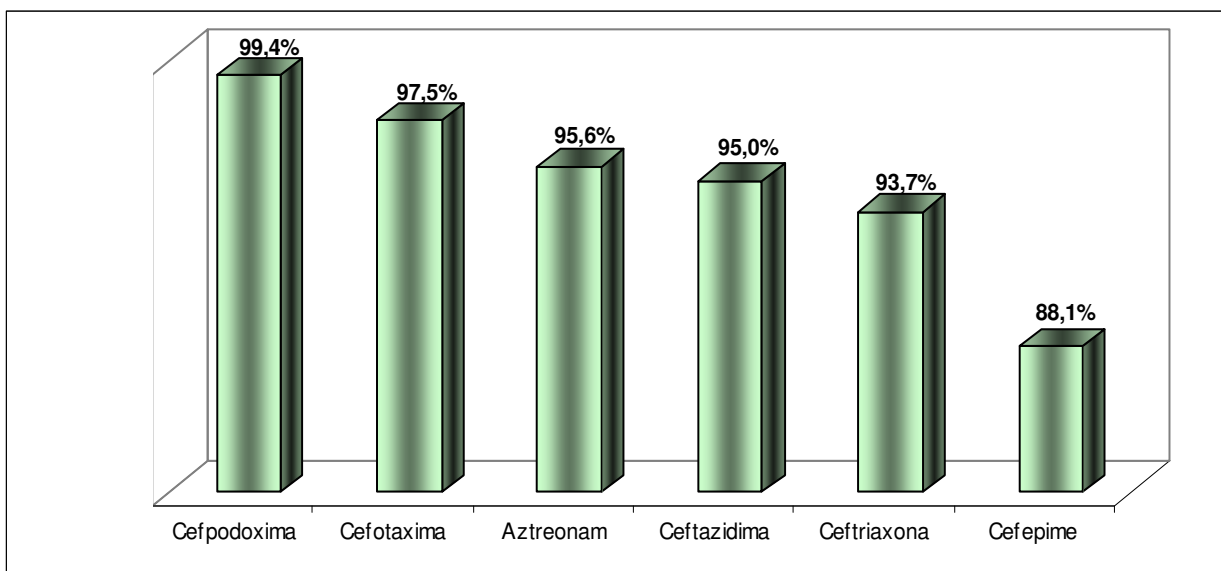


GRÁFICO 1 - TESTE DE TRIAGEM PARA DETECÇÃO DE ESBL NO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Através da determinação da CIM, 149 (93,1%) das amostras apresentaram sensibilidade diminuída a ceftazidima, 134 (83,8%) a cefepime, 155 (96,9%) a aztreonam e 155 (96,9%) a cefotaxima.

O GRÁFICO 2 mostra o resultado de triagem em relação a cada espécie testada. Para *K. oxytoca* cefpodoxima, cefotaxima, aztreonam, ceftriaxona e cefepime apresentaram 100% dos antimicrobianos com sensibilidade diminuída, e a ceftazidima apresentou 83% de resistência. *E. coli* apresentou sensibilidade diminuída para cefpodoxima 32 (100%) seguido de cefotaxima e ceftazidima, ambas 30 (93,8%), ceftriaxona 28 (87,5%), aztreonam 27 (84,4%) e cefepime 25 (78,1%). *K. pneumoniae* apresentou sensibilidade diminuída para cefpodoxima 121 (99,2%), cefotaxima e aztreonam 120 (98,4%), ceftazidima 117 (95,9%), ceftriaxona 116 (95,1%) e cefepime 110 (90,2%).

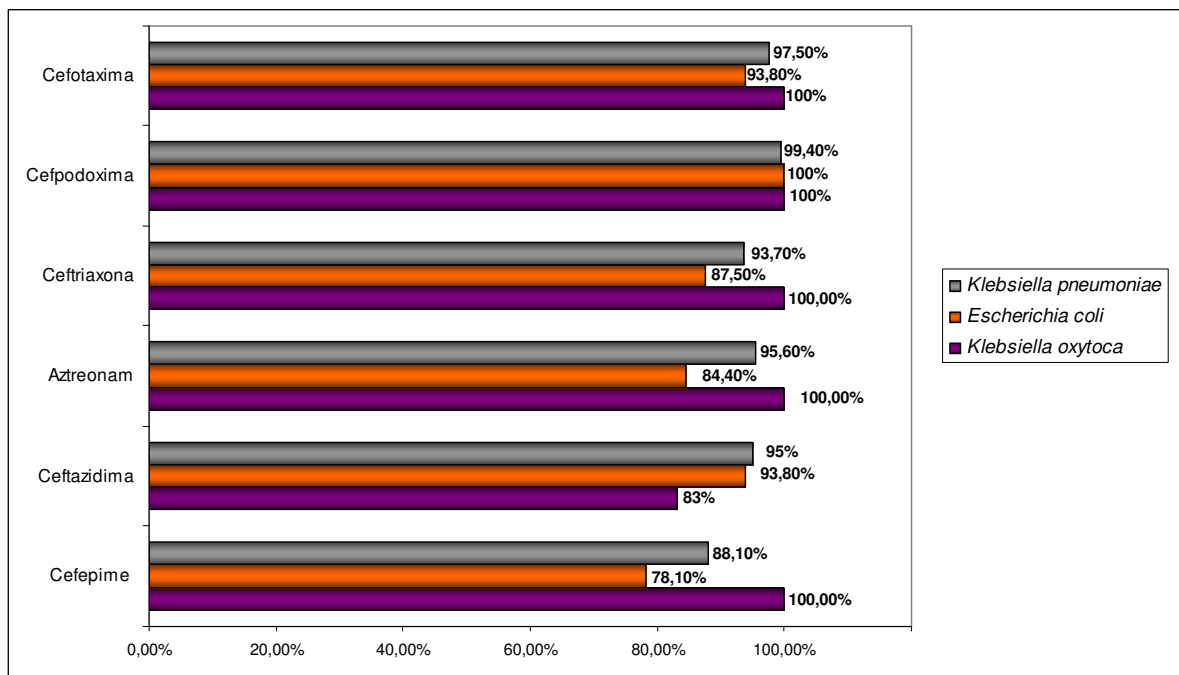


GRÁFICO 2 – PORCENTAGEM DO TESTE DE TRIAGEM PARA DETECÇÃO DE ESBL POR ESPÉCIE ESTUDADA

4.3 TESTES FENOTÍPICOS CONFIRMATÓRIOS

No teste de dupla difusão, a formação da zona fantasma e/ou o alargamento do halo de inibição, conforme demonstrado na FIGURA 10, também evidencia a presença de ESBL.

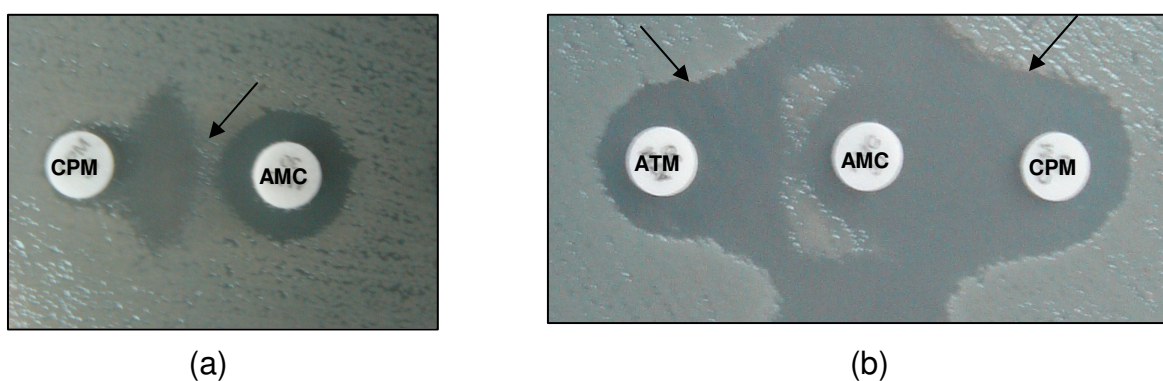


FIGURA 10 – TESTE DE DUPLA DIFUSÃO

NOTA – (a) formação de uma zona fantasma; (b) alargamento do halo de inibição.

LEGENDA – AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; ATM: aztreonam; CPM: cefepime.

No teste de dupla difusão o substrato que obteve maior positividade na detecção de ESBL foi a ceftriaxona (92,5%), seguido pelo cefepime (91,3%), aztreonam (89,4%) e ceftazidima (80,6%). A TABELA 6 apresenta a positividade do DD por espécie analisada.

TABELA 6 - POSITIVIDADE DO TESTE DE DUPLA DIFUSÃO

Espécie	Amostras positivas para ESBL			
	CPM/AMC	ATM/AMC	CA/AMC	CRO/AMC
<i>K. oxytoca</i> (n=6)	5 (83,3%)	6 (100,0%)	6 (100,0%)	5 (83,3%)
<i>E. coli</i> (n=32)	30 (93,8%)	25 (78,1%)	22 (68,8%)	28 (87,5%)
<i>K. pneumoniae</i> (n=122)	111 (90,9%)	112 (91,8%)	101 (82,8%)	116 (94,3%)
Total (n=160)	146 (91,3%)	143 (89,4%)	129 (80,6%)	149 (93,0%)

LEGENDA - CPM/AMC: cefepime – ácido clavulânico; ATM/AMC: aztreonam – ácido clavulânico; CA/AMC: ceftazidima – ácido clavulânico; CRO/AMC: ceftriaxona – ácido clavulânico.

Em 6 (3,8%) amostras analisadas, o teste de DD não detectou a presença de ESBL, e a maior positividade alcançada foi de 92,5%, quando utilizado aztreonam-ácido clavulânico + ceftriaxona-ácido clavulânico, e de 96,3% quando utilizado os quatro substratos. Os dados referentes ao teste de DD, quando avaliados em conjunto, estão inseridos na tabela abaixo.

TABELA 7 – AVALIAÇÃO DA POSITIVIDADE DO TESTE DE DUPLA DIFUSÃO

	CPM/AMC+ ATM/AMC	CPM/AMC+ CA/AMC	CPM/AMC+ CRO/AMC	ATM/AMC+ CA/AMC	ATM/AMC+ CRO/AMC	CA/AMC+ CRO/AMC	CPM/AMC+ ATM/AMC+ CA/AMC+ CRO/AMC
<i>K. oxytoca</i> (n=7)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)
<i>E. coli</i> (n=39)	30 (93,8%)	30 (93,8%)	30 (93,8%)	25 (78,1%)	30 (93,8%)	30 (93,8%)	30 (93,8%)
<i>K. pneumoniae</i> (n=124)	114 (93,4%)	114 (93,4%)	116 (95,1%)	114 (93,4%)	117 (95,9%)	116 (95,1%)	118 (96,7%)
Total (n=170)	150 (93,8%)	150 (93,8%)	152 (95%)	145 (90,6%)	153 (95,6%)	152 (95%)	154 (96,3%)

LEGENDA - CPM/AMC: cefepime – ácido clavulânico; ATM/AMC: aztreonam – ácido clavulânico; CA/AMC: ceftazidima – ácido clavulânico; CRO/AMC: ceftriaxona – ácido clavulânico.

A FIGURA 11 é um exemplo do teste de discos combinados, na qual se demonstra um aumento do halo de inibição superior a 5 mm da cefalosporina quando é adicionado a ela o inibidor de ESBL.

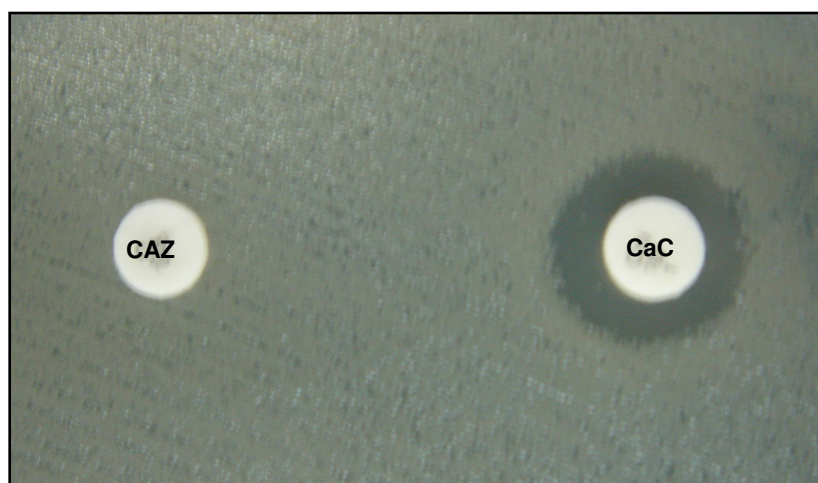


FIGURA 11 – TESTE DE DISCOS COMBINADOS POSITIVO

LEGENDA - CAZ: ceftazidima; CaC: ceftazidima + ácido clavulânico.

Em relação aos substratos utilizados na técnica de DC, no total, a maior positividade apresentada foi de 93,1% (n=149) para cefotaxima+ácido clavulânico (CcL), seguido de 91,9% (n=147) para cefpodoxima+ácido clavulânico (CeC) e de 77,5% (n=124) para ceftazidima+ácido clavulânico (CaC). Na tabela abaixo estão inseridos os dados referentes à positividade de detecção do método de DC para cada espécie bacteriana estudada.

TABELA 8 - POSITIVIDADE DE DETECÇÃO NO MÉTODO DE DISCOS COMBINADOS

Espécie	Nº amostras	Amostras positivas para ESBL		
		CcL	CaC	CeC
<i>K. oxytoca</i>	6	6 (100%)	5 (83,3%)	5 (83,3%)
<i>E. coli</i>	32	31 (96,9%)	21 (65,6%)	28 (87,5%)
<i>K. pneumoniae</i>	122	110 (90,2%)	98 (80,3%)	116 (95,1%)
Total	160	147 (91,9%)	124 (77,5%)	149 (93,1%)

LEGENDA - CcL: cefpodoxima + ácido clavulânico; CaC: ceftazidima + ácido clavulânico; CeC: cefotaxima + ácido clavulânico.

Quando somada a porcentagem de positividade dos discos combinados, os melhores resultados foram: CcL+CaC e CcL+CeC de 100% para *K. oxytoca* (n= 6) e *E. coli* de (n=32). Para *K. pneumoniae* o melhor resultado obtido foi de 99,2% (n=121) quando utilizado CcL+CaC+CeC. As porcentagem de positividade de detecção do método de DC estão representadas na TABELA 5.

TABELA 9 – CONJUNTO DE POSITIVIDADES DE DETECÇÃO NO MÉTODO DE DISCOS COMBINADOS

Espécie	N ^o amostras	Amostras positivas para ESBL			
		CcL+CaC	CcL+CeC	CaC+CeC	CcL+CeC + CaC
<i>K. oxytoca</i>	6	6 (100%)	6 (100%)	5 (83,3%)	6 (100%)
<i>E. coli</i>	32	32 (100%)	32 (100%)	28 (87,5%)	32 (100%)
<i>K. pneumoniae</i>	122	120 (98,4%)	120 (98,4%)	119 (97,5%)	121 (99,2%)
Total	160	158 (98,8%)	158 (98,8%)	152 (95%)	159 (99,4%)

LEGENDA - CcL: cefpodoxima + ácido clavulânico; CaC: ceftazidima + ácido clavulânico; CeC: cefotaxima + ácido clavulânico.

No teste de discos combinados (DC), apenas uma das 160 (0,6%) não foi confirmada para ESBL, e este número aumenta para 6 (3,8%) quando foi utilizado o teste de dupla difusão (DD), ou seja, o DC obteve uma positividade de 99,4% (159 amostras) e o DD de 96,3% (154 amostras). Quando as técnica DD e DC são avaliadas por espécie bacteriana, tanto DC quanto DD detectaram 6 (100%) das *K. oxytoca* produtoras de ESBL. Para *E. coli* 32 (100%) no DC, 30 (93,8%) no DD; e para *K. pneumoniae* 121 (99,2%) no DC, 118 (96,7%) no DD, detectaram a presença de ESBL, conforme demonstrado no GRÁFICO 3.

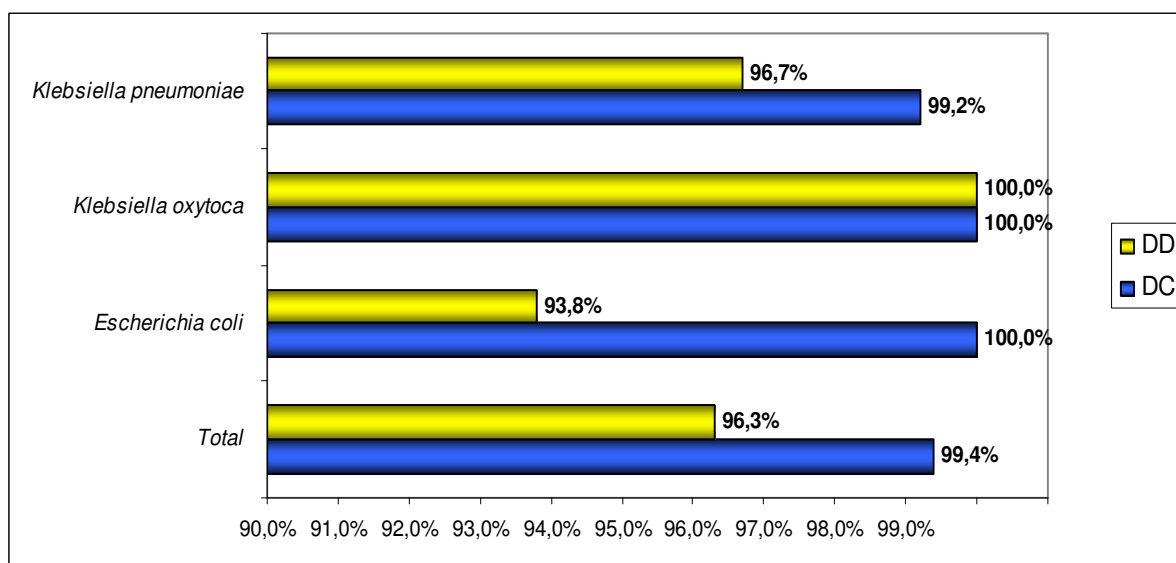


GRÁFICO 3 - AMOSTRAS IDENTIFICADAS PELO TESTE DE DISCOS COMBINADOS E DUPLA DIFUSÃO

LEGENDA – DC: discos combinados; DD: dupla difusão

4.4 TESTE FENOTÍPICO PARA DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE AmpC

Em relação a resistência à cefoxitina, como marcador da presença de AmpC, 14 das 160 amostras apresentaram resistência (8,8%). A FIGURA 10 mostra o perfil de sensibilidade à cefoxitina entre as espécies analisadas.

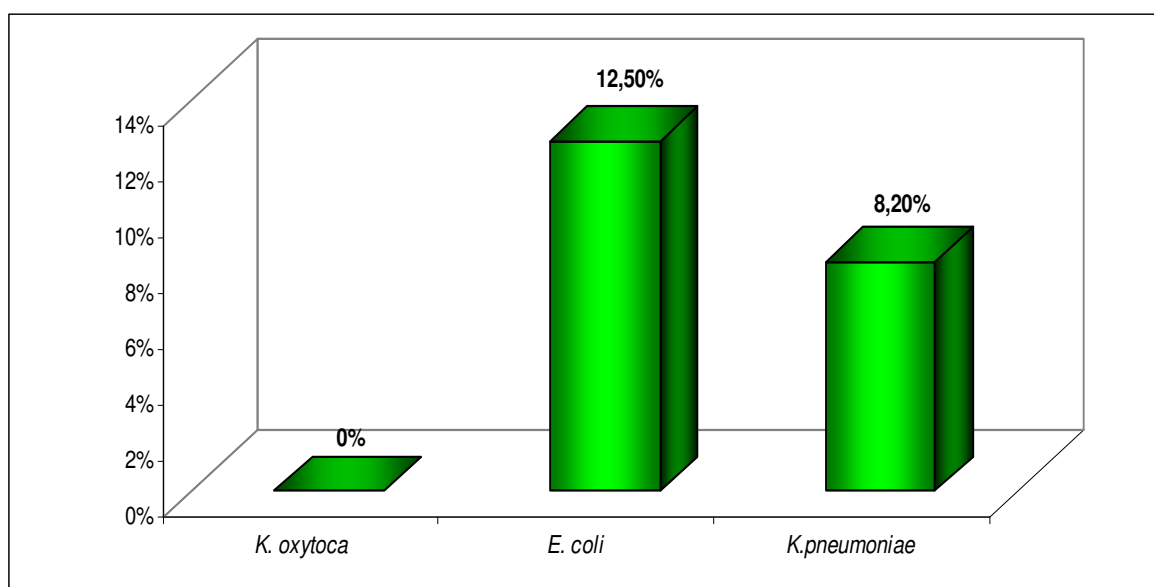


GRÁFICO 4 – PORCENTAGEM DE ISOLADOS RESISTENTES À CEFOXITINA

4.5 TESTE FENOTÍPICO PARA DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE KPC

Através do teste de triagem para detecção de KPC 6 (3,8%) amostras apresentaram CIM superior ou igual a 2 para meropenem, imipenem e/ou ertapenem, e na técnica de disco difusão 7 (4,4%) amostras apresentaram halo de inibição reduzido para os mesmos antibióticos testados.

Estas amostras foram submetidas posteriormente ao teste de Hodge e todas apresentaram resultado positivo, conforme demonstrado na FIGURA 12.

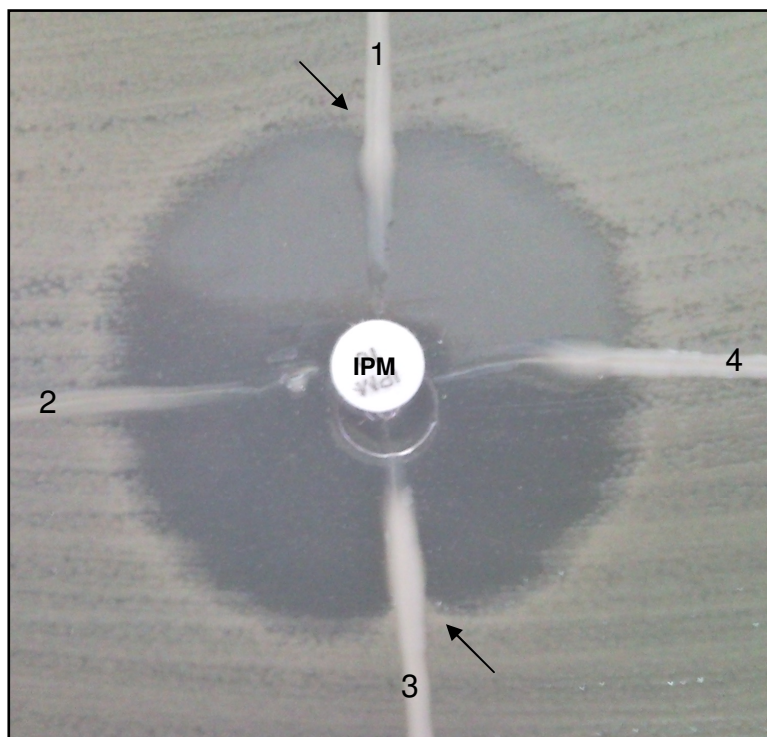


FIGURA 12 – TESTE DE HODGE

NOTA – As amostras 2 e 4 mostram Teste de Hodge negativo e 1 e 3 Teste de Hodge positivo, as setas indicam o alargamento do halo de inibição nos testes positivos.

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E PERFIL DE SENSIBILIDADE

A potência (CIM_{50}) e atividade (CIM_{90}) de alguns antimicrobianos, além da sensibilidade dos isolados produtores de ESBL, podem ser observadas na TABELA 6. O meropenem foi o antimicrobiano com maior potência, seguido do ertapenem, e imipenem.

A maior sensibilidade foi observada pelo imipenem e meropenem. As menores potências e atividades foram observadas na ceftazidima, aztreonam e cefotaxima.

O meropenem além de apresentar a maior potência também apresentou a maior atividade, seguido do imipenem e ertapenem. A sensibilidade às cefalosporinas de terceira geração e aztreonam variaram de 5,3 a 10%, enquanto o

cefepime, cefalosporina de quarta geração, apresentou 20% de sensibilidade (TABELA 10).

TABELA 10 - POTÊNCIA (CIM₅₀), ATIVIDADE (CIM₉₀) E PERFIL DE SENSIBILIDADE DOS ANTIMICROBIANOS TESTADOS EM AMOSTRAS PRODUTORAS DE ESBL

Antimicrobiano	CIM ₅₀	CIM ₉₀	% Sensibilidade
Aztreonam	128	> 128	5,9
Cefepime	16	64	20,0
Cefotaxima	256	> 256	5,3
Ceftazidima	32	128	10,0
Ertapenem	0,06	0,25	97,1
Imipenem	0,12	0,12	100
Meropenem	< 0,06	< 0,06	100
Tigeciclina	0,5	1	99,4

LEGENDA - CIM₅₀: mínima concentração capaz de inibir 50% dos isolados; CIM₉₀: mínima concentração capaz de inibir 90% das amostras

5 DISCUSSÃO

A evolução constante observada nos microrganismos, inclusive nas bactérias, tem gerado uma diversidade de mecanismos de resistência, cujo objetivo é de se adaptarem às diferentes pressões seletivas ocorridas no meio ambiente, seja ele intra ou extra-hospitalares. O uso clínico generalizado dos antimicrobianos comercialmente existentes tem contribuído para o surgimento de mecanismos capazes de neutralizar o impacto produzido por estes antimicrobianos e com isto, poucos agentes ainda são ativos (RICE, 2001; BABIC *et al.*, 2006). Diante da redução das opções terapêuticas é importante que se conheça os tipos de enzimas bacterianas presentes, para que se possa orientar a terapêutica apropriada.

Atualmente as ESBLs representam o maior grupo de β -lactamases estudado mundialmente e têm sido motivo de extensivas investigações microbiológicas, bioquímicas, genéticas e epidemiológicas (FILHO *et al.*, 2003). A escolha do método ótimo para a detecção e vigilância da produção de ESBL pelos microrganismos ainda não é clara (PADMINI *et al.*, 2008).

Cada vez torna-se mais difícil para o laboratório de microbiologia clínica identificar não somente os diferentes mecanismos de resistência, mas também a produção de múltiplas β -lactamases pelo mesmo microrganismo, sem conduzir elaborados testes secundários com expressivo aumento nos custos (BUSH, 2001).

No Brasil, o CLSI é adotado na padronização das metodologias fenotípicas de detecção de ESBL, porém muitos laboratórios clínicos têm dificuldades de incluir estes testes na rotina laboratorial (THOMSON *et al.*, 1996).

A porcentagem de positividade na detecção de ESBL depende da metodologia a ser utilizada. Neste estudo seis substratos foram utilizados como teste de triagem para detectar as amostras produtoras de ESBL, conforme orientação do CLSI (2008). Os substratos que melhor detectaram preliminarmente a enzima ESBL foram cefpodoxima (99,4%), seguido por cefotaxima (97,5%) e na determinação da CIM, estes dados se mantiveram. A cefpodoxima também foi o substrato mais sensível como indicador da produção de ESBL segundo Jitsurong e Yodsawat (2006) e Shah *et al.* (2004).

Quando foi analisado o teste de triagem separadamente, o melhor substrato para as três espécies foi a cefpodoxima, seguido do aztreonam e cefotaxima para

K. pneumoniae, ceftazidima para *E. coli* e para *K. oxytoca* cefotaxima, aztreonam ceftriaxona e cefepime detectaram também 100% das amostras testadas, seguido pela ceftazidima. Também foi observado que, entre as espécies avaliadas, com exceção da cefpodoxima, os demais substratos apresentaram uma sensibilidade menor para *E. coli* em relação às demais espécies. Estas variações podem ser explicadas devido às diferentes potências e afinidades de cada ESBL pelos substratos estudados, causando dificuldades na detecção e caracterização de isolados produtores desta enzima (TENOVER *et al.*, 1999).

Não foi possível a determinação da sensibilidade do método de triagem, pois todas as amostras foram previamente caracterizadas como produtoras de ESBL e é importante ressaltar que os testes de triagem não são suficientes para a detecção precisa da produção destas enzimas, sendo necessária a realização de testes confirmatórios (FREITAS *et al.*, 2003).

No teste de dupla difusão o melhor substrato utilizado no teste confirmatório para detecção de ESBL foi a ceftriaxona (92,5%). Para *K. pneumoniae* este substrato se manteve o mais sensível (94,3%). Para *E.coli* o melhor substrato foi o cefepime (93,8%) e para *K. oxytoca* aztreonam e ceftazidima alcançaram uma positividade de 100%. Para atingir uma melhor positividade, o CLSI sugere que sejam somados os resultados dos diferentes substratos utilizados no DD. Foi observado que a cada substrato somado, a positividade alcançada aumenta. A maior positividade alcançada foi de 96,3%, não chegando a 100%, pois em 6 (3,8%) amostras analisadas o resultado foi falso-negativo, não ocorrendo a detecção da presença de ESBL. Em estudos que analisaram a positividade do teste de dupla difusão Kader (2006) detectou uma positividade de 75% e Wiegand e colaboradores (2007) apresentaram sensibilidades mais elevadas (92,9%), resultados compatíveis com os dados deste trabalho.

Estudos realizados por Tofteland e colaboradores (2007) com testes de adição de ácido clavulânico demonstram a necessidade de associar ao menos duas combinações diferentes de cefalosporinas e de cefalosporinas mais ácido clavulânico, a fim de obter uma sensibilidade satisfatória.

Os resultados falso-negativos do teste confirmatório de DD podem ser explicados pela co-existência de outras enzimas, como a AmpC. Estas enzimas não são inibidas pelo ácido-clavulânico, mas podem interferir no efeito inibitório do ácido clavulânico sob as enzimas ESBL e com isso contribui para manter os elevados CIM

e os pequenos halos de sensibilidade nos métodos de difusão em ágar (YU *et al.*, 2006).

Outro fator que dificulta a detecção de ESBL é quando ocorre a síntese em pequenas quantidades desta enzima. O uso de uma variedade maior de substratos permite a identificação de maior número de amostras produtoras de ESBL (BELL *et al.*, 2002; MENEZES *et al.*, 2007).

Em relação ao teste de discos combinados a melhor positividade alcançada foi de 99,4% pois em uma amostra (0,6%) o DC não detectou a presença da produção da enzima. O melhor substrato isolado para confirmação da presença de ESBL foi obtido com a cefotaxima (93,1%). Pode-se observar diferenças entre as espécies analisadas. Para *K. pneumoniae* o melhor substrato foi a cefotaxima (95,1%), e para *E. coli* e *K. oxytoca* a cefpodoxima, 96,9% e 100% respectivamente. A porcentagem de positividade aumentou quando foram utilizados mais de um substrato. *E. coli* e *K. oxytoca* atingiram 100% quando foram utilizados cefpodoxima+ácido clavulânico e ceftazidima+ácido clavulânico ou cefpodoxima+ácido clavulânico e cefotaxima+ácido clavulânico. Para *K. pneumoniae* a maior positividade alcançada foi de 99,2% quando somada a porcentagem de positividade dos três substratos. Dados parecidos foram relatados por Goyal e colaboradores (2008) que analisaram o teste de discos combinados, onde detectaram uma positividade de 95% para este método e o substrato que detectou a maior porcentagem de isolados produtores de ESBL foi a cefpodoxima.

Quando se compara os dois testes fenotípicos confirmatórios, o DC foi melhor que o DD, detectando 99,4% e 96,3% respectivamente. Quando se compara os testes fenotípicos confirmatórios por espécie, o DC também foi o melhor teste para *K. pneumoniae* (99,2%), *E. coli* (100%). Para *K. oxytoca* os dois testes alcançaram uma positividade de 100%.

Uma das dificuldades encontradas na avaliação de testes para detecção de cepas produtoras de ESBL é o estabelecimento de um padrão-ouro, uma vez que algumas cepas expressam um grau muito baixo de resistência, ou, ainda, a produção de ESBL pode estar associada a outros mecanismos de resistência devido à produção de outras β -lactamases. Desta maneira, nenhum teste fenotípico pode ser considerado padrão-ouro, pois poderá apresentar tanto resultados falso-positivos quanto falso-negativos. Para contornar esta situação muitos estudos sugerem a combinação de diferentes testes (FILHO *et al.*, 2003).

Outra situação que dificulta a identificação de ESBL nos laboratórios clínicos é a aquisição de discos para realização do teste de DC, pois poucas empresas os comercializam e os existentes não possuem todos os substratos.

Para a detecção da produção de AmpC durante o teste de triagem foi utilizado o disco de cefoxitina. Nas amostras estudadas, foi observada uma resistência de 8,8% para este antimicrobiano. A maior porcentagem de resistência à cefoxitina foi observada nas amostras de *K. pneumoniae* (8,2%) seguida por *E. coli* (12,5%). Nas amostras de *K. oxytoca* não foi observada resistência a este antimicrobiano, provavelmente devido ao baixo número de isolados clínicos de *K. oxytoca* estudados.

Sabe-se que nas espécies acima citadas a produção de ESBL não confere resistência à cefoxitina. Estes dados sugerem uma possível aquisição de enzimas AmpC plasmidiais, podendo ser motivo desses achados (COUDROW *et al.*, 1997).

Embora a cefoxitina tenha sido utilizada como preditor da presença de AmpC, esta não pode ser utilizada isoladamente, porque outros mecanismos, como mutações em porinas, podem conferir esse fenótipo. O teste confirmatório fenotípico, como o da adição de ácido borônico, e testes moleculares por PCR, para pesquisa da enzima AmpC serão realizados em estudos posteriores (HARADA *et al.*, 2008).

Através dos testes de triagem para a detecção da enzima KPC, determinação da CIM e difusão em ágar, foram selecionadas 7 amostras (4,4%) que apresentaram sensibilidade reduzida a meropenem, imipenem e/ou ertapenem, e que segundo o CLSI (2008), devem ser submetidas a testes adicionais com o objetivo de confirmar a presença desta enzima.

Neste trabalho foi realizado o teste de Hodge como teste fenotípico confirmatório, onde se pode observar uma positividade de 100%. Anderson e colaboradores (2007) avaliaram métodos para detecção da enzima KPC e concluíram que o teste de Hodge possui uma sensibilidade e especificidade de 100%.

A resistência aos carbapenêmicos ainda é rara entre as enterobactérias, contudo, o uso desses carbapenêmicos deve se limitar aos tratamentos direcionados por testes laboratoriais, já que o uso generalizado destes agentes poderá selecionar clones de resistência (GALES *et al.*, 2002a; PATTERSON, 2000; SOUSA JUNIOR *et al.*, 2004).

Embora a taxa de KPC encontrada no Hospital de Clínicas seja considerável, há a necessidade da confirmação destes resultados através de técnicas moleculares de PCR, as quais serão realizadas em estudos posteriores.

Entre os antimicrobianos avaliados quanto à concentração inibitória mínima, os carbapenêmicos apresentaram a melhor potência (CIM₅₀) e a melhor atividade (CIM₉₀), sendo que o meropenem foi mais potente (CIM₅₀<0,06) e mais ativo (CIM₉₀<0,06) que o ertapenem (CIM₅₀ = 0,06/CIM₉₀ = 0,25) e o imipenem (CIM₅₀ = 0,12/CIM₉₀ = 0,12), e o mais ativo.

Em relação à sensibilidade o imipenem foi a única droga que apresentou 100% de atividade nas amostras produtoras de ESBL estudadas, e o ertapenem apresentou 95,9% de sensibilidade. Valores semelhantes foram encontrados em estudos realizados no Brasil e em outros países da América Latina, onde mais de 90% das amostras foram suscetíveis aos carbapenêmicos (GALES *et al.*, 2002a).

Os carbapenêmicos são agentes antimicrobianos β-lactâmicos com um excepcional espectro de atividade. O ertapenem tem sido recomendado para o tratamento de infecções causadas por cepas produtoras de ESBL (MODY *et al.*, 2007). Este antibiótico pode ser utilizado em dose diária única, o que reduz o custo e possibilita tratamento ambulatorial, além de não apresentar boa atividade contra não-fermentadores de glicose, não contribuindo desta forma, na pressão seletiva, umas das principais razões do aumento da incidência de *Pseudomonas spp* e *Acinetobacter spp* resistentes a carbapenêmicos (LIVERMORE *et al.*, 2003). Já o imipenem e meropenem apresentam meia vida de aproximadamente 1 hora, impossibilitando a administração de apenas uma dose diária (ZHANEL *et al.*, 2007).

Para todas as cefalosporinas e aztreonam a CIM₅₀ e CIM₉₀ foram elevadas, como era esperado. Nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos de amplo espectro as amostras produtoras de ESBL demonstraram baixa atividade a estas drogas. Dados similares foram encontrados em outros hospitais brasileiros localizados no Rio de Janeiro, Florianópolis e São Paulo em estudo realizado em 1998 pelo programa SENTRY (GALES *et al.*, 1997; SADER, 2000).

A sensibilidade encontrada nos testes *in vitro*, confirma a necessidade da realização de testes específicos para detecção da enzima e alteração dos resultados de todos os β-lactâmicos e monobactâmicos como resistentes. Esta norma estabelecida pelo CLSI tem sido muito discutida por vários autores como essencial para garantir uma terapia adequada aos pacientes e, ainda, auxiliar na determinação

de medidas de controle de sua disseminação (RICE *et al.*, 1991; PATTERSON, 2006).

Outras drogas alternativas como aminoglicosídeos, fluoroquinonas e sulfametoxazol/trimetoprim podem ser utilizadas no tratamento de infecções por microrganismos produtores de ESBL, porém a sensibilidade destas drogas também devem ser testadas frente a essas bactérias (VILLA *et al.*, 2000).

Entre as outras opções terapêuticas no tratamento de microrganismos produtores de ESBL encontra-se a tigeciclina. Neste trabalho a sensibilidade à tigeciclina (99,4%) foi bastante satisfatória. Também foi observada uma alta potência ($CIM_{50} = 0,5 \mu\text{g/mL}$) e alta atividade ($CIM_{90} = 1,0 \mu\text{g/mL}$) a esta droga.

Resultados semelhantes foram encontrados por Lu *et al.* (2008) em um estudo com *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* produtoras de ESBL, onde foi observados sensibilidade de 99,6%, CIM_{50} de $0,5 \mu\text{g/mL}$ e CIM_{90} de $1,0 \mu\text{g/mL}$. Estes dados demonstram que a tigeciclina pode ser uma das melhores opções terapêuticas em bactérias resistentes às cefalosporinas e carbapenêmicos (LU *et al.*, 2008).

6 CONCLUSÕES

- No teste de triagem para detecção de ESBL, entre os seis antimicrobianos utilizados, a cefpodoxima (99,4%) e a cefotaxima (97,5%) foram os substratos que apresentaram uma maior sensibilidade para detectar a presença de ESBL.
- No teste confirmatório de dupla difusão o melhor substrato utilizado foi a ceftriaxona (92,5%), porém a positividade de cada substrato variou de acordo com a espécie estudada. Para *K. pneumoniae* a ceftriaxona se manteve o mais sensível, para *K. oxytoca* o aztreonam e ceftazidima e para *E. coli* o melhor substrato foi o cefepime.
- No teste confirmatório de discos combinados a cefotaxima (93,1%) foi o melhor substrato. Assim como no teste e dupla difusão a positividade dos substratos variou de acordo com a espécie. Para *K. pneumoniae* o melhor substrato foi a cefotaxima, para *E. coli* e *K. oxytoca* a cefpodoxima.
- Entre os métodos confirmatórios avaliados o de discos combinados (99,4%) apresentou uma sensibilidade maior em comparação ao teste de dupla difusão (96,3%).
- A determinação da CIM₅₀ e CIM₉₀ para as cefalosporinas e aztreonam foram elevadas, e a porcentagem de sensibilidade diminuída, demonstrando que estas drogas não devem ser utilizadas no tratamento das infecções por bactérias produtoras de ESBL.
- A tigeciclina apresentou potência, atividade e sensibilidade elevadas, demonstrando ser uma opção terapêutica em bactérias multirresistentes.
- Entre os carbapenêmicos analisados o meropenem foi mais potente e ativo que o ertapenem e o imipenem. A maior sensibilidade alcançada foi para o

meropenem e imipenem. A elevada sensibilidade aos carbapenêmicos encontrada neste trabalho reafirma a importância deste grupo de antimicrobianos como droga de escolha no tratamento de infecções causadas por microrganismos produtores de ESBL.

- No teste fenotípico para avaliar a presença de outras β -lactamases, a cefoxitina foi utilizada como marcador da presença de AmpC, mostrando-se resistente para *E. coli* e *K. pneumoniae* em percentagem elevada. Embora nestas espécies bacterianas a produção de ESBL não confira resistência à cefoxitina, este teste não é conclusivo e os resultados devem ser confirmados através de métodos específicos, como os moleculares.
- Para a pesquisa da enzima KPC, através dos dados da CIM e do perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos, as amostras selecionadas foram submetidas ao teste fenotípico de Hodge, as quais apresentaram 100% de positividade. Porém a resistência aos carbapenêmicos ainda é rara, sendo necessária a confirmação destes resultados por testes moleculares, como a PCR.
- Neste trabalho foi possível observar que a avaliação dos métodos para a detecção de ESBL depende da expressão fenotípica da β -lactamase presente, sendo importante testar a maior variedade possível de substratos nos laboratórios de microbiologia e detectar a presença desta enzima nos diferentes isolados clínicos, a fim de se evitar custos hospitalares desnecessários e uma terapia antimicrobiana inadequada.

REFERÊNCIAS

AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. *Philos Trans Roy London Series B. Biological Science*, v. 289, p. 321-331, 1980.

ANDERSON, K. F.; LONSWAY, D. R.; RASHEED, J. K.; BIDDLE, J.; JENSEN, B.; MCDUGAL, L. K.; CAREY, R. B.; THOMPSON, A.; STOCKER, S.; LIMBAGO, B.; PATEL, J. B. Evaluation of Methods To Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 45, p. 2723–2725, 2007.

AUGUSTI, G. R.; SUPERTI, S.; ZAVASKI, A.P. Prevalência de produção de beta-lactamase de espectro estendido em bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. *Scientia Medica*, v. 17, p. 192-196, 2007.

BABIC, M.; HUJER, A. M.; BOMONO, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on β -lactamases. *Elsevier*, v. 10, p. 1016-1032, 2006.

BABINI, G.; LIVERMORE, D. M. Are SHV β -lactamase universal in *K. pneumoniae*? *Antimicrob Agent Chemother*, v. 8, p. 2230-2231, 2000.

BELL, J. M.; TURNIDGE, J. D.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N. SENTRY APAC Study Group. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99). *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 42(3), p. 193-198, 2002.

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

BONOMO, R.A.; ENDIMIANI, A.; HUJER, K. M.; PEREZ, F. **The continuing Challenger of ESBL**. *Curr Opin Pharmacol*, p. 459-469, 2007.

BRADFORD, P. A. Extended spectrum beta lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*, v. 14, p. 933-951, 2001.

BRATU, S.; LANDMAN, D.; ALAM, M. *et al.* Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter spp* from Brooklyn, New York. *Antimicrob*

Agents Chemother, v. 49, p. 776–778, 2005.

BRIGANTE, G.; LUZZARO, F.; PERILLI, M.; *et al.* Evolution of CTX-M-type β -lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. **Int J Antimicrob Agents**, v. 25, p. 157–162, 2005.

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

BUSH, K. New β -betalactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 1085-1089, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A function classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **American Society for Microbiology**, v. 39 (6), p. 1211-1233, 1995.

CANTON, R.; NOVAIS, A.; VALVERDE, A.; MACHADO, E.; PEIXE, L.; BAQUERO, F; COQUE, T. M. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. **Clin Microbiol Infect**, v. 14(1), p. 144–153, 2008.

CARTER, M. W.; OAKTON, K. J.; WARNER, M.; LIVERMORE, D. M. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in klebsiellae with the Oxoid combination disk method. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 4228–4232, 2000.

CASTANHEIRA, M.; SADER, H. S.; DESHPANDE, L. M.; FRITSCHKE, T. R.; JONES, R. N. Antimicrobial Activities of Tigecycline and Other Broad-Spectrum Antimicrobials Tested against Serine Carbapenemase- and Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 52, p. 570–573, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pennsylvania, M100-S18, 2008.

CONDON, P. E.; MOOLLAND, E. S.; SANDERS, C. C. Occurrence and Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a Veterans Medical Center: seek any you may find. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 35, p. 2593-2597, 1997.

CORMICAN, M.; MORRIS, D.; CORBETT-FEENEY, G.; *et al.* Extended spectrum β -lactamase production and fluoroquinolone resistance in pathogens associated with community acquired urinary tract infection. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 32, p. 317–319, 1998.

CURCIO, D. J.; ISTÚRIZ, R. E. Tigecycline, the first glycylicycline. **Rev Panam Infectol**, v. 8(3), p. 35-42, 2006.

DALMARCO, E.M.; BLATT, S. L.; CÓRDOVA, C. M. M. Identificação Laboratorial de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) – Revisão. **RBAC**, v. 38(3), p. 171-177, 2006.

DRIEUX, L.; BROSSIER, F.; SOUGAKOFF, W.; JARLIER, V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 (1), p. 90–103, 2008.

DZIDIC, S.; BEDEKOVIC, V. Horizontal gene transfer emerging multidrug resistance in hospital bacteria. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24 (6), p. 519-526, 2003.

FILHO, J. R. C.; PEREIRA, A. S.; SADER, H. S.; TOGNIM, B. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para a detecção de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39 (4), 2003.

FREITAS, A. L. P. *et al.* Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella spp* e *Escherichia coli* obtained in a Brazilian teaching hospital: detection, prevalence and molecular typing. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 344-348, 2003.

GALES, A. C.; BOLMSTRÖM, A.; SAMPAIO, J.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum beta-lactamase (ESBL) Isolated in Hospitals in Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 1(4), p. 196-203, 1997.

GALES, A. C.; MENDES, R. E.; CARMO FILHO JR; SADER, H. S. Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastina: o laboratório necessita testar rotineiramente dois antimicrobianos? **J Braz Pat Med Lab**, v. 38(1), p. 13-20, 2002a.

GALES, A. C.; SADER, H. S.; JONES, R. N. Urinary tract infection trends in Latin América: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). **Diagnostics Microbiology and Infectious Diseases**, v. 44, p. 289-299, 2002b.

GHUYSEN, J. M. SERINE β -lactamases and penicillin-binding proteins. **Annu Rev Microbiol**, v. 45, p. 37-67, 1991.

GNIADKOWSKI, M.; PALUCHA, A.; GRZESIOWSKI, P.; HRYNIEWICZ W. Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric hospital in Warsaw, Poland: clonal spread of the TEM-47 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV-5-like ESBL-encoding gene. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42(12), p. 3079-3085, 1998.

GOYAL, A.; PRASAD, A.; GHOSHAL, U.; PRASAD, K. N. Comparison of disk diffusion, disk potentiation & double disk synergy methods for detection of extended spectrum beta lactamases in *Enterobacteriaceae*. **Indian J Med Res**, v. 128, p. 209-211, 2008.

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

HARADA, M. D.; YOSHIKAZU ISHII, M. D.; KEIZO YAMAGUCHI, M. D. Extended-spectrum β -Lactamases: Implications for the Clinical Laboratory and Therapy. Review-Clinical Microbiology. **Korean J Lab Med**, v. 28, p. 401-412, 2008.

JANIS, E. R. Maintenance by criopreservation. **Maintenance of Microorganisms a Manual of Laboratory Methods**. Academic Press INC, 2.ed, p 161-165, 1994.

JARLIER, V.; M. H; Nicolas, G. Fournier, and A. Philippon. Extended broadspectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Rev. Infect. Dis**, v. 10, p. 867-878, 1988.

JASSER, A. M. A. Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs): A Global Problem. **Kuwait Medical Journal**, v. 38 (3), p. 171-185, 2006.

JITSURONG, S.; YODSAWAT, J. Prevalence of extended-spectrum betalactamases (ESBLs) produced in blood isolates of gram-negative bacteria in a teaching hospital in southern Thailand. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 37 (1), p. 131-135, 2006.

KADER, A. A. Modified double-disc test for detection of extended-spectrum [beta]-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **British Journal of Biomedical Science**, 2009.

KAHLMETER, G. Breakpoints for intravenously used cephalosporins in *Enterobacteriaceae* - EUCAST and CLSI breakpoints. **Clin Microbiol Infect**, v. 14(1), p. 169–174, 2008.

KAYE, K. S.; FRAIMOW, H. S.; ABRUTYN, E. Pathogens resistant to antimicrobial agents. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 14(2), p. 293-319, 2000.

KNOTHE H.; SHAH, P.; KREMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitina, cefamandole e cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, p. 315-317, 1983.

LAHEY CLINIC. Disponível em <<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>>. Acesso em 15/02/2009.

LAUPLAND, K. B.; CHURCH, D. L.; VIDA KOVICH, J.; MUCENSKI, M.; PITOUT, P. D. Community-onset extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*: importance of international travel. **J Infect**, v. 57 (6), p. 441-448, 2008.

LEE, S. H.; KIM, J. Y.; SHIN, S. H.; AN, Y. J.; CHOI, Y. W.; JUNG, Y. C. *et al.* Dissemination of SHV-12 and characterization of new AmpC type beta-lactamase genes among clinical isolates of *Enterobacter* species in Korea. **J Clin Microbiol**, v. 41, p. 2477-2482, 2003.

LEGRAND, P.; FOURNIER, G.; BURE, A., *et al.* Detection of extended broad-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in four French hospitals. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 8, p. 527–529, 1989.

LINSCOTT, A. J.; BROWN, W. J. Evaluation of four commercially available extended-spectrum beta-lactamase phenotypic confirmation tests. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 1081–1085, 2005.

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

LIVERMORE, D. M.; YUAN, M. Antibiotic resistance and production of extended-spectrum β -lactamases amongst *Klebsiella spp* from intensive care units in Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 38, p. 409-424, 1996.

LIVERMORE, D. M.; BROWN, D. F. J. Detection of beta-lactamase mediated resistance. **J Antimicrobial Chemoter**, v. 48, p. 59-64, 2001.

LIVERMORE, D. M.; SEFTON, A. M.; SCOTT, G. M. Properties e Potential of Ertapenem. **J Antimicrobial Chemoter**, v. 52, p. 331-344, 2003.

LIVERMORE, D. M. Tigecycline: what is it, and where should it be used? **Journal of Antibiotic Chemotherapy**, v. 56(2), p. 611-614. 2005.

LIVERMORE, D. M. Future directions with daptomycin. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, p. 41-49, 2008

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal Clinical Investigation**, v. 111, p. 1265-1273, 2003.

LU, C. T.; CHUANG, Y. C.; SUN, W.; LIU, Y. C.; CHENG, Y. J.; LU, P. L. *et al.* Nationwide surveillance in Taiwan of the in-vitro activity of tigecycline against clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. **Int J Antimicrob Agents**, v. 32 (3), p. S179-83, 2008.

LYON, D. J.; SCHEEL, O.; ADEYEMI-DORO, F. A.; LING, T. K.; CHENG, A. F.; NORRBY, S. R. Antimicrobial susceptibility and extended-spectrum beta-lactamases of Hong Kong isolates of enterobacteriaceae. **Scand J Infect Dis Suppl.**, v.101, p. 17-20, 1995.

MACKENZIE, F. M.; MILLER, C. A.; GOULD, I. M. Comparison of screening methods for TEM and SHV derived extended-spectrum β - lactamase detection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, p. 715-724, 2002.

MARTINEZ-MARTINEZ, L. Extended-spectrum b-lactamases and the permeability barrier. **Clin Microbiol Infect.** v. 14 (1), p. 82–89, 2008.

MATHAI, D.; JONES, R. N.; PFALLER, M. A. SENTRY Participant Group North America. Epidemiology and frequency of resistance among pathogens causing urinary tract infections in 1,510 hospitalized patients: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.

40(3), p. 129-136, 2001.

MENEZES, E. A.; NASCIMENTO, K. M.; SOARES, K. P.; AMORIM, L. N.; NETO, J. G. L.; CUNHA, F. A. Avaliação da atividade in vitro do meropenem contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamase de espectro expandido isoladas na cidade de Fortaleza, Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40 (3), p.349-350, 2007.

MENEZES E SILVA, C. H. P.; NEUFELD, P. M. Bacteriologia e Micologia para laboratório clínico. Revinter : São Paulo, 2006.

MODY, R. M.; ERWIN, D. P.; SUMMERS, A. M.; CARRERO, H. A.; SELBY, E. B.; EWELL, A. J.; MORAN, K. A. Ertapenem susceptibility of extended spectrum beta-lactamase-producing organisms. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 6, p. 1-5 , 2007.

MONNETT, D. L. Antibiotic development and changing role of the pharmaceutical industry. The Global Threat of Antibiotic Resistance: Exploring roads towards Concerted Action. **Sweden**, 2004.

NAAS, T.; CUZON, G.; VILLEGAS, M. V.; LARTIGUE, M. F.; QUINN, J. P.; NORDMANN, P. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the β -Lactamase *blaKPC* Gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52 (4), p. 1257–1263, 2008.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, p. 382-388, 1994.

NOGUEIRA, K. S.; HIGUTI, I. H.; NASCIMENTO, A. J.; TERASAWA, L. B.; OLIVEIRA, S. ; MATOS, A. P.; SOUZA, H. A. P. H. M.; COGO, L. L.; DALLA COSTA, L. M. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 10(6), p. 390-395, 2006.

O'HARA, C. M. Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and others aerobic gram -negative bacilli. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 147-162, 2005.

OTEO, J.; CAMPOS, J.; BAQUERO, F. Spanish members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Antibiotic resistance in 1962 invasive isolates of *Escherichia coli* in 27 Spanish hospitals participating in the European

Antimicrobial Resistance Surveillance System. **J Antimicrob Chemother**, v. 50(6), p. 945-952, 2002.

PADMINI, S. B.; RAJU, B. A. Evaluation of CIVA Agar for rapid detection of extended spectrum β -lactamases (ESBL) among isolates of *Enterobacteriaceae*. **Indian J Med Res**, v. 127, p. 195-197, 2008.

PAGANI, L.; MIGLIAVACCA, R.; PALLECCHI, L.; MATTI, C.; GIACOBONE, E.; AMICOSANTE, G.; ROMERO, E.; ROSSOLINI, G. M. Emerging extended-spectrum beta-lactamases in *Proteus mirabilis*. **Jf Clinl Micróbiol**, v. 40, p. 1549-1552, 2003.

PAI, H.; KANG, C. I.; BYEON, J. H.; LEE, K. D.; PARK, W. B.; KIM, H. B. *et al.* Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by Amp C producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agent Chemother**, v. 48(10), p. 3720-3728, 2004.

PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **Am J Infect Control**, v. 34, p. S20-28, 2006.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, p. 657-686, 2005.

PATTERSON, J. E.; HARDIN, T. C.; KELLY, C. A.; GARCIA, R. C.; JORGENSEN, J. H. Association of antibiotic utilization measures and control of multiple-drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 21, p. 455-458, 2000.

PHILIPPON, A.; ARLET, G.; LAGRANGE, P. H. Origin and impact of plasmid-mediated extended spectrum β -lactamases. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 13(1), p. S17-S29, 1994.

PHILIPPON, A.; LABIA, R.; JACOBY, G. A. Extended spectrum β -lactamases. **Antimicrob Agent Chemother**, v. 33, p. 1131-1136, 1989.

PIDDOCK, L. J.; WALTERS, R. N.; JIN, Y. F.; TURNER, H. L.; GASCOYNE-BINZI, D. M.; HAWKEY, P. M. Prevalence and mechanism of resistance to 'third-generation' cephalosporins in clinically relevant isolates of *Enterobacteriaceae* from 43 hospitals in the UK, 1990-1991. **J Antimicrob Chemother**, v. 39(2), p. 177-87, 1997.

PITOUT, J. D. D.; LAUPLAND, K. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. **Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 159-166, 2008.

PITOUT, J. D.; HANSON, N. D.; CHURCH, D. L.; *et al.* Population-based laboratory surveillance for *Escherichia coli*-producing extended-spectrum β -lactamases: importance of community isolates with blaCTX-M genes. **Clin Infect Dis**, v. 38, p. 1736–1741, 2004.

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

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Review**, v. 20, p. 440-458, 2007.

RICE, L. B. Evolution and clinical importance of extended spectrum β -lactamase. **Chest**, v. 119, p. 391S-395S, 2001.

RODRIGUEZ-BANO, J.; NAVARRO, M. D.; ROMERO, L.; *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, p. 1089–1094, 2004.

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

ROSSOLINI, G. M.; D'ANDREA, M. M.; MUGNAIOLI, C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14(1), p. 33–41, 2008.

SADER, H. S. Antimicrobial resistance in Brazil: Comparison of results from two multicenter studies. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 4, p. 91-99, 2000.

SANDERS, C. C.; SANDERS, W. E. Jr. β -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. **Clin. Infect. Dis**, v. 15, p. 824-839, 1992.

SCHWABER, M. J.; RANEY, P. M., RASHEED, J. K.; BIDDLE, J. W.; WILLIAMS, P.; MCGOWAN JR, J. E.; TENOVER, F. C. Utility of NCCLS Guidelines for identifying Extended-Spectrum β -Lactamases in Non- *Escherichia coli* and Non- *Klebsiella spp*

Of *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 294-298, 2004.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; AHMED, S.; HAMEED, A. Extended spectrum beta-lactamases (ESBLs): characterization, epidemiology and detection. **Crit Rev Microbiol**, v. 30, p. 25-32, 2004.

SOUSA JUNIOR, M. A. *et al.* Betalactamases de espectro ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. **NewsLab**, ed. 63, 2004.

STEINKE, D.; DAVEY, P. Association between antibiotic resistance and community prescribing: A critical review of bias and confounding in published studies. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33(3), p. S193-S205, 2001.

STEWART, C. D.; WALLACE, D.; HUBERT, S. K.; LAWTON, R.; FRIDKIN, S. K.; GAYNES, R. P.; MCGOWAN JR, J. E.; TENOVER, F. C. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: a survey of project ICARE laboratories. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 38(1), p.59-67, 2000.

TENOVER, F. C.; MOHAMED, M. J.; GORTON, T. S.; DEMBEK, Z. F. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum β -lactamases. **Survey of laboratories in Connecticut**, v. 37, p. 4065-4070, 1999.

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

THOMSON, K. S.; PREVAN, A. M.; SANDERS, C. C. Novel plasmid mediated β -lactamase in *Enterobacteriaceae*: emerging problems for new betalactam antibiotic. **Current Clin. Infect. Dis**, v. 16, p.151-163, 1996.

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. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, p. 1877-1882, 1992.

TOFTELAND, S.; HALDORSEN, B.; DAHL, K. H.; SIMONSEN, G. S.; STEINBAKK, M.; WALSH, T. R.; SUNDSFJORD, A. Extended spectrum β -lactamase producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway: phenotypes, genotypes and consequences for detection methods. **J. Clin. Microbiol**, v. 45 (1), p. 199-205, 2007.

TZELEPI, E.; GIAKKOUP, P.; SOFIANOU, D.; LOUKOVA, V.; KEMEROGLOU, A.; TSAKRIS, A. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 542–546, 2000.

VILA, J.; MARCO, F. Interpretative reading of the non-fermenting gram negative bacilli antibiogram. *Enferm. Infect Microbiol Clin*, v. 20, p. 304-310, 2002.

VILLA, L.; PEZZELLA, C.; TOSINI, F.; VISCA, P.; PETRUCCA, A.; GARATTOLI, A. Multiple antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmid carrying an extended spectrum β -lactamase gene and a class 1 integron. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, p. 2911-2924, 2000.

VILLEGAS, M, V.; KATTAN, J. N.; QUINTEROS, M. G.; CASELLAS, J. M. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. **Clin Microbiol Infect**, v. 14(1), p. 154–158, 2008.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, p. 775-781, 2000.

WALSH, T.R. *et al.* Metallo- beta- Lactamases: the Quiet before the Storm? **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 2, p. 306-325, 2005.

WARREN, R. E.; HARVEY, G.; CARR, R.; WARD, D.; DOROSHENKO, A. Control of infections due to extended-spectrum b-lactamase-producing organisms in hospitals and the community. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 (1), p. 124–133, 2008.

WIEGAND, I.; GEISS, H. K.; MACK, D.; STÜRENBURG, E.; SEIFERT, H. Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase among Enterobacteriaceae by Use of Semiautomated Microbiology Systems and Manual Detection Procedures. **Jornal of Clinical Microbiology**, v. 45 (4), p.1167-1174, 2007.

WINOKUR, P. L.; CANTON, R.; CASELLAS, J. M.; LEGAKIS, N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. **Clin Infect Dis**, v. 15, p. S94-103, 2001.

WOLTER, D. J.; KURPIEL, P. M.; WOODFORD, N.; PALEPOU, M. F.; GOERING, R. V.; HANSON, N. D. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. **Antimicrob**

Agents Chemother, v. 53 (2), p. 557-562, 2009.

WOODFORD, N., E. J. FAGAN, *et al.* Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. **J Antimicrob Chemother**, v. 57 (1), p.154-155, 2006.

WOODFORD, N.; KAUFMANN, M. E.; KARISIK, E.; HARTLEY, J. W. Molecular epidemiology of multiresistant *Escherichia coli* isolates from community-onset urinary tract infections in Cornwall, England. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 106–109, 2007.

WOODFORD, N.; TIERNO JR, P. M.; YOUNG, K.; TYSALL, L.; PAPELOU, M. F. I.; WARD, E.; PAINTER, R. E.; SUBER, D. F.; SHUNGU D.; SILVER, L. L.; INGLIMA, K.; KORNBLUM, J.; LIVERMORE, D. M. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing Class A β -lactamase, KPC-3, in New York Medical Center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 48, p. 4793-4799, 2004.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J. *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1151-1161, 2001.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; RASHEED, J. K. *et al.* Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p. 3881–3889, 2003.

YU, W. L.; CHUANG, Y. C.; RASMUSSEN, J. W. Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 39, p. 264-277, 2006.

ZHANEL, G. G.; WIEBE, R.; DILAY, L.; THOMSON, K.; RUBINSTEIN, E.; HOBAN, D. J.; NOREDDIN, A. M.; KARLOWSKY, J. A. Comparative review of the carbapenems. **Drugs**, v. 67(7), p.1027-1052, 2007.

ANEXO

Procedência dos meios de cultura, discos e antibióticos utilizados no teste de sensibilidade aos antimicrobianos por disco difusão e concentração inibitória mínima

1 MEIOS DE CULTURA

1.1 Ágar Mueller Hinton

- Procedência: Difco®; Lote 8052950 / Oxoid®; Lote 872574.
- Modo de preparo: Pesar a quantidade de meio de cultura indicada no rótulo do frasco, acrescentar a 1000 mL de água destilada, acertar o pH indicado no rótulo e aquecer até a fervura. Autoclavar por 15 min a 120°C / 1 atm. Deixar esfriar até aproximadamente 55°C em banho-maria e distribuir em placas de Petri estéreis, deixando uma camada de 3 a 4 cm.

1.2 Ágar Mac Conkey

- Procedência: Himédia®, Mumbai, Índia; Lote 26205 / Oxoid®, Lote 628746.
- Modo de preparo: Pesar a quantidade de meio de cultura indicada no rótulo do frasco, acrescentar a 1000 mL de água destilada, acertar o pH indicado no rótulo e aquecer até a fervura. Autoclavar por 15 min a 120°C / 1 atm. Deixar esfriar até aproximadamente 55°C em banho-maria e distribuir em placas de Petri estéreis.

2 KITS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS

- Procedência: Newprov, Pinhais, Brasil, Lote 8260.
- Modo de preparo: pronto para o uso, contendo as provas de triptofano, glicose, H₂S, gás, lisina, ornitina, motilidade, indol, citrato e ramnose.

3 DISCOS USADOS NO TESTE DE TRIAGEM, E TESTES FENOTÍPICOS CONFIRMATÓRIOS

Disco	Procedência	Lote
Cefepime	Newprov, Pinhais, Brasil	I0281
Imipenem	Newprov, Pinhais, Brasil	DIA24
Ceftazidima	Himédia®, Mumbai, Índia	32983
Ácido Clavulânico	Newprov, Pinhais, Brasil	I 0280
Aztreonam	Newprov, Pinhais, Brasil	0267
Ceftriaxona	Newprov, Pinhais, Brasil	G1327
Cefoxitina	Newprov, Pinhais, Brasil	G0183
Meropenem	Newprov, Pinhais, Brasil	1376
Ertapenem	Oxoid® - United Kingdom	610898
Cefpodoxima	Himédia®, Mumbai, Índia	32369
Cefotaxima	Himédia®, Mumbai, Índia	32583
Cefotaxima+ácido clavulânico	Himédia®, Mumbai, Índia	26087
Cefotaxima+ácido clavulânico	Himédia®, Mumbai, Índia	25896
Ceftazidima+ácido clavulânico	Himédia®, Mumbai, Índia	32585
Cefotaxima+ácido clavulânico	Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, França	8F3021
Ceftazidima+ácido clavulânico	Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, França	8H3018

4 ANTIBIÓTICOS USADOS PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Disco	Procedência	Lote
Cefotaxima	Sigma Chemical CO (Louis, MO, USA)	036K163
Ceftazidima	Sigma Chemical CO (Louis, MO, USA)	027K1468
Aztreonam	Sigma Chemical CO (Louis, MO, USA)	124K1448
Cefepime	Bristol-Myers Squibb (Rueil-Malmaison, France)	04G100
Imipenem	Merck Sharp & Dohme (Clermont, França)	FI019
Meropenem	BioChimico (Rio de Janeiro, Brasil)	006120
Ertapenem	Merck Sharp & Dohme (Clermont, França)	0797590
Tigeciclina	Wyeth (Madison, NJ, USA)	C70378