

**KEITE DA SILVA NOGUEIRA**

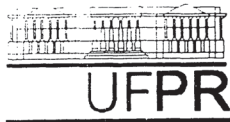
**OCORRÊNCIA DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO EM  
ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS EM DOIS HOSPITAIS UNIVERSITÁRIOS**

**Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como Requisito Parcial à Obtenção do Grau de Mestre.**

**Orientadora : Dra. Ilma Hiroko Higuti  
Co-orientadora: Dra. Libera Maria Dalla  
Costa**

**CURITIBA**

**2005**




Ministério da Educação e Desporto  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SETOR DA SAÚDE**  
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

### PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “Ocorrência de beta-lactamases de espectro ampliado em enterobactérias isoladas em dois hospitais universitários”, de autoria da Pós-Graduanda em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, KEITE DA SILVA NOGUEIRA, e com a Banca Examinadora constituída pelos Professores: Dr. Edivaldo Rosa (PUCPR), Dr. Humberto Maciel França Madeira (PUCPR), Dr<sup>a</sup> Libera Maria Dalla Costa (Hospital de Clínicas/UFPR) e Dr<sup>a</sup> Cristina Leise Bastos Monteiro (Departamento de Patologia Básica/UFPR) suplente. Segundo a avaliação da Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado, a candidata foi aprovada. Para a devida publicação, o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 20 de abril de 2005.

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Libera Maria Dalla Costa

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edivaldo Rosa

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Leise Bastos Monteiro (suplente)

**A Deus pela força, sabedoria e saúde, e a minha família pelo amor e incentivo que me deram em todos os momentos de minha vida...**

## AGRADECIMENTOS

As orientadoras Dra. Ilma Hiroko Higuti pela oportunidade, pela contribuição para o crescimento alcançado nesse mestrado e por toda atenção dispensada a mim e a esse trabalho. E a Dra. Libera Maria Dalla Costa por sua força, que fez com que ela continuasse o trabalho apesar de todos os contratemplos; pelo respeito e compromisso que demonstrou aos seus alunos; e principalmente pelo exemplo que nos deu durante essa batalha.

Ao Curso de Pós-graduação e a Dra. Vanete Tomaz Soccol, por todo apoio no decorrer do curso.

A todos os funcionários da Seção de Bacteriologia e Central de Preparo de Meios e Reagentes do Hospital de Clínicas, que colaboraram de diversas formas para que a realização desse trabalho fosse possível.

Ao Núcleo de estudos de Bacteriologia de Curitiba – NEBaC e a Newprov, que colaboraram com recursos para realização do trabalho, e ao Professor Carlos Augusto Albin, que atendeu prontamente a todos os nossos pedidos.

Ao Professor Dr. Aguinaldo José do Nascimento, que realizou toda análise estatística.

A todos os colegas de mestrado, em especial a Helena A.P.H.M de Souza, Larissa Bail, Simone de Oliveira, Adriana Pereira Mattos e Jannaina Ferreira de Melo Vasco, que contribuíram muito, com carinho e boa vontade.

A minha mãe Marly Oliveira, que sempre incentivou meu crescimento, dando força e apoio em todas as etapas da minha vida. Ao meu pai Sebastião Nogueira e ao meu irmão Kelvin Nogueira, por sempre acreditarem em meu potencial e fazerem com que me sentisse especial. E a minha família querida, por serem tão maravilhosos, e por tudo o que significam para mim.

E aos amigos que acompanharam essa jornada, ouvindo, apoiando, dando a mão, fazendo com que tudo fosse mais fácil, mais agradável, em especial ao Jony Ogata, que foi o principal incentivador ao meu ingresso nesse curso.

## SUMARIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	6
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	7
<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	13
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
3.1. ENTEROBACTÉRIAS .....	14
3.1.1. Resistência aos Antimicrobianos em Enterobactérias .....	15
3.1.2. Resistência aos antimicrobianos $\beta$ -lactâmicos em enterobactérias .....	16
3.2. Beta-lactamases .....	18
3.2.1. Histórico .....	19
3.2.2. Classificação das $\beta$ -lactamases .....	20
3.2.3.1. $\beta$ -lactamases cromossômicas em enterobactérias.....	23
3.2.3.2. $\beta$ -lactamases Mediadas por Plasmídeos e outras $\beta$ -lactamases Secundárias em Enterobactérias .....	27
3.2.4 Testes para Detectar a Produção de $\beta$ -lactamases .....	29
3.3. Beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL).....	31
3.3.1. Origem e Evolução .....	31
3.3.2. Caracterização, Susceptibilidade e Características Bioquímicas. ....	32
3.3.3. Tipos de ESBLs .....	33
3.3.3.1. Tipo TEM .....	33
3.3.3.2. Tipo SHV.....	34
3.3.3.3. Tipo CTX-M.....	35
3.3.3.4. Tipo OXA .....	36
3.3.4. Significado Clínico da Detecção de ESBL.....	37
3.3.5. Ocorrência, distribuição e disseminação das ESBLs.....	38
3.3.6. Fatores de Risco .....	40

3.3.7. Co-existência com outras $\beta$ -lactamases.....	41
3.3.8. Associação de Resistência a outros Antimicrobianos .....	42
3.3.9. Opções Terapêuticas.....	42
3.3.10. Medidas de Controle.....	43
3.4. Métodos de Detecção de ESBL.....	44
3.4.1. Técnicas Microbiológicas.....	46
3.4.2. Pontos de Corte Indicativos da Produção de ESBL .....	47
3.4.3. Teste de Dupla Difusão em Disco .....	48
3.4.4. Teste Tridimensional .....	48
3.4.5. Teste de Adição de Ácido Clavulânico .....	49
3.4.6. E-test <sup>®</sup> .....	49
3.4.7. Outros Métodos Fenotípicos.....	49
3.4.8. Detecção de ESBL em espécies diferentes de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella spp.</i> .....	50
3.4.9. Métodos de Detecção Molecular .....	51
<b>4. ARTIGO</b> .....	52
RESUMO .....	53
INTRODUÇÃO.....	54
MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
RESULTADOS .....	58
DISCUSSÃO .....	67
REFERÊNCIAS .....	74
<b>ANEXOS</b> .....	79
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	89

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 - ESQUEMA DE CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL PROPOSTA POR BUSH, JACOBY e MEDEIROS, 1995.....	22
TABELA 2 - $\beta$ -LACTAMASES CROMOSSÔMICAS E SUA EXPRESSÃO EM ENTEROBACTÉRIAS.....	24

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1 - FREQUÊNCIA DE ESBL POSITIVO X SENSIBILIDADE A CEFOXITINA EM ESCHERICHIA COLI, KLEBSIELLA PNEUMONIAE, KLEBSIELLA OXYTOCA E OUTRAS ESPÉCIES.....	63
---	----

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AMI	amicacina
ATCC	American Type Culture Colection
ATM	aztreonam
CAZ	ceftazidima
CFO	cefoxitina
CIP	ciprofloxacino
CPD	cefpodoxima
CPM	cefepime
CRO	ceftriaxona
CTX	cefotaxima
ERT	ertapenem
ESBL	B-lactamase de espectro ampliado
IMI	imipenem
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIM 50	Concentração Inibitória Mínima para 50% das amostras
CIM 90	Concentração Inibitória Mínima para 90% das amostras
NCCLS	National Committee Clinical Laboratory Standards
PBP	Proteína ligadora de penicilina
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
RFLP	Polimorfismo de fragmentos de restrição
SSPC	Polimorfismo conformacional de fita simples
pl	Ponto isoelétrico
AC	Ácido Clavulânico
EDTA	Etileno Diamino tri-acetato
Da	Dalton
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
BHI	Infusão Cérebro Coração



## RESUMO

A produção de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL) é um importante mecanismo de resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos em Enterobactérias. Sua pesquisa deve ser realizada para evitar que resultados falsos sensíveis para cefalosporinas e aztreonam sejam reportados nos testes de sensibilidade. Além disso, informações sobre a ocorrência de ESBL, contribuem para que medidas preventivas sejam tomadas, a fim de diminuir disseminação desse mecanismo de resistência entre as bactérias. A pesquisa de ESBL é padronizada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) apenas para *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli*, entretanto, as ESBL têm tido crescente incidência também em outras enterobactérias. Para determinação da ocorrência de ESBL em dois hospitais universitários de Curitiba, 498 amostras de enterobactérias foram triadas por disco-difusão, observando-se a redução do halo de sensibilidade a aztreonam, ceftriaxona, cefpodoxima, ceftazidima ou cefotaxima. Entre as amostras bacterianas testadas, 155 foram positivas no teste de triagem para ESBL, das quais 121 (78%) foram confirmadas pelo teste de adição de ácido clavulânico. A ocorrência de ESBL encontrada foi de 24%, sendo em *Klebsiella pneumoniae* de 57,4 %, em *Klebsiella oxytoca* de 21,4% e em *Escherichia coli* de 7,2%. Em outras enterobactérias não-*Klebsiella* spp. e não-*Escherichia coli* a ocorrência foi 21,6%, demonstrando a necessidade da pesquisa de ESBL também nessas espécies. A ceftriaxona e cefotaxima foram os antimicrobianos com maior sensibilidade no teste de triagem (99,2%) e a combinação cefotaxima/cefotaxima + ácido clavulânico foi a mais sensível no teste confirmatório (96,7%).

## ABSTRACT

Production of Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) is an important mechanism of antimicrobial resistance in enterobacteria. Its detection should be made to avoid reports of false susceptibility results by routine susceptibility tests in producer strains, and also gives information for the adoption of control measures to reduce dissemination of this mechanism of resistance among bacteria. Detection is standardized by NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) only for *Klebsiella* spp. and *E. coli*, however, ESBL has increasing occurrence also in other enterobacteria. To determine the occurrence of ESBL in two teaching hospitals of Curitiba, 498 isolates of enterobacteria were tested by disk diffusion to select ESBL-producing bacteria, through the susceptibility reduction of aztreonam, ceftriaxone, cefpodoxime, ceftazidime and cefotaxime, recommended by NCCLS. Out of 498 isolates, 155 were positive in the initial screen test and 121 were confirmed by clavulanic acid disk diffusion test. This work have shown that the occurrence of ESBL in these hospitals is high (24%), with the percentage in *K. pneumoniae* of 57,4%, *K. oxytoca* 21,4% and *E. coli* 7,2%. Among other enterobacteria non-*Klebsiella* spp. and non-*E. coli* the occurrence has 21, 6%, shown that to search of ESBL is necessary also in this species. Ceftriaxone and Cefotaxime were the antibiotics with higher sensitivity for initial screen test (99, 2%) and the combination of cefotaxime/cefotaxime + clavulanic acid was the most sensitive for confirmatory test.

## 1. INTRODUÇÃO

Os membros da família *Enterobacteriaceae* são importantes patógenos humanos, especialmente em ambientes hospitalares, onde causam os mais variados tipos de infecção tais como infecções do trato urinário, pneumonias, meningites e septicemia, entre outras. A patogenicidade e alta incidência de resistência a vários antimicrobianos presentes nessa família é preocupante (SADER, *et al.*, 2001).

A resistência freqüentemente encontrada aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos é, na maioria das vezes, devida a produção de  $\beta$ -lactamases associada ou não a redução na permeabilidade por mutação em porinas de membrana (LIVERMORE, 1995).

Nas últimas décadas têm surgido “novas  $\beta$ -lactamases”, sendo que, atualmente, mais de 340 tipos de  $\beta$ -lactamases são conhecidas (SHAH *et al.*, 2004). Entre os vários tipos encontrados em enterobactérias, as enzimas derivadas de TEM e SHV, são as mais freqüentes. Mutações nos genes que codificam  $\beta$ -lactamases TEM e SHV podem expandir o espectro de atividade dessas enzimas, tornando-as capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas (exceto cefamicinas: cefoxitina e cefotetan), incluindo as de amplo espectro (ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima) e aztreonam, sendo chamadas de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL). As ESBLs são predominantemente derivadas de TEM e SHV; no entanto, algumas enzimas do tipo OXA e CTX-M também mostram atividade contra esses antimicrobianos (BRADFORD, 2001).

As enzimas do tipo AmpC também conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro, bem como a hiperprodução de algumas outras  $\beta$ -lactamases. Assim, a definição original de ESBL, primeiramente baseada nos substratos hidrolisados, recentemente foi restrita àquelas inibidas por ácido clavulânico (STEWART *et al.*, 2001).

Os genes para produção de ESBL são freqüentemente localizados em plasmídeos que podem ser transferidos entre diferentes espécies, disseminando a resistência (GALANI *et al.*, 2002). Esses plasmídeos podem conter genes de

resistência contra outros agentes antimicrobianos, e são altamente estáveis em bactérias multirresistentes. Isso faz com que os isolados bacterianos sejam resistentes a várias classes de antimicrobianos, limitando as opções terapêuticas (MULVEY *et al.*, 2003). O tratamento de escolha para bactérias produtoras de ESBL consiste dos carbapenêmicos,  $\beta$ -lactâmicos resistentes a inativação enzimática (BUSH, 2001).

A incidência de ESBL, assim como o tipo de enzima predominante, varia de região para região, e mesmo entre hospitais da mesma região, sendo importante a realização de estudos epidemiológicos locais com a finalidade de melhorar a detecção das cepas produtoras, bem como alertar os clínicos sobre a possibilidade de falha na terapia com  $\beta$ -lactâmicos (SADER *et al.*, 2001).

O NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) publicou em 1999, métodos para triagem e confirmação da presença de ESBL em *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*. Mais recentemente, o CLSI incluiu também o *Proteus mirabilis*. Os testes de triagem baseiam-se no padrão de sensibilidade das cepas às oximino-cefalosporinas, em especial ceftazidima e cefotaxima. Os testes confirmatórios baseiam-se na comparação da sensibilidade da bactéria na presença de  $\beta$ -lactâmicos, com e sem adição de um inibidor de  $\beta$ -lactamase, como o ácido clavulânico. O aumento na sensibilidade com a adição do inibidor indica a produção de  $\beta$ -lactamases (NCCLS, 2004; CLSI, 2005).

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). A expressão da resistência depende da quantidade da enzima presente, sendo que, nem sempre os inóculos padronizados para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos são suficientes para visualização da resistência. Depende também da afinidade pelo substrato, sendo importante a escolha dos antimicrobianos adequados para os testes de sensibilidade, que variam com o tipo de enzima predominante (BRADFORD, 2001).

Apesar das ESBLs serem mais freqüentes em *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli*, várias outras espécies de enterobactérias têm sido descritas como portadoras desse mecanismo de resistência, tornando necessária a avaliação da necessidade de sua pesquisa também em espécies não-*Escherichia coli* e não-*Klebsiella* spp. A principal dificuldade encontrada para esse propósito é a falta de um método padronizado e as interferências de outros mecanismos de resistência, como enzimas do tipo AmpC e mutações em porinas de membrana (BRADFORD, 2001).

A ocorrência de ESBL em diversas espécies de enterobactérias deve ser determinada com o propósito de verificar a necessidade da pesquisa em outras espécies não-*Escherichia coli* e não-*Klebsiella* spp., e também de avaliar a eficácia dos métodos de detecção utilizados. A sensibilidade e especificidade dos métodos devem ser determinadas a fim de otimizar os testes e ainda prever o tipo de enzima circulante nos hospitais estudados.

## 2. OBJETIVOS

- Isolar e identificar enterobactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL), em amostras clínicas de pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e no Hospital Universitário Cajuru da Pontifícia Universidade Católica;
- Determinar a prevalência da produção de ESBL nas diferentes espécies de enterobactérias isoladas nesses locais;
- Avaliar a necessidade da utilização de métodos de detecção de ESBL em espécies não-*Escherichia coli* e não-*Klebsiella* spp. nos hospitais estudados;
- Determinar o melhor substrato (cefalosporina de terceira geração e/ou aztreonam) para detecção de ESBL;
- Verificar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas produtoras de ESBL isoladas.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. ENTEROBACTÉRIAS

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

Estas bactérias causam uma série de doenças humanas, incluindo 30 a 35% de todos os casos de septicemia, mais de 70% das infecções das vias urinárias e infecções intestinais. Algumas enterobactérias, como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Yersinia pestis*, estão sempre associadas a doenças em seres humanos, enquanto outras, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* são membros da microbiota normal e podem causar infecções oportunistas. As bactérias podem ser adquiridas a partir de um reservatório animal (a maioria das espécies de *Salmonella* e *Yersinia*), ou de um portador humano (*Shigella* e *Salmonella typhi*); ou ainda, por disseminação endógena dos microrganismos do próprio paciente, podendo afetar várias partes do corpo (FARMER, 1995).

Os membros da família *Enterobacteriaceae*, presentes na microbiota normal dos seres humanos, são capazes de causar infecções em vários órgãos, o que os torna potenciais agentes de infecções hospitalares, sendo seu estudo importante nesse ambiente. As enterobactérias são freqüentemente relacionadas a infecções urinárias (CARSON e NARBER, 2004; TRAUTNER e DAUROWCH, 2004;

BABCOCK *et al.*, 2003; SU *et al.*, 2003), pneumonias associadas a ventilação mecânica (CHASTRE e FAGON, 2002), pneumonias nosocomiais em pacientes pediátricos (ZAR e COTTON, 2002), septicemia neonatal (TAKAHASHI *et al.*, 2004; GUPTA, 2002), infecções de feridas em pé diabético (O'HARA *et al.*, 2000) e enterocolite necrotizante em recém-natos (BOCCIA *et al.*, 2001).

As enterobactérias podem ser isoladas como agentes de infecções oportunistas dos mais variados tipos, como meningite pós-cirúrgica (PARODI *et al.*, 2003), bacteremia, endocardite, infecção intra-abdominal, meningite, infecções oftálmicas, osteomielite (SANDERS e SANDERS, 1997), meningoencefalite, septicemia em pacientes neutropênicos, urosepse neonatal, corioamnionites em imunocomprometidos (O'HARA *et al.*, 2000), pneumonias de alcoolistas e pacientes com obstrução pulmonar crônica (PODSCHUN e ULLMAN, 1998).

### 3.1.1. Resistência aos Antimicrobianos em Enterobactérias

As enterobactérias são de grande importância no ambiente hospitalar, não apenas por seus fatores de virulência, mas porque podem apresentar resistência a várias classes de antimicrobianos. Estudos de vigilância de resistência aos antimicrobianos em ambiente hospitalar mostram que na América Latina a resistência em Gram -negativos é mais preocupante que em Gram -positivos (SADER, 2000). Dentre os vários antimicrobianos usados na terapia antimicrobiana contra Gram -negativos, os que apresentam índices mais críticos de resistência são os beta-lactâmicos, as quinolonas, o sulfametoxazol e os aminoglicosídeos. O que dificulta ainda mais a escolha da terapia adequada é o fato de muitas vezes a mesma bactéria apresentar vários mecanismos combinados, sendo resistente a quase todas as classes de antimicrobianos disponíveis (OPLUSTIL *et al.*, 2001; GALES *et al.*, 2002a; GALES *et al.*, 2002b; SADER *et al.*, 2003; SADER, 2000).



### 3.1.2. Resistência aos antimicrobianos $\beta$ -lactâmicos em enterobactérias

Os  $\beta$ -lactâmicos representam a classe mais variada e mais amplamente utilizada de antimicrobianos. Este grupo que inclui penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos é responsável por aproximadamente 50% dos antimicrobianos utilizados de forma sistêmica, devido principalmente à sua baixa toxicidade e a grande variedade de compostos disponíveis. A classificação mais utilizada é baseada nas diferenças estruturais do antimicrobiano; porém, subdivisões baseadas no espectro de atividade e na estabilidade dos compostos frente aos mecanismos de resistência bacteriana vêm sendo utilizadas (LIVERMORE, 1991). De acordo com a estrutura e espectro de atividade as penicilinas com ação contra Gram -negativos são divididas em aminopenicilinas (e.g. ampicilina), carboxipenicilinas (e.g. carbenicilina) e ureidopenicilinas (e.g. piperacilina). As cefalosporinas são divididas em cefalosporinas de primeira (e.g. cefalotina); segunda (e.g. cefoxitina), terceira (e.g. ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona) e quarta geração (e.g. cefepime). Outros grupos de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são os monobactâmicos e carbapenêmicos (LIVERMORE, 2001).

As cefalosporinas de terceira e quarta-gerações, monobactams e carbapenens são os  $\beta$ -lactâmicos mais utilizados no tratamento de infecções causadas por enterobactérias (MENDES *et al.*, 2000).

A atividade dos  $\beta$ -lactâmicos é decorrente da habilidade desses compostos de interferir com a síntese do peptidoglicano, componente fundamental da parede celular bacteriana. A ligação desses antimicrobianos às proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) prejudicam o alongamento e a divisão celular (SPRATT e CROMII, 1988), além de promoverem a liberação de autolisinas letais para as bactérias (BEDNENKO *et al.*, 1998)

As bactérias podem tornar-se resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos através de três mecanismos principais, que são a alteração do sítio de ação (PBPs), a redução da permeabilidade da membrana externa bacteriana e a produção de  $\beta$ -lactamases (SANDERS e SANDERS, 1992).

A alteração do sítio de ação dos  $\beta$ -lactâmicos é uma característica mais comum em Gram -positivos e em *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*, mas já foi encontrada em *Escherichia coli*, onde a modificação de PBP 3 foi associada à resistência à cefalexina e a algumas outras cefalosporinas (ROCH *et al.*, 2000). Resistência ao imipenem pode estar relacionada a alterações nas PBPs em *Enterobacter aerogenes* (BORNET *et al.*, 2003). As mutações que alteram as PBPs fazem com que elas passem a apresentar baixa afinidade de ligação aos  $\beta$ -lactâmicos, ou levam à produção de PBPs suplementares com baixa afinidade aos  $\beta$ -lactâmicos, capazes de substituir as PBPs que se encontram inibidas (LIVERMORE, 1991).

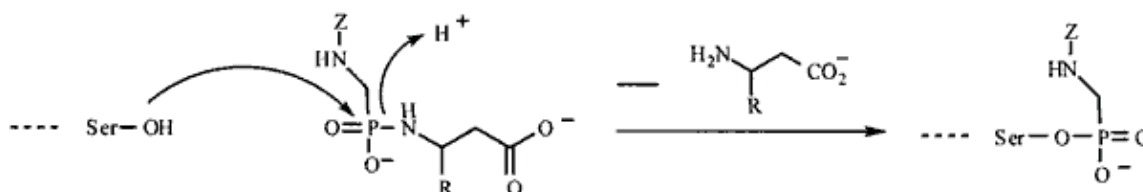
A alteração da permeabilidade da membrana externa só ocorre em Gram -negativos, e geralmente é acompanhada da produção de  $\beta$ -lactamases. A perda de um ou mais canais da membrana externa pode implicar em altos níveis de resistência, se estiver associada à inativação enzimática (NIKAIDO, 1989). A perda das porinas OmpC e OmpF como causa de resistência tem sido relatada principalmente em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (NIKAIDO, 1989). Em *Klebsiella pneumoniae* duas porinas foram caracterizadas, a porina OmpK35 (homóloga a OmpF de *Escherichia coli*) e a OmpK36 (homóloga a OmpC de *Escherichia coli*) (ALBERTI *et al.*, 1995). A perda da porina OmpK36 está associada a resistência à cefoxitina e ao aumento da concentração inibitória mínima (MIC) de cefalosporinas e quinolonas (MARTINEZ-MARTINEZ *et al.*, 1998). A associação entre perda de porinas e resistência ao imipenem foi descrita em cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ACT-1, uma  $\beta$ -lactamase tipo AmpC mediada por plasmídios (RAHAL, 2000). Em outros membros da família *Enterobacteriaceae* como *Enterobacter cloacae* e *Providencia rettgerii*, a resistência aos carbapenêmicos também tem sido relacionada à diminuição da permeabilidade da membrana externa, associada à hidrólise pela hiperprodução de  $\beta$ -lactamases cromossômicas (CORNAGLIA *et al.*, 1995).

O principal mecanismo de resistência das bactérias Gram -negativas aos  $\beta$ -lactâmicos é decorrente da produção de  $\beta$ -lactamases, enzimas que catalisam a

hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, impossibilitando assim sua atividade antimicrobiana (LIVERMORE, 1995).

### 3.2. Beta-lactamases

A produção de  $\beta$ -lactamases é a principal forma de resistência bacteriana aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. Elas têm sido designadas pelo Comitê de Nomenclatura Internacional em Bioquímica (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry) como enzimas que hidrolisam amidas, amidinas ou outras pontes C-N, separando as amidas cíclicas do anel  $\beta$ -lactâmico. Algumas  $\beta$ -lactamases utilizam zinco para romper o anel  $\beta$ -lactâmico; entretanto, a maioria age via éster de serina, pelo mecanismo representado a seguir (GHUYSEN, 1993).



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

### 3.2.1. Histórico das $\beta$ -lactamases

A emergência da resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos surgiu antes do primeiro  $\beta$ -lactâmico ser desenvolvido. A primeira  $\beta$ -lactamase cromossômica foi identificada em *Escherichia coli* antes da penicilina começar a ser usada na prática clínica. Assim que se iniciou o uso da penicilina, emergiu a resistência em *Staphylococcus aureus*, devido a produção de penicilinase codificada por plasmídios, tendo essas  $\beta$ -lactamases rápida disseminação entre os isolados clínicos de *S. aureus* e outras espécies de *Staphylococcus* (BRADFORD, 2001).

Muitos gêneros de bactérias Gram -negativas apresentam ocorrência natural de  $\beta$ -lactamases mediadas por cromossomos. Essas enzimas são estruturalmente relacionadas com as proteínas ligadoras de penicilina e apresentam homologia em sua seqüência (GHUYSEN, 1993). Seu surgimento pode ser devido à pressão seletiva exercida por microrganismos do solo, produtores de  $\beta$ -lactâmicos, como fungos e bactérias (SHAH *et al.*, 2004). A primeira  $\beta$ -lactamase mediada por plasmídios foi descrita em 1965 e encontrada em uma cepa de *Escherichia coli*, isolada de hemocultura de uma paciente chamada Temoniera, na Grécia, sendo assim chamada TEM (DATT e KONTOMICHALOU, 1965). A origem de genes mediados por plasmídeos e transposons facilitou a disseminação de TEM-1 para outras espécies bacterianas. Poucos anos após o primeiro isolamento, as  $\beta$ -lactamases se espalharam pelo mundo e podem ser encontradas em diferentes espécies de enterobactérias, além de *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (MATTHEW, 1979). Outra  $\beta$ -lactamase comumente mediada por plasmídeos encontrada em *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* é a SHV-1 (sulfidril-variável). A  $\beta$ -lactamase SHV-1 é codificada em cromossomos na maioria dos isolados de *K. pneumoniae*, mas é usualmente mediada por plasmídeo em *E. coli* (CHAMPS *et al.*, 1989).

Nos últimos 20 anos novos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos foram desenvolvidos, e especificamente designados como resistentes à ação hidrolítica das  $\beta$ -lactamases. No entanto, com o uso abusivo desses novos antimicrobianos,

novas  $\beta$ -lactamases emergiram. Presumivelmente, o uso dessas novas drogas selecionou mutantes portando novas  $\beta$ -lactamases. Uma dessas novas classes de antimicrobianos, chamada oximino-cefalosporinas (cefalosporinas de terceira geração), começaram a ser amplamente usada no tratamento de infecções graves por bacilos Gram -negativos, na década de 1980 (MEDEIROS, 1997). Não surpreendentemente, a resistência mediada por  $\beta$ -lactamases emergiu rapidamente, sendo essas enzimas chamadas de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), devido ao seu amplo espectro de atividade, especialmente contra oximino-cefalosporinas (BRADFORD, 2001).

Novas enzimas foram surgindo e por serem a principal causa de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em bacilos Gram -negativos, elas têm sido objeto de extensivos estudos microbiológicos, bioquímicos e genéticos. Estes estudos já revelaram a existência de mais de 340 tipos de proteínas bacterianas, capazes de interagir com variados compostos contendo anel  $\beta$ -lactâmico (SHAH *et al.*, 2004). Devido a essa grande variedade, esquemas de classificação baseados em diferentes características das enzimas vêm sendo propostos (BUSH, JACOBY E MEDEIROS, 1995).

### 3.2.2. Classificação das $\beta$ -lactamases

Classificações baseadas na estrutura molecular foram primeiramente propostas por AMBLER (1980), quando somente quatro  $\beta$ -lactamases tinham sua seqüência de aminoácidos conhecida; desta forma, as serina- $\beta$ -lactamases foram designadas classe A, em contraste com metalo-  $\beta$ -lactamases, que foram incluídas na classe B. A classe C foi descrita posteriormente, e a classe D, que hidrolisa oxacilina, foi segregada das outras serina- $\beta$ -lactamases (BUSH, JACOBY e MEDEIROS, 1995).

A classificação funcional, baseada em características estruturais e bioquímicas, proposta por BUSH, JACOBY e MEDEIROS (1995), divide as  $\beta$ -lactamases em quatro grupos definidos de acordo com seus substratos e

sensibilidade aos inibidores. O grupo 1 é composto de cefalosporinases não inibidas por ácido clavulânico e pertencentes à classe molecular C; o grupo 2 inclui penicilinases, cefalosporinases e  $\beta$ -lactamases de espectro estendido e que têm seu sítio ativo sensível aos inibidores, podendo ser das classes moleculares A ou D; o grupo 3 de metalo- $\beta$ -lactamases, hidrolisa penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos e é pouco inibido por moléculas contendo anel  $\beta$ -lactâmico, e inibidas por EDTA, pertencente à classe molecular B; e o grupo 4 é composto por penicilinases não inibido pelo ácido clavulânico, pertencente ao grupo molecular D. O grupo 2 pode ser subdividido em 2b (derivados de TEM e SHV), 2be (ESBLs), 2br (afinidade diminuída com inibidores) e 2f (hidrolisam carbapenêmicos e são fracamente inibidas por ácido clavulânico, com serina no sítio ativo).

Entre as enzimas mencionadas, três tipos têm tido sua incidência em ascensão no mundo todo. São as cefalosporinases do grupo funcional 1 mediadas por plasmídeos, as metalo- $\beta$ -lactamases do grupo funcional 3 e o grupo 2be das ESBLs, que é o maior dos grupos citados (BUSH, 2001).

As cefalosporinases do grupo 1 foram originalmente conhecidas como enzimas cromossômicas (AmpC) de *Pseudomonas aeruginosa* ou *Enterobacteriaceae*, que podem ser induzidas por  $\beta$ -lactâmicos como cefoxitina ou ampicilina. Com a introdução de ceftazidima e cefotaxima, a seleção de cepas hiperprodutoras da enzima começou a ficar mais comum (SHANNON e PHILLIPS, 1986). A hiperprodução dessas enzimas está freqüentemente associada com a perda de porinas na membrana externa das bactérias, levando em alguns casos não somente a altos níveis de resistência às cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos, mas também a carbapenêmicos (POIREL *et al.*, 2004). Genes codificando para enzimas do grupo 1 são encontradas em grande número de cópias em plasmídeos. Esses podem ser transmitidos promiscuamente entre as enterobactérias, resultando em cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* com altos níveis de cefalosporinases do grupo 1. Algumas dessas enzimas incluem MIR-1, ACT-1 e série FOX (BLACK, THOMSON e PITOUT, 2004; COUNDRON, HANSON e CLIMO, 2003). Além disso, as cefalosporinases do

grupo 1, codificadas por plasmídeos, encontram-se freqüentemente associadas a outras  $\beta$ -lactamases no mesmo organismo (PITOUT *et al.*, 2003).

As metalo- $\beta$ -lactamases são capazes de hidrolisar  $\beta$ -lactâmicos de todas as classes químicas, exceto os monobactâmicos, e não são inibidas por inibidores de  $\beta$ -lactamases como o clavulonato ou o tazobactam. Geralmente ocorrem em microrganismos que possuem outra  $\beta$ -lactamase não correlacionada (YAN *et al.*, 2004).

As ESBLs conferem resistência às oximino-cefalosporinas, monobactâmicos e ao cefepime em menor escala (BUSH, 2001).

TABELA 1 - ESQUEMA DE CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL PROPOSTO POR BUSH, JACOBY E MEDEIROS, 1995.

Classe Funcional	Classe molecular	Substrato preferido	Inibido por		Enzimas representantes
			AC	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	-	-	AmpC; MIR-1
2a	A	Penicilinas	+	-	Penicinases de Gram - positivas
2b	A	Penicilinas; Cefalosporinas	+	-	TEM-1;TEM-2 E SHV-1
2be	A	Penicilinas; Cefalosporinas (amplo-espectro); 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; Cloxacilina	±	-	OXA-1 a OXA-11, PSE-2
2e	A	Cefalosporinas	+	-	Cefalosporinase induzível 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 $\beta$ -lactâmicos	-	+	L1 de <i>Xanthomonas maltofilia</i> , CcrA de <i>Bacteroides fragilis</i>
4	?	Penicilinas	-	?	Penicilinases de <i>Burkholderia cepacea</i>

FONTE: BUSH, K.; JACOBI G.A.; MEDEIROS,A.A.. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 39, p. 1211-1233, 1995.

NOTAS ESPECÍFICAS: AC= ácido Clavulânico; (+) inibida ; (-) não inibida; (±) pouco inibida.

### 3.2.3 Distribuição das $\beta$ -lactamases

Os genes que codificam a produção de  $\beta$ -lactamases podem estar localizados em cromossomos ou plasmídeos bacterianos, sendo as enzimas conseqüentemente designadas cromossômicas ou plasmídicas. Quando a bactéria já possui uma  $\beta$ -lactamase cromossômica e passa a expressar uma outra  $\beta$ -lactamase, juntamente com a primeira, devido à aquisição de genes codificados em plasmídeos ou transposons, a  $\beta$ -lactamase adquirida é então chamada de  $\beta$ -lactamase secundária (LIVERMORE, 1995).

#### 3.2.3.1. $\beta$ -lactamases cromossômicas em enterobactérias

As  $\beta$ -lactamases são ubíquas em enterobactérias, exceto em *Salmonella* spp., mas variam muito em quantidade, modo de produção e em sua contribuição para a resistência. Algumas espécies possuem enzimas do tipo molecular A, mas a maioria apresenta a classe molecular C. A expressão pode ser induzível, sendo produzida somente na presença de  $\beta$ -lactâmicos indutores; ou constitutiva, produzidas na presença ou ausência de  $\beta$ -lactâmicos em quantidade variável, de acordo com a espécie em que é encontrada (Tabela 2).

As espécies *Escherichia coli* e *Shigella* spp. possuem níveis insignificantes de enzimas da classe C, chamadas AmpC não induzíveis. Essas bactérias podem ser suscetíveis a ampicilina e cefalosporinas de primeira geração. A resistência só ocorre com antimicrobianos que possuam baixa permeabilidade como as benzilpenicilinas. A resistência a outros antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos demonstra aquisição de  $\beta$ -lactamases secundárias. Eventualmente, *E. coli* pode produzir grande quantidade de AmpC e conferir maior resistência, persistindo no entanto, a sensibilidade aos carbapenêmicos. Essas enzimas não são inibidas por ácido clavulânico e o nível de resistência promovido por elas é menor que em *Enterobacter* spp. (NORMARK, GRUNDSTROM e BERGSTROM, 1980).



TABELA 2 -  $\beta$ -LACTAMASES CROMOSSÔMICAS E SUA EXPRESSÃO EM ENTEROBACTÉRIAS

Organismo	Enzima	Classe molecular	Classe funcional	Modo de expressão			
				Induzível	Constitutiva		
					Mínima	Média	Alta
<i>Escherichia coli</i>	AmpC	C	1	-	+	-	Rara
<i>Shigella</i> spp.	AmpC	C	1	-	+	-	Rara
<i>Enterobacter</i> spp.	AmpC	C	1	+	Rara	-	Freq.
<i>Citrobacter freundii</i>	AmpC	C	1	+	Rara	-	Freq.
<i>Morganella morganii</i>	AmpC	C	1	+	-	-	Freq.
<i>Providencia</i> spp.	AmpC	C	1	+	Rara	-	Rara
<i>Serratia</i> spp.	AmpC	C	1	+	-	-	Freq.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV-1	A	2b	-	-	+	Rara
<i>Klebsiella oxytoca</i>	K1	A	2be	-	-	+	Freq.
<i>Citrobacter diversus</i>	Cefuroximase	A	2e	+	Rara	-	Rara
<i>Proteus vulgaris</i>	Cefuroximase	A	2e	+	-	-	Rara
<i>Proteus penneri</i>	Cefuroximase	A	2e	+	-	-	Rara
<i>Proteus mirabilis</i>	<sup>a</sup>			-	+	-	-

FONTE: LIVERMORE, D. M.; BROWN, D. F. J. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 48, n.1, p. 59-64, 2001.

NOTAS ESPECÍFICAS: (a) não definida (+) modo normal de expressão, típico da espécie; (Freq.) frequentemente encontrada, quantidade varia de 10 a 50% de acordo com local; (rara) menor que 10%.

*Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp., *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* e *Providencia rettgeri* possuem enzimas do tipo AmpC que têm sua expressão induzível, sendo produzidas em quantidade insignificante na ausência de  $\beta$ -lactâmicos, e em grandes quantidades quando eles estão presentes. A hiperprodução permanente pode ocorrer devido a mutações no *locus amp D*. A expressão da resistência vai depender da habilidade em hidrolisar o composto em questão, do potencial indutor do mesmo e do nível de expressão da  $\beta$ -lactamase. Ampicilina e cefalosporinas de primeira geração são lábeis e fortes

indutores, enquanto cefalosporinas de amplo espectro, ureidopenicilinas e carboxipenicilinas são suscetíveis, porém, com baixo potencial indutor, não apresentando resistência nos testes de sensibilidade, exceto em cepas com produção desreprimida. Os carbapenêmicos são fortes indutores; porém, estáveis a hidrólise pelas  $\beta$ -lactamase e eficientes contra cepas com produção de  $\beta$ -lactamase induzível ou desreprimida. Cefepime e ceftiroma são mais estáveis contra as cepas com produção de  $\beta$ -lactamase desreprimida que outras cefalosporinas, devido a sua grande permeabilidade. Inibidores de  $\beta$ -lactamases não são eficientes, no entanto são fortes indutores (SANDERS e SANDERS, 1987).

Geralmente a cefoxitina tem atividade contra *Serratia* spp., *Providencia* spp. e *Morganella morgannii*, mas não contra outras espécies. Isso ocorre porque a quantidade de enzima pode ser até 10 vezes menor nessas espécies (MORITZ e CARSON, 1986). Outra diferença interespecie é o fato do tazobactam poder inibir a enzima de *M. morgannii* o suficiente para potencializar a atividade da piperacilina, mas não a de outras espécies (AKOVA, BONFIGLIO e LIVERMORE, 1990). E ainda, alguns isolados de *Citrobacter freundii* e *Providencia* spp. podem parecer suscetíveis a ampicilina (LIVERMORE, 1995).

A combinação com outros mecanismos, como redução da permeabilidade, pode conferir resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos incluindo os carbapenêmicos (LIVERMORE, 1995).

O gênero *Klebsiella* geralmente produz  $\beta$ -lactamases cromossômicas da classe A. Muitas amostras de *K. pneumoniae* produzem  $\beta$ -lactamases cromossômicas do tipo SHV-1, que ocorrem em outras enterobactérias como enzimas codificadas por plasmídeos (MATTHEW, 1979). Amostras de *K. oxytoca* possuem tipicamente enzimas do tipo K1 ou KOXY (ARAKAWA, 1989). Todas as  $\beta$ -lactamases de *Klebsiella* spp. são constitutivas e usualmente produzidas em baixo nível; no entanto, são suficientes para proteger contra ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina. Algumas cepas podem não expressar a enzima e serem sensíveis a esses antimicrobianos. Deve-se ter cuidado ao

interpretar os resultados do antibiograma, pois a concentração inibitória mínima (CIM) é altamente dependente do inóculo (QUEENAM *et al.*, 2004)

Também as cefalosporinas de menor espectro podem ser inativadas pelas enzimas; no entanto, podem apresentar baixa CIM nos testes de sensibilidade quando a produção da enzima ocorre em pequena quantidade (LIVERMORE, 1995).

A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro pode ocorrer em *Klebsiella pneumoniae* pela aquisição de plasmídeos, contendo genes codificadores para  $\beta$ -lactamases de amplo espectro (BRADFORD, 2001). Em *Klebsiella oxytoca* a resistência pode ser devida a uma mutação que leva à superprodução da enzima K1 cromossômica. Na bactéria, a hiperprodução da enzima K1 tem como características a resistência a quase todas as penicilinas, cefuroxima e aztreonam; a resistência ou susceptibilidade intermediária a cefotaxima e ceftriaxona e susceptibilidade a ceftazidima. Esta última característica a distingue das enzimas TEM e SHV de amplo espectro, que geralmente conferem resistência a ceftazidima. Além disso, a grande quantidade de enzima presente torna as cepas resistentes a combinações com sulfonas ou com ácido clavulânico. A enzima K1 tem seqüência de aminoácidos com 40% de homologia com enzimas do tipo TEM, sendo considerada da classe molecular A (ARAKAWA *et al.*, 1989).

*Proteus vulgaris* e *Citrobacter diversus* produzem  $\beta$ -lactamases cromossômicas da classe A, às vezes referidas como cefuroximas (grupo 2e de BUSH, JACOBI e MEDEIROS). Essas enzimas têm propriedades hidrolíticas semelhantes à enzima K1, sendo ativas contra penicilinas, cefuroxima, ceftriaxona e cefotaxima, mas, não contra ceftazidima, cefamicinas e carbapenêmicos; ao contrário, porém, das enzimas K1 que são induzíveis e tem atividade mínima contra aztreonam (BUSH, JACOBI e MEDEIROS, 1995).

Ampicilina, amoxicilina e cefalosporinas de primeira e segunda geração são lábeis e fortes indutores apresentando CIM elevada em cepas induzíveis ou desreprimidas. Ureido (piperacilina) e carboxipenicilinas (carbenicilina), cefotaxima

e ceftriaxona são lábeis, porém pouco indutores; e, portanto, permanecem ativos nas cepas induzíveis, sendo a resistência observada para esses antimicrobianos apenas quando ocorre a produção da enzima devido a desrepressão do gene. Diferentemente das cepas de *Enterobacter* e *Citrobacter freundii*, mesmo os mutantes desreprimidos continuam sensíveis a ceftazidima, cefamicinas e carbapenêmicos. Além disso, as enzimas podem ser inibidas por ácido clavulânico ou outro inibidor (OLIVA *et al.*, 1990).

Em *Proteus mirabilis*, a expressão de enzimas cromossômicas é negligenciável, não ocorrendo relatos de superprodução. A resistência pode ocorrer quando houver aquisição de  $\beta$ -lactamases secundárias (LIVERMORE, 1995).

#### 3.2.3.2. $\beta$ -lactamases Mediadas por Plasmídeos e outras $\beta$ -lactamases Secundárias em Enterobactérias

As enzimas de origem plasmidiana, embora muito variáveis, podem ser divididas em alguns tipos predominantes. Geralmente são diferentes das cromossômicas, mas algumas coincidências existem. O tipo SHV-1, por exemplo, é idêntico à  $\beta$ -lactamase cromossômica de *Klebsiella pneumoniae* (MATTHEW, 1979); também os tipos BIL-1, CMY-1, CMY-2, CMY-3, FOX-1, LAT-1, MIR-1 e MOX-1 são  $\beta$ -lactamases AmpC cujos genes se originaram em cromossomos de *Enterobacter* e *Citrobacter* spp. (BUCH, JACOBY e MEDEIROS, 1995). De modo semelhante, acredita-se que todas as  $\beta$ -lactamases plasmidiana têm origem cromossômica, mas a fonte de muitas é desconhecida. A distribuição das enzimas em plasmídeos garante sua transmissibilidade e disseminação. Muitas das enzimas têm seus genes localizados em transposons, facilitando sua disseminação entre diferentes plasmídeos e microrganismos. Os transposons podem ainda inserir-se em cromossomos, e quando isso ocorre em espécies que já possuem uma  $\beta$ -lactamase, como *Serratia* spp. e *Enterobacter* spp., as enzimas são chamadas de  $\beta$ -lactamases secundárias (LIVERMORE, 1995).

O tipo mais comumente encontrado em enterobactérias é o tipo TEM-1, sendo responsável por 50% da resistência de *Escherichia coli* a ampicilina. Os tipos TEM-2, SHV-1 e OXA-1 também são comuns; porém, em frequência menor, dentre muitos outros tipos (BUCH, 2001).

As  $\beta$ -lactamases clássicas TEM-1, TEM-2, SHV-1, OXA-1, PSE-1 e PSE-4 possuem mínima atividade contra as cefalosporinas de amplo espectro. As enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1, conferem resistência às cefalosporinas de espectro estreito e penicilinas anti-bacilos gram -negativos (anti-BGN) (JACOBY e CARRERAS, 1990). A enzimas do tipo OXA e PSE, das quais a mais comum em enterobactérias é o tipo OXA-1, conferem resistência a ampicilina e ureidopenicilinas, sendo a potencialização da atividade desses antimicrobianos por inibidores considerada baixa. Cefalosporinas de espectro estreito são pouco hidrolisadas e as de amplo espectro são resistentes. Os tipos PSE-1 e PSE-4 têm atividades semelhantes à classe TEM, sendo mais comuns em cepas de *Pseudomonas spp.*, freqüentemente resistentes à ação de inibidores, podendo esta característica ser dependente da permeabilidade à droga e às bombas de efluxo (LIVERMORE, 1991).

As  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL) são capazes de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam, além das penicilinas anti-BGN. Muitas ESBLs são mutantes TEM-1, TEM-2 e SHV-1, com um a quatro aminoácidos substituídos. Essas trocas correspondem a menos de 2% da seqüência da enzima, e são suficientes para remodelar o sítio ativo e torná-lo capaz de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro (BRADFORD, 2001).

As metalo- $\beta$ -lactamases codificadas em plasmídeos já foram encontradas em enterobactérias, conferindo resistência aos carbapenêmicos em *Klebsiella pneumoniae* (GIAKKOUP *et al.*, 2003).

A habilidade das  $\beta$ -lactamases em conferir resistência depende da localização das enzimas, da eficiência hidrolítica, da quantidade de enzima produzida e das condições físico-químicas do meio (LIVERMORE, 1995).

Quanto à localização, as  $\beta$ -lactamases dos gram - positivos são extracelulares, e dependendo das condições de crescimento, podem se aderir à membrana citoplasmática. Em contraste, em gram -negativos encontram-se no espaço periplasmático, podendo alcançar concentrações maiores e agir de maneira mais eficaz sobre os  $\beta$ -lactâmicos que estão atravessando esse espaço para atingir as PBPs (BUSH, JACOBI e MEDEIROS, 1995). A eficiência hidrolítica depende do tipo da enzima e sua cinética, enquanto a quantidade depende da regulação da expressão do gene e da presença de indutores.

A interferência dos fatores físico-químicos do meio deve ser minimizados nos testes de sensibilidade, pela padronização dos meios de cultura utilizados, quanto à presença de íons e pH. Além disso, a expressão da resistência depende do inóculo bacteriano (LIVERMORE, 1995).

#### 3.2.4 Testes para Detectar a Produção de $\beta$ -lactamases

Os principais testes disponíveis comercialmente para detecção das  $\beta$ -lactamases podem ser divididos em três grupos: testes cromogênicos, testes acidimétricos e testes iodométricos.

Os testes cromogênicos são os mais utilizados, e detectam a capacidade da  $\beta$ -lactamase em hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico de uma cefalosporina cromogênica (cefalosporina colorida), ocorrendo mudança de cor quando há ruptura do anel  $\beta$ -lactâmico. O teste mais utilizado é o do Nitrocefim® (mudança de cor para rosa ou vermelho), que pode ser realizado em discos ou fitas impregnadas com o reativo onde as amostras bacterianas são colocadas (LUCAS, 1979).

O teste acidimétrico baseia-se na alteração do pH. Quando a penicilina é hidrolisada pela  $\beta$ -lactamase ocorre a produção do ácido penicilínico e diminuição do pH. A redução do pH é avaliada por um indicador de pH (vermelho de fenol), ocorrendo mudança da cor vermelha para amarela quando o teste é positivo (LUCAS, 1979).

O teste iodométrico baseia-se na descoloração do complexo amido-iodo pelo ácido penicilínico, da cor do azul para incolor (teste positivo). Esse teste é trabalhoso, entretanto, algumas vezes já vem incorporado aos painéis de microdiluição disponíveis comercialmente. Os testes acidimétrico e iodométrico podem ser realizados com suspensões bacterianas ou fitas de papel-filtro impregnadas com esses reagentes (LUCAS, 1979).

Os testes de detecção de  $\beta$ -lactamases dividem as bactérias em produtoras e não produtoras, sem no entanto, identificar o tipo de  $\beta$ -lactamase presente. Podem ser úteis em ocasiões específicas como na detecção da produção de  $\beta$ -lactamases em *Haemophilus* sp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus* sp. e *Enterococcus* sp., enzimas com origem geralmente plasmidiana e de grande relevância clínica. Em enterobactérias, não têm grande utilidade, já que o tipo de enzima presente é bastante variável, sendo clínica e epidemiologicamente importante a distinção entre elas (SWENSON, *et al.*, 1995; LIVERMORE, 1995).

Os métodos biológicos baseados em padrões de crescimento das cepas frente aos antimicrobianos possibilitam prever o tipo de enzima presente, através dos padrões particulares de resistência, que são obtidos com a presença de  $\beta$ -lactamases específicas.

Características importantes a serem observadas são a sensibilidade com e sem inibidores, a sensibilidade a ceftazidima para diferenciar ESBL e K1, a sensibilidade a cefoxitina, como indicadora de enzimas induzíveis em *Enterobacter* spp. e *Citrobacter freundii*, a sensibilidade a carbapenems que são resistentes à ação da maioria das  $\beta$ -lactamases (exceto metalo- $\beta$ -lactamases e carbapenases da classe A) e a sensibilidade ao cefepime para ajudar a diferenciar AmpC e ESBL (LIVERMORE, 1995; BUSH JACOBI e MEDEIROS, 1995; BUSH, 2001). Todas as características servem para prever o tipo de enzima, mas requerem confirmação.

Recomenda-se que seja determinado o padrão de sensibilidade a antimicrobianos do microrganismo produtor de  $\beta$ -lactamase, e posteriormente estudar as propriedades bioquímicas da enzima purificada e a sua seqüência de

aminoácidos. Assim, podem-se compreender as contribuições da enzima nas propriedades observadas no fenótipo, formas de disseminação e medidas preventivas (BUSH, 2001). Porém, a realização desse testes é impraticável na rotina laboratorial, limitando-se a trabalhos acadêmicos que devem ser divulgados, a fim de contribuir para a detecção e controle dos mecanismos de resistência, por técnicas mais simplificadas e realizáveis pelos laboratórios clínicos.

### 3.3. Beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL)

#### 3.3.1. Origem e Evolução

O primeiro isolado clínico expressando ESBL foi identificado na Alemanha por KNOTHE (1983). Em 1985, o primeiro surto hospitalar causado por bactérias produtoras de ESBL ocorreu na França e depois nos EUA, no fim da década de 1980 e início da de 1990. O número de variantes de ESBL identificados tem crescido muito desde 1983, demonstrando a rápida evolução dessas enzimas. Mais de 100 variantes naturais são conhecidas até hoje, e esta lista continua a crescer (SHAH , 2004).

As ESBLs têm sido classificadas em nove distintos grupos evolucionários e estruturais, de acordo com sua seqüência de aminoácidos: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES e OXA. As maiores famílias são formadas pelo tipo TEM e SHV, que incluem as primeiras variantes de ESBL identificados e que permaneceram como os tipos prevalentes. As enzimas do tipo OXA, as únicas pertencentes à classe D, representam uma família de ESBL relativamente prevalente. As enzimas do tipo TEM variam de TEM-1 e TEM-2 , as do tipo SHV de SHV-1 (grupo 2b) e as do tipo OXA de OXA-2 e OXA-10 (grupo 2d). A origem das enzimas não é clara, com exceção das enzimas SHV que parecem ter relação com enzimas cromossomais SHV-1 de *Klebsiella pneumoniae*. As semelhanças estruturais sugerem origens comuns em muitos casos. As mutações mais importantes são aquelas que expandem o espectro do sítio ativo. Estas mutações



são pesquisadas em estudos epidemiológicos dos tipos enzimáticos (BRADFORD, 2001).

A pressão seletiva que direciona a evolução das ESBLs tem sido atribuída ao intenso uso de oximino-cefalosporinas. As ESBLs freqüentemente demonstram preferência seletiva à diferentes oximino-cefalosporinas, sendo a seleção de uma variante específica em um hospital atribuída ao padrão específico do uso de antimicrobianos. Mas a pressão não pode explicar todo o fenômeno da evolução e epidemiologia das ESBLs. A forte pressão seletiva pelo uso de  $\beta$ -lactâmicos faz com que ocorra aumento na incidência de ESBL, pela seleção de bactérias com mutações em regiões codificadoras, mutações em regiões promotoras e bactérias com número de cópias do gene aumentado, entre outros. Algumas mutações alteram a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, devido ao aumento na expressão da enzima, mudança nos substratos hidrolisados e variação na susceptibilidade aos inibidores (GNIADKOWSKI, 2001).

Em anos recentes, as ESBLs começaram a ser prevalentes em espécies produtoras de AmpC como *Enterobacter sp.*, *Citrobacter freundii* e *Serratia marcescens*. Cepas produtoras de ESBL e AmpC simultaneamente, já foram identificadas em vários trabalhos, sendo difícil a sua detecção, pois as enzimas AmpC mascaram o efeito inibitório obtido com ácido clavulânico nas bactérias produtoras de ESBLs (GNIADKOWSKI, 2001).

### 3.3.2. Caracterização, Susceptibilidade e Características Bioquímicas.

A maioria das ESBLs pertencem à classe molecular A de AMBLER (1980). As enzimas da classe A são caracterizadas por possuírem serina no sítio ativo, terem massa molecular de aproximadamente 29 KDa e por hidrolisarem preferencialmente penicilinas. A classe A inclui enzimas como TEM-1, SHV-1 e penicilinases encontradas em *Staphylococcus aureus*.

Na classificação funcional de BUSH, JACOBY e MEDEIROS (1995), as ESBLs situam-se no grupo 2be. São capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas (incluindo as de amplo espectro) e monobactams. As mutações no

sítio ativo que as tornam capazes de degradar antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro, fazem com que não sejam tão eficientes na hidrólise de penicilinas, quanto às enzimas originais. Além disso, essas mutações resultam no aumento da susceptibilidade dessas enzimas aos inibidores de  $\beta$ -lactamases. As ESBLs não são ativas contra cefamicinas, e muitas cepas são susceptíveis a cefoxitina e cefotetan. No entanto, cepas produtoras de ESBL podem ser resistentes a cefamicinas quando a permeabilidade estiver diminuída, devido a menor quantidade de porinas na membrana. Também não são capazes de degradar carbapenêmicos, permanecendo susceptíveis a esse grupo de antimicrobianos (BUSH, JACOBY e MEDEIROS, 1995).

### 3.3.3. Tipos de ESBLs

Muitas ESBLs são derivadas de TEM ou SHV. Existem mais de 90 enzimas do tipo TEM e mais de 25 do tipo SHV com o fenótipo de ESBL. As ESBLs do tipo TEM e SHV são mais comumente encontradas em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*; no entanto, também têm sido encontradas em *Proteus* spp., *Providencia* spp. e outros gêneros da família *Enterobacteriaceae* (BRADFORD, 2001). Outros grupos podem ter maior importância em determinadas regiões, como é o caso do grupo CTX-M na América do Sul (LIVERMORE e BROWN, 2001).

#### 3.3.3.1. Tipo TEM

Mutações ocorridas na seqüência de aminoácidos da enzima TEM-1, levaram ao surgimento de muitas variantes, sendo que a maioria delas apresenta o fenótipo de ESBL; outras, no entanto, apresentam-se como  $\beta$ -lactamases resistentes a ação de inibidores. As substituições de aminoácidos são variadas mas ocorrem em número limitado de posições. As combinações dessas trocas de aminoácidos resultam em várias alterações sutis nos fenótipos das ESBLs, como a habilidade de hidrolisar oximino-cefalosporinas específicas, como cefotaxima e

ceftazidima, ou mudanças no ponto isoelétrico que varia entre 5,2 e 6,5 (BRADFORD, 2001). Apesar de  $\beta$ -lactamases do tipo TEM serem encontradas com maior frequência em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, também já foram descritas em várias espécies de Gram -negativos, com crescente frequência como em *Enterobacter aerogenes* (BERTRAND, *et al.*, 2003; GALBART *et al.*, 2000), *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* (PAGANI *et al.*, 2002), *Providencia rettgeri* e *Salmonella* spp. Além disso, também já foram encontradas em outras espécies não-enterobactérias, como *Pseudomonas aeruginosa*. As  $\beta$ -lactamases do tipo TEM, resistentes a inibidores de  $\beta$ -lactamases, não são ESBL, e são encontradas em *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *P. mirabilis* e *Citrobacter freundii*. Já foram descritas enzimas resistentes à ação de inibidores, com pequena atividade contra às cefalosporinas de amplo espectro, sugerindo que, talvez no futuro, tenhamos  $\beta$ -lactamases com amplo espectro resistentes à ação de inibidores (BRADFORD, 2001).

#### 3.3.3.2. Tipo SHV

O tipo SHV-1 é o mais comum em *Klebsiella pneumoniae* sendo responsável por mais de 20% da resistência a ampicilina mediada por plasmídeos nessa espécie. Em muitas cepas é relatada como estando integrada ao cromossomo. Apesar de ter sido levantada a hipótese desse gene fazer parte de um elemento transponível, isso ainda não foi provado (TZOUVELEKIS e BONOMO, 1999). O tipo SHV possui menos variantes que o tipo TEM, e as mutações ocorrem em poucas posições nos genes estruturais. Algumas substituições são essenciais para a hidrólise de ceftazidima, e outras para a hidrólise de cefotaxima. Até hoje, a maioria dos derivados SHV descritos, possui o fenótipo de ESBL. Apenas uma variante é relatada como resistente aos inibidores de  $\beta$ -lactamases (BRADFORD, 2001). A maioria das enzimas do tipo SHV é encontrada em cepas de *K. pneumoniae* (CORKILL *et al.*, 2001). No entanto, também podem ser encontradas em *Citrobacter diversus*, *Escherichia coli*,

*Pseudomonas aeruginosa* (BRADFORD, 2001) e *Enterobacter cloacae* (WU *et al.*, 2003).

### 3.3.3.3. Tipo CTX-M

Nos últimos anos uma nova família de ESBLs mediadas por plasmídios, chamada CTX-M, que hidrolisa preferencialmente cefotaxima, tem sido encontrada. Sua primeira descrição ocorreu em 1990, em uma cepa de *Escherichia coli* (BAUERNFEIND *et al.*, 1990) e logo depois, em *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (BAUERNFEIND *et al.*, 1992), tendo rápida expansão. É relatada como tipo predominante na América do Sul (LIVERMORE e BROWN, 2001), inclusive no Brasil (BONNET *et al.*, 2000). Foi descrita em *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* em Taiwan (WU *et al.*, 2003) e na Itália, sendo no mesmo trabalho 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).

Essas enzimas não foram ainda relatadas como TEM e SHV, e apresentam 40% de homologia com elas. Podem ter origem evolucionária em enzimas do tipo AmpC cromossômicas de *Kluyvera ascorbata*, com as quais apresentam alta homologia (HUMENIUK *et al.*, 2002). Estudos filogenéticos dessa família mostram que existem cinco grandes grupos baseados em suas seqüências de aminoácidos. O grupo I inclui CTX-M-1; CTX-M-3; CTX-M-10 a 12; CTX-M-15; CTX-M-22; CTX-M-23 e CTX-M-28 a 30. O grupo 2 CTX-M-2; CTX-M-4 a 7; CTX-M-20 e Toho-1. O grupo III inclui CTX-M-8, o grupo IV CTX-M- 9; CTX-M-13; CTX-M-14; CTX-M-16; CTX-M-19; CTX-M-21; CTM-X-27 e Toho-2. e o grupo V CTX-M-25 e 26 (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994). 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%. A distância evolucionária entre os grupos pode supor evolução a partir de ancestrais diferentes (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 (MATSUMOTO e INOUE, 1999; PÉDUZZI *et al.*, 1997).

Apesar dos métodos de detecção de ESBL terem sido padronizados pelo NCCLS antes da descrição das enzimas CTM-X, eles são eficientes na detecção dessa variante (PITOUT *et al.*, 2004).

#### 3.3.3.4. Tipo OXA

As enzimas do tipo OXA compõem outra família de ESBL em expansão. Essas enzimas diferem das enzimas do tipo TEM e SHV por pertencerem à família molecular D e grupo funcional 2d. Conferem resistência a ampicilina e cefalotina, além de serem caracterizadas por sua elevada atividade hidrolítica contra oxacilina e cloxacilina, e reduzida inibição pelo ácido clavulânico. São encontradas principalmente em *Pseudomonas aeruginosa* (BRADFORD, 2001).

As ESBL do tipo OXA originaram-se a partir de mutações em OXA-10. Elas conferem fraca resistência a oximino-cefalosporinas quando clonadas em *Escherichia coli*; porém, conferem altos níveis de resistência em transconjugantes de *Pseudomonas aeruginosa*. Em contraste com a maioria das enzimas OXA, que conferem maior resistência a ceftazidima, o tipo OXA-17 confere resistência a cefotaxima e ceftriaxona, e apenas pequena redução da sensibilidade a ceftazidima. Com respeito aos inibidores de β-lactamases, as enzimas OXA originais não eram inibidas por ácido clavulânico, no entanto, a β-lactamase OXA-18 foi relatada como sensível a esse inibidor. Um outro tipo, OXA-21, foi identificado em *Acinetobacter baumannii*, e foi a primeira descrição de enzimas OXA reportadas nesse microrganismo. Como o microrganismo possuía ainda duas

$\beta$ -lactamases, não foi possível definir o espectro de atividade da enzima (BRADFORD, 2001).

Algumas  $\beta$ -lactamases não possuem famílias bem estabelecidas. PER-1 foi primeiramente descrita em *Pseudomonas aeruginosa*, e depois em *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* e *Acinetobacter baumannii* (LIVERMORE, 1991).

Outra enzima é a VEB-1, encontrada primeiramente *Escherichia coli* e depois em *Pseudomonas aeruginosa* (LIVERMORE, 1991). E ainda, CME-1, TLA-1, CFO, GES-1 (BRADFORD, 2001) e PER-1 em *Proteus mirabilis* (PAGANI *et al.*, 2002).

#### 3.3.4. Significado Clínico da Detecção de ESBL

Os pacientes acometidos com infecções causadas por microrganismos produtores de ESBL têm um elevado risco de falha no tratamento com antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro. Por isso, é recomendado que qualquer microrganismo em que a produção de ESBL for confirmada seja reportado como resistente a todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro, independentemente dos resultados obtidos no teste de sensibilidade (NCCLS, 2004). Isto decorre do fato que, enquanto algumas cepas apresentam plena resistência aos  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro, muitos isolados podem não ser fenotipicamente resistentes. Sendo assim, é importante que o laboratorista esteja consciente de que certas cepas podem ter sensibilidade reduzida a oximino-cefalosporinas em níveis que, embora não sejam considerados de resistência, sugerem a presença de ESBL. É também importante que o laboratório implemente um ou mais métodos para detectar ESBL nessas cepas (PATTERSON, 2001; GRUTEKE, *et al.*, 2003; COUDRON *et al.*, 2003).

Outros motivos para a detecção são o aumento da prevalência no mundo, a alta transmissibilidade dos plasmídeos em que estão situadas as enzimas e principalmente, a letalidade das infecções causadas por esses microrganismos (PEÑA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2001). Quando os pacientes são tratados com o

antibiótico adequado, não há diferença significativa na mortalidade por infecções causadas por produtores e não produtores de ESBL (RAHAL, 2000).

Um sinergismo entre  $\beta$ -lactamases de amplo espectro e mutações em porinas de membrana, pode elevar o nível de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, ocorrendo inclusive resistência as cefalosporinas de quarta geração, como cefepime e cefpirome. O uso das cefalosporinas de quarta geração no tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL, também não é recomendado pelo fato de geralmente apresentarem susceptibilidade *in vitro*, podendo, no entanto, haver falência no tratamento devido a grande quantidade de ESBL no sítio de infecção (TZOUVELEKIS *et al.*, 1998).

### 3.3.5. Ocorrência, distribuição e disseminação das ESBLs

As ESBLs são encontradas principalmente em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*, consideradas espécies típicas produtoras, para as quais foram padronizadas as metodologias de detecção (NCCLS, 2004). Porém já foram descritas em muitas outras espécies de enterobactérias como: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter gergoviae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter farmeri*, *Citrobacter amalonaticus*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* e *Salmonella typhimurium* (VARELA *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2003; SHERABI *et al.*, 2000; GALDBART *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 2002; NAVON-VENEZIA *et al.*, 2003; WARREN, 2000; CHAMPS *et al.*, 2000; PAGANI *et al.*, 2002; PAGANI *et al.*, 2003; PAI *et al.*, 2001; BERTRAND, *et al.*, 2003; SZABO *et al.*, 1999; MHAND *et al.*, 1999; MULVEY *et al.*, 2003). Por isso, recentemente, o CLINICAL LABORATORIES STANDARDS INSTITUTE (CLSI), padronizou a detecção também em *Proteus mirabilis* (CLSI, 2005), sendo que a necessidade da pesquisa nas demais espécies não-*E. coli* e não-*Klebsiella* spp. continua sem padronização.

A produção de ESBLs por bactérias não-enterobactérias são raras, mas podem ocorrer principalmente em *Pseudomonas aeruginosa*. Nestes microrganismos os tipos mais comuns são OXA-derivados. Contudo, isolados de *Pseudomonas aeruginosa* produzindo TEM, SHV e PER têm sido identificados em muitos países. Já foi detectado ESBL em *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes faecalis*, e *Burkholderia cepacia* (GNIADSKOWSKI, 2001).

As bactérias produtoras de ESBL encontram-se espalhadas pelo mundo, todas com alta incidência na Europa, sendo que 32,8% das amostras de *Klebsiella* spp. e 14,4 % das amostras de *Escherichia coli* isoladas nessa região, produzem ESBL (JONES *et al.*, 2003). Um estudo realizado na Espanha detectou cepas produtoras de ESBL em 90% dos hospitais participantes de um programa de vigilância (HERNANDEZ *et al.*, 2003). Vários relatos da produção de ESBL ocorreram também na Itália (PAGANI *et al.*, 2003; PAGANI *et al.*, 2002), França (BERTRAND, *et al.*, 2003; GALDBART *et al.*, 2000; MHAND *et al.*, 1999; CHAMPS *et al.*, 2000) e Polônia (GNIADKOWSKI *et al.*, 1998). Na Ásia várias ocorrências foram descritas no Líbano (DAOUD e HAKIME, 2003), Taiwan (WU *et al.*, 2003), Israel (NAVON-VENEZIA *et al.*, 2003) e Korea (KIM *et al.*, 1998; PAI *et al.*, 2001; PAI *et al.*, 1999). E ainda: EUA (SCHAWBER *et al.*, 2004), Canadá (MULVEY *et al.*, 2003) e México (SILVA *et al.*, 2001), entre outros.

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 literatura demonstra muitos casos onde hospitais têm notado rápido aumento no número de microrganismos carregando ESBL, além de disseminação intra-hospitalar ou entre hospitais vizinhos (WINOKUR *et al.*, 2000). A transmissão pelas mãos dos profissionais é relevante, sendo o trato gastrointestinal dos pacientes um importante reservatório (BRITO *et al.*, 1999; WINOKUR *et al.*, 2000). Alguns surtos foram resultantes de contaminação de aparelhos e insumos diagnósticos, como termômetros e gel usado em ultra-sonografia (GNIADKOWSKI, 2001).



Além da transmissão das cepas resistentes ocorre também a aquisição de resistência por cepas susceptíveis (BERTRAND, *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2001; RAHAL, 2000). A transmissão horizontal do gene de resistência é facilitada por estar freqüentemente codificado em plasmídeos (WU *et al.*, 2003; MHAND *et al.*, 1999), que podem ser facilmente transferidos entre as cepas (PAGANI *et al.*, 2003; GALDBART *et al.*, 2000; MULVEY *et al.*, 2003; PAI *et al.*, 1999; GALANI, 2002; SZABO *et al.*, 1999).

O aumento na incidência pode estar relacionado à administração indiscriminada de cefalosporinas de amplo espectro (PATTERSON, 2001; GNIADKOVSKI, 001).

#### 3.3.6. Fatores de Risco

O principal fator de risco ao paciente é a longa permanência em hospitais, principalmente em UTIs, alas cirúrgicas, pediatria e alas de pacientes crônicos (BRADFORD, 2001; PEÑA *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2003; HERNANDEZ *et al.*, 2003; CHAMPS *et al.*, 2000; SHERABI *et al.* 2000; BERTRAND, *et al.*, 2003 ). São fatores também importantes a severidade da doença, neutropenia (JONES *et al.*, 2003), exposição a procedimentos invasivos como entubação e ventilação mecânica, cateter arterial e sonda urinária (BRADFORD, 2001; SILVA *et al.*, 2001; PEÑA *et al.* 2001). As UTIs neo-natais são particularmente suscetíveis a surtos, sendo considerados fatores predisponentes o baixo peso, permanência em incubadora, exposição a antimicrobianos, tempo de hospitalização (mais de 7 dias) e prematuridade (BRITO *et al.*, 1999; SINGH *et al.*, 2002; SZABO *et al.*, 1999).

É importante ressaltar que, apesar de até há pouco tempo se considerar que os microrganismos produtores de ESBL eram problemas quase exclusivamente hospitalares, um estudo realizado em hospitais espanhóis mostrou que 51% das cepas de *Escherichia coli* ESBL positivos foram isoladas de amostras extra-hospitalares, principalmente de urina (HERNANDEZ *et al.*, 2003).

Os fatores de risco associados a infecções comunitárias por ESBL são *diabetes mellitus*, as infecções urinárias recorrentes, a hospitalização prévia, o uso prévio de antimicrobianos (cefalosporinas, penicilinas ou quinolonas) e a idade avançada (RODRIGUES-BANO *et al.*, 2004; COLODNER *et al.*, 2004). No Brasil, enterobactérias produtoras de ESBL foram detectadas em cepas isoladas de feridas em pés diabéticos, e em infecções adquiridas na comunidade (MOTTA *et al.*, 2003). Além disso, há relatos de cepas ESBL positivas circulantes em pessoas que moram em asilos (WIENER *et al.*, 1999) que têm se mostrado como um importante reservatório (RAHAL, 2000).

### 3.3.7. Co-existência com outras $\beta$ -lactamases

Enquanto poucos surtos são causados por microrganismos com uma única  $\beta$ -lactamase, surtos mais recentes têm sido causados por microrganismos produtores de múltiplas  $\beta$ -lactamases. A combinação de enzimas não-ESBL da classe A e enzimas do tipo AmpC com ESBL, pode ser encontrada com frequência em enterobactérias. Os microrganismos contendo essas combinações de  $\beta$ -lactamases podem ser resistentes aos inibidores de  $\beta$ -lactamases, cefamicinas e até carbapenêmicos (BRADFORD, 2001).

A ocorrência de ESBLs em enterobactérias que possuem grupo 1 de  $\beta$ -lactamases (AmpC) vem aumentando no mundo, particularmente em *Enterobacter* spp. Nestas espécies, a detecção de isolados produtores de ESBL por métodos baseados nos efeitos inibitórios do ácido clavulânico pode ser difícil. Isso ocorre devido à superposição do fenótipo de resistência promovida pela superprodução da enzima AmpC, que é fortemente induzida por ácido clavulânico, sobre o fenótipo de ESBL, que é inibido por ele. Porém, a detecção de ESBL em produtores de AmpC é importante em estudos de epidemiologia do ambiente hospitalar, porque implica na possibilidade da transmissão de plasmídios entre diferentes isolados, em adição a transmissão das cepas produtoras de ESBL,

além de excluir a possibilidade do tratamento com cefalosporinas de quarta geração que é eficiente para os produtores de AmpC (COUDRON *et al.*, 2003).

### 3.3.8. Associação de Resistência a outros Antimicrobianos

Além da associação com outras  $\beta$ -lactamases, existe alta associação de ESBL e genes de resistência ao ciprofloxacino (PAGANI *et al.*, 2003; PEÑA *et al.*, 2001; BERTRAND, *et al.*, 2003; JONES *et al.*, 2003); gentamicina (PEÑA *et al.*, 2001; PAGANI *et al.*, 2003; SZABO *et al.*, 1999; DAOUD e HAKIME, 2003; CORKILL *et al.*, 2001; GALANI *et al.*, 2002), co-trimetoxazol (CHAMPS *et al.*, 2000; GALANI *et al.*, 2002; WINOKUR *et al.*, 2000; SZABO *et al.*, 1999); piperacilina-tazobactam e outras combinações com inibidores (JONES *et al.*, 2003; DAOUD e HAKIME, 2003).

### 3.3.9. Opções Terapêuticas

Cepas produtoras de ESBL são sensíveis a carbapenêmicos (PAGANI *et al.*, 2003; JONES *et al.*, 2003; DAOUD e HAKIME, 2003; BERTRAND, *et al.*, 2003; SADER, 2000; GALDBART *et al.*, 2000; COUDRON *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2001; GALANI *et al.*, 2002; SHERABI *et al.*, 2000; PEÑA *et al.*, 2001). A amicacina também apresenta boa atividade, mas seu uso é restrito devido a toxicidade (DAOUD and HAKIME, 2003; PEÑA *et al.*, 2001).

Uma combinação de cefepime ou cefpirome com sulbactam pode ser efetivo no tratamento de infecções por produtores de ESBL, faltando, no entanto, estudos clínicos detalhados sobre sua utilização (ROUSSEL-DELVALLEZ, 1998).

Entre os carbapenêmicos, o mais utilizado para enterobactérias é o imipenem. Contudo, estudos têm demonstrado que o ertapenem, um novo carbapenêmico com longo tempo de meia vida, é altamente potente contra bactérias produtoras de ESBL (KHOLER *et al.*, 1999; LIVERMORE *et al.*, 2001). Assim como o imipenem, o ertapenem não apresenta variações consideráveis na

CIM quando testado frente a um elevado inóculo bacteriano. Isso demonstra que o ertapenem não é susceptível à hidrólise por essas enzimas, mesmo quando elas encontram-se em concentrações elevadas (KOHLENER *et al.*, 1999). Entre as vantagens do uso do ertapenem se ressalta a possibilidade de administração em dose-única via intramuscular, o que permite o uso não hospitalar. Além disso, a sua reduzida atividade contra bacilos gram -negativos não-fermentadores, não contribui para a seleção de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenêmicos (LIVERMORE *et al.*, 2001).

### 3.3.10. Medidas de Controle

Muitos hospitais têm experimentado surtos por microrganismos produtores de ESBL. Esses surtos são freqüentemente decorrentes da transferência de pacientes entre unidades e entre hospitais. Dentre os métodos de controle descrito na literatura estão as pesquisas de colonização, detecção de ESBL pré-admissão, estabelecimento de barreiras de contato (BERTRAND, *et al.*, 2003), isolamento de pacientes com ESBL, higiene (GRUTEKE *et al.*, 2003) e cultura para pesquisa em objetos inanimados (SZABO *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2001). Porém, na prática, esses procedimentos possuem custos elevados e nem sempre apresentam os resultados esperados.

Um estudo feito em países europeus apontou a Suécia como o país com menor índice de resistência, sendo este fato atribuído ao uso mais prudente de antimicrobianos, à menor administração total dos mesmos e à melhor compreensão das medidas de controle, como lavagem das mãos e barreiras de precaução, entre outras (HANBERGER *et al.*, 1999).

Investigações epidemiológicas podem ajudar a detectar fontes de contaminação e direcionar as medidas preventivas. Essas são feitas usando métodos moleculares como PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis ou eletroforese em campo pulsado), ou outros métodos, como determinação dos

perfis plasmídicos, ribotipagem e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA ou amplificação randômica de DNA) (BRADFORD, 2001).

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

Outro problema está relacionado ao fato de que o aumento do uso de imipenem, melhor opção terapêutica em infecções por bactérias ESBL positivas em hospitais latino-americanos, tem aumentado a incidência de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. resistentes a esse antibiótico (SADER *et al.*, 2003), o que poderia ser reduzido substituindo-se o uso de imipenem por ertapenem (LIVERMORE *et al.*, 2001).

### 3.4. Métodos de Detecção de ESBL

O aumento da prevalência de produtores de ESBL entre as enterobactérias, a disseminação inter e intra-hospitalar dessas enzimas e a possibilidade do paciente receber terapia inadequada, criaram uma grande necessidade de métodos laboratoriais para identificar a presença dessa enzima em isolados clínicos. A grande dificuldade encontrada foi o fato de que muitas ESBLs conferem resistência para uma ou mais oximino-cefalosporinas; porém, algumas delas podem estar presentes quando a CIM para a bactéria produtora é de apenas 0,5 µg/mL para cefotaxima, ceftazidima e aztreonam, ou, ainda, podem conferir apenas discreta diminuição na sensibilidade, que nem sempre é suficiente para o microrganismo produtor ser considerado resistente, de acordo com os padrões do NCCLS. Essas diferenças no perfil de sensibilidade apresentado pela bactéria podem ser dependentes do plasmídeo no qual o gene se encontra, ou do gene

promotor que controla a síntese da  $\beta$ -lactamase. Como a degradação do  $\beta$ -lactâmico normalmente é muito lenta, a resistência a esse agente pode não ser detectada durante a realização dos testes *in vitro*. Além disso, a degradação do  $\beta$ -lactâmico é dependente do tamanho do inóculo. Desta maneira, o inóculo padronizado para os testes de sensibilidade pode não ser suficiente para a detecção da resistência (BRADFORD, 2001; REIS, 1999).

De modo geral, os métodos de triagem se baseiam no padrão de sensibilidade das cepas as oximino-cefalosporinas e ao aztreonam, sendo que a sensibilidade e especificidade dos testes variam com o antimicrobiano testado. Algumas investigações têm sugerido que ambos os testes de diluição ou disco difusão, usando cefpodoxima detecta mais ESBL que outras cefalosporinas como ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona (CARTER *et al.*, 2000). No entanto, dados mais recentes, sugerem que teste de susceptibilidade usando cefpodoxima podem elevar o número de falsos-positivos quando os critérios do NCCLS são aplicados (LEE *et al.*, 2001). Um estudo realizado no Brasil mostrou que, nesse país, aztreonam, ceftazidima e ceftriaxona possuem igual habilidade em detectar o fenótipo ESBL em *Klebsiella pneumoniae*. A ceftazidima foi capaz de detectar 96,7% das prováveis ESBL, enquanto aztreonam e ceftriaxona foram capazes de detectar 96% dos possíveis produtores (REIS, 1999).

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

A falência dos testes de sensibilidade realizados por CIM ou disco-difusão na detecção de ESBL, em amostras de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, tem sido documentada. Por esse motivo, vários métodos mais sensíveis e específicos vêm sendo sugeridos (BRADFORD, 2001).

### 3.4.1. Técnicas Microbiológicas

Os testes microbiológicos empregam um inibidor de  $\beta$ -lactamases, usualmente clavulonato, em combinação com oximinocefalosporinas, como ceftazidima ou cefotaxima. Nesses testes, o clavulonato inibe as ESBLs e reduz o nível de resistência à cefalosporina (BRADFORD, 2001).

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

Os vários métodos para detecção de ESBLs podem falhar na presença de outros mecanismos de resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. A diminuição na permeabilidade da bactéria aos antimicrobianos e a produção de outras  $\beta$ -lactamases, em especial as cromossômicas induzíveis presentes em várias espécies, podem mascarar a presença de ESBLs (VARELA *et al.*, 2001; SCHWABER *et al.*, 2004; TENOVER *et al.*, 1999; THOMSON, 2001; GALDBART *et al.*, 2000). Além disso, outras beta-lactamases podem apresentar o mesmo efeito com ácido clavulânico e serem confundidas com ESBLs, como algumas  $\beta$ -lactamases cromossômicas (por exemplo, em *Klebsiella oxytoca* e *Proteus vulgaris*) ou plasmidíadas (grupo 2f de *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae*) que, quando produzidas em maiores concentrações, podem ser capazes de reduzir a susceptibilidade às cefalosporinas de terceira geração e ao aztreonam (SCHWABER *et al.*, 2004; BUSH, JACOBY e MEDEIROS, 1995; LIVERMORE, 2001). A enzima K1 de *K. oxytoca* pode ser diferenciada por não conferir resistência a ceftazidima, diferente da maioria das ESBLs. Além disso, a

resistência as cefalosporinas de terceira geração só ocorre quando a enzima está presente em altas concentrações, não sendo o ácido clavulânico, presente nos testes utilizados, suficientes para inibi-la de forma eficaz. A enzima cromossômica de *P. vulgaris* pertence a classe molecular A, e quando produzida em grande quantidade, pode também conferir resistência às cefalosporinas de terceira geração, mas não ao aztreonam, ao contrário das ESBL. As enzimas pertencentes ao grupo 2f encontradas em *E. cloacae* e *S. marcescens* são enzimas capazes de degradar penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (BUSH, JACOBY e MEDEIROS, 1995; LIVERMORE, 1995; BUSH, 2001).

O CLSI recomenda que os 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 a *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*, que são os principais produtores e ao *Proteus mirabilis*, incluído recentemente devido ao aumento da incidência nessa espécie. No entanto, ESBLs têm sido encontradas em muitas outras espécies, em especial *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Providencia* spp., *Salmonella enterica* e *Serratia* spp. (NAVON-VENEZIA *et al.*, 2003).

#### 3.4.2. 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  $\beta$ -lactâmicos é um indício da produção de ESBL. Segundo o CLSI (2005), amostras que apresentem CIM  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$  ceftazidima, cefpodoxima, aztreonam, cefotaxima ou ceftriaxona, por testes dilucionais, devem ser consideradas possíveis produtoras de ESBL.

Nos testes de disco-difusão, os pontos de corte são halos de inibição  $\leq 22\text{mm}$  para ceftazidima,  $\leq 17\text{mm}$  para cefpodoxima,  $\leq 27\text{ mm}$  para aztreonam,  $\leq 27\text{ mm}$  para cefotaxima, ou  $\leq 25\text{ mm}$  para ceftriaxona para *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp.; e  $\leq 17\text{mm}$  para cefpodoxima, ceftazidima ou cefotaxima para



*Proteus mirabilis*. Porém, nestes casos, o CLSI sugere a realização de um teste confirmatório (CLSI, 2005).

#### 3.4.3. Teste de Dupla Difusão em Disco

Método idealizado por JALIER *et al.* (1988) também é denominado teste de disco-aproximação. O teste consiste na colocação de discos de cefalosporinas de amplo espectro como ceftazidima, cefuroxima, cefotaxima e aztreonam, distantes 30 mm (centro a centro) de um disco que contenha um inibidor de  $\beta$ -lactamase, de preferência ácido clavulânico. A produção de ESBL é indicada por uma deformação (aumento) nos halos de inibição ao redor dos discos dos  $\beta$ -lactâmicos. No entanto, em algumas amostras, o espaço de 30 mm pode não ser adequado para o teste. Desta maneira, o teste deverá ser repetido, utilizando distâncias mais apropriadas. Por outro lado, a interpretação dos resultados é altamente subjetiva e requer experiência por parte do técnico que o realiza (LIVERMORE e BROWN, 2001).

#### 3.4.4. 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 susceptibilidade aos antimicrobianos e do perfil de atividade da  $\beta$ -lactamase (THOMSON e SANDERS, 1992).

### 3.4.5. Teste de Adição de Ácido Clavulânico

Este método consiste em adicionar inibidores de  $\beta$ -lactamases, como o ácido clavulânico ou sulbactam, a antimicrobianos como cefuroxima, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona ou aztreonam. Quando se usa discos combinados (30  $\mu$ g de cefpodoxima, ceftazidima ou cefotaxima *versus* 30  $\mu$ g de cefpodoxima, ceftazidima ou cefotaxima mais 10  $\mu$ g de ácido clavulânico) um aumento do diâmetro dos halos de inibição  $\geq 5$  mm na presença do inibidor, em comparação aos halos dos discos não adicionados de ácido clavulânico, é evidência presuntiva da produção de ESBL (CLSI, 2005).

Em métodos dilucionais, pode-se comparar a CIM das cefalosporinas isoladas e associadas a dois  $\mu$ g de ácido clavulânico. Uma diminuição  $\geq 3$  diluições na presença do inibidor é indicativa da produção de ESBLs (CLSI, 2005).

### 3.4.6. E-test®

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

### 3.4.7. Outros Métodos Fenotípicos

Entre os métodos automatizados o Vitek® (bioMérieux Vitek, EUA) é o mais utilizado. O cartão apresenta os antimicrobianos ceftazidima e cefotaxima sozinhos na concentração de 0,5  $\mu$ g/mL e associados ao ácido clavulânico na concentração de 4  $\mu$ g/mL. A redução no crescimento da amostra bacteriana na

cavidade que contém a associação do antimicrobiano  $\beta$ -lactâmico, com o inibidor de  $\beta$ -lactamases, quando comparada com o nível de crescimento da cavidade que contém somente o antimicrobiano-lactâmico, é indicativo da presença de ESBL (SANDERS *et al.*, 1996).

#### 3.4.8. Detecção de ESBL em espécies diferentes de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp.

A busca de uma melhora na detecção de ESBL em outros microrganismos não *Klebsiella* spp e não-*Escherichia coli*, não tem recebido muita atenção. O teste confirmatório baseado em inibidores tem sido o método mais promissor. No entanto, com isolados de algumas espécies, o clavulonato não é o melhor agente para esses testes. Métodos baseados na ação de inibidores fornecem melhores resultados em bactérias que não produzem outras  $\beta$ -lactamases resistentes aos inibidores como o tipo AmpC. Altos níveis de AmpC podem não permitir o reconhecimento de ESBL. Este problema é maior em bactérias que possuem  $\beta$ -lactamases cromossômicas induzíveis do tipo AmpC (por ex. *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Aeromonas* spp., *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Com esses microrganismos, o clavulonato pode ser um forte indutor da produção de AmpC, aumentando a resistência do organismo às drogas usadas na triagem, produzindo um resultado falso negativo para produção de ESBL. Tazobactam e sulbactam são menos indutores e por isso preferidos ao clavulonato nos testes para esses microrganismos. Outra solução possível é a inclusão de cefepime no teste de triagem. Altos níveis de expressão de AmpC têm mínimo efeito na atividade de cefepime, o que faz dessa droga um agente de detecção de ESBL na presença de AmpC (THOMSON, 2001). Em alguns casos, a resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, só é notada em bactérias produtoras de ESBL ou  $\beta$ -lactamases AmpC, quando os testes são realizados utilizando um inóculo maior que o padronizado (BEDENIC, *et al.*, 2001; QUEENAN, *et al.*, 2004).

### 3.4.9. Métodos de Detecção Molecular

Os testes clínicos apenas presumem a presença de ESBL. O estudo do ponto isoelétrico (pI) tem sido bastante útil para determinar qual é o tipo enzimático presente. Porém, as enzimas do tipo TEM, que correspondem a mais de 90 tipos, possuem pI idênticos, o que torna a determinação do tipo de ESBL somente pelo pI impossível. Uma situação semelhante é encontrada em enzimas do tipo SHV, CTX-M e OXA (BRADFORD, 2001).

Uma detecção precoce de genes de  $\beta$ -lactamases pode ser feita usando-se sondas para enzimas específicas, como TEM e SHV. Contudo, o uso dessas sondas aumenta o trabalho laboratorial, sem resultados satisfatórios (MABILAT *et al*, 1990). O método molecular mais simples e mais utilizado para detectar as enzimas é a PCR (Polymerase Chain Reaction ou reação em cadeia da polimerase), usando iniciadores específicos para os genes de  $\beta$ -lactamases. As seqüências podem ser escolhidas usando seqüências publicadas no GENBANK. 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) (ARLET *et al*, 1995) e PCR-SSCP (Single-Strand Conformational Polymorphism) (ZALI *et al*, 1996). Mas, o método padrão continua sendo o seqüenciamento da cadeia específica dos nucleotídeos dos genes das  $\beta$ -lactamases (BRADFORD, 2001).

#### 4. ARTIGO

**PREVALÊNCIA DE  $\beta$ -LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO EM  
MEMBROS DA FAMÍLIA *ENTEROBACTERIACEAE* ISOLADOS EM DOIS  
HOSPITAIS UNIVERSITÁRIOS DE CURITIBA**

Keite da Silva Nogueira (1)\*; Ilma Hiroko Higuti (1); Libera Maria Dalla Costa (1)

(1) Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil

\* Laboratório de Bacteriologia, Hospital de Clínicas-UFPR. Tel. 3360-7975.

e-mail: [keitenogueira@hotmail.com](mailto:keitenogueira@hotmail.com)

SUBMETIDO À REVISTA DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY and INFECTIOUS  
DISEASES

## RESUMO

A produção de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL) é um importante mecanismo de resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos em enterobactérias. Sua pesquisa deve ser realizada para evitar que sejam reportados testes de sensibilidade falso-sensíveis para cefalosporinas e aztreonam nos isolados produtores de ESBL. Além disso, fornece informações para que medidas preventivas sejam tomadas a fim de diminuir a disseminação desse mecanismo de resistência entre as bactérias. A pesquisa é preconizada pelo Clinical Laboratories Standards Institute (CLSI) apenas para *Klebsiella* spp. *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*. Porém ESBL têm tido crescente ocorrência também em outras enterobactérias. Para determinar a prevalência de ESBL em enterobactérias, 498 amostras bacterianas foram testadas por disco-difusão para triagem de bactérias produtoras dessas enzimas, através da verificação de redução do halo de sensibilidade a aztreonam, ceftriaxona, cefpodoxima, ceftazidima ou cefotaxima, segundo recomendações do CLSI. Entre eles, 155 isolados bacterianos foram positivos no teste de triagem para ESBL, dos quais 121 (78%) foram confirmados pelo teste de adição de ácido clavulânico. Este trabalho demonstrou que a prevalência de ESBL no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e no Hospital Universitário Cajuru (HUC), ambos em Curitiba-PR, é elevada (24%), sendo a ocorrência em *Klebsiella pneumoniae* de 57,4 %, em *Klebsiella oxytoca* de 21,4% e em *Escherichia coli* de 7,2%. Em outras enterobactérias não-*Klebsiella* e não-*Escherichia coli* a ocorrência foi de 21,6%,

demonstrando a necessidade da pesquisa de ESBL também nessas espécies. Ceftriaxona e cefotaxima foram os antimicrobianos com maior sensibilidade no teste de triagem (99,2%) e a combinação cefotaxima/cefotaxima mais ácido clavulânico foi a mais sensível no teste confirmatório (96,7%).

## INTRODUÇÃO

As  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL) foram descritas pela primeira vez por Knothe *et al.* (1983) e, desde então, têm contribuído para o grande aumento da resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos que vem ocorrendo nos últimos anos. São  $\beta$ -lactamases capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas (incluindo as de amplo espectro) e monobactâmicos, sendo as cefamicinas e os carbapenêmicos resistentes à ação enzimática (Bradford, 2001). São sensíveis aos inibidores de  $\beta$ -lactamases, como o ácido clavulânico, e por isso, classificadas no grupo 2 de Bush *et al.* (1995), mais especificamente, no sub-grupo 2be, grupo das cefalosporinases, que hidrolisam antimicrobianos de amplo espectro.

Muitas ESBLs derivam de mutações de ponto em genes de  $\beta$ -lactamases comumente mediadas por plasmídeos, como as do tipo TEM e SHV (Bradford, 2001). No entanto, membros de um novo grupo de ESBL, o CTX-M, derivados de  $\beta$ -lactamases cromossômicas da classe A, vêm sendo identificadas nos últimos anos (Bonnet *et al.*, 2004).

Os testes rotineiros de sensibilidade aos antimicrobianos nem sempre detectam a produção de ESBL, pois a resistência mediada por essas enzimas

depende da quantidade produzida e da afinidade pelo substrato (Queenan, 2004). As infecções causadas por ESBL, porém, não respondem ao tratamento com  $\beta$ -lactâmicos, exceto carbapenêmicos (Shah, 2004).

Os genes localizados em plasmídios são facilmente transferidos entre as enterobactérias, facilitando a disseminação (Gruteke *et al.*, 2003). Esses plasmídeos, na maioria das vezes, contêm juntamente com o gene da  $\beta$ -lactamase, genes de resistência a outros antimicrobianos, limitando as opções terapêuticas (Mulvey *et al.*, 2003).

A detecção de amostras produtoras de ESBL é importante, portanto, para garantir a terapia adequada ao paciente e fornecer informações necessárias ao controle da disseminação. O Clinical Laboratories Standards Institute (CLSI) recomenda que testes de triagem e confirmação sejam realizados rotineiramente para *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*, consideradas produtoras clássicas, e ainda, para *Proteus mirabilis*. Os testes se baseiam na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) ou sensibilidade por disco-difusão (DD) para cinco agentes antimicrobianos (cefpodoxima, aztreonam, ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima) e posteriormente no teste com cefpodoxima, ceftazidima e cefotaxima, com e sem ácido clavulânico. Segundo Shawber *et al.* (2004), a necessidade de buscar ESBLs em outras enterobactérias não-*Escherichia coli*, e não-*Klebsiella* spp. e a aplicabilidade dos critérios do CLSI na detecção nas mesmas permanecem incertas. No entanto o CLSI 2005 já trouxe valores de corte para pesquisa de ESBL também em *Proteus mirabilis*.



O objetivo desse trabalho foi determinar a ocorrência de ESBL nas diferentes espécies de enterobactérias e avaliar os antimicrobianos usados na detecção de ESBL em dois hospitais estudados, assim como o padrão de sensibilidade dos isolados.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

**AMOSTRAS:** Quatrocentos e noventa e oito isolados de enterobactérias, obtidos de forma sucessiva, de pacientes internados, a partir de amostras clínicas de urina, sangue, líquido, escarro, aspirado traqueal, lavado bronco-alveolar e ferida cirúrgica. Quatrocentos e trinta e oito isolados bacterianos foram coletados no Hospital de Clínicas - Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), no período de agosto de 2003 a agosto de 2004; e sessenta isolados bacterianos foram coletados no Hospital Universitário Cajuru - Pontifícia Universidade Católica de Curitiba (HUC-PUCPR), no período de janeiro a agosto de 2004. A identificação preliminar das enterobactérias foi realizada pelo sistema automatizado Vitek® (bioMérieux). As bactérias foram criopreservadas em BHI (Infusão Cérebro Coração), contendo 10% de glicerol, a - 80°C (Janis, 1994), até a realização dos testes posteriores.

**TRIAGEM DE ESBL:** Todos os 498 isolados bacterianos foram submetidos ao teste de triagem para a detecção de ESBL, realizado por disco-difusão (DD), utilizando discos impregnados com concentrações fixas de cada antibiótico (Newprov, Curitiba, Brasil) (NCCLS, 2000a). No teste de triagem foram

consideradas positivas as enterobactérias que apresentaram halo de inibição reduzido para ao menos um dos antimicrobianos utilizados, sendo os pontos de corte  $\leq 17$  mm para cefpodoxima,  $\leq 22$  mm para ceftazidima,  $\leq 25$  mm para ceftriaxona,  $\leq 27$  mm para cefotaxima,  $\leq 27$  mm para aztreonam, no caso de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* e  $\leq 17$  mm para cefpodoxima, ceftazidima ou cefotaxima para *Proteus mirabilis* (CLSI, 2005). As identificações realizadas através do sistema automatizado Vitek<sup>®</sup> (bioMérieux) foram confirmadas por uma bateria de testes bioquímicos recomendados para identificação de enterobactérias, como atividade de enzimas, fermentação de açúcares e produção de gás e ácido sulfídrico, entre outros, segundo Schereckenberber (2001), Janda *et al.* (1994), O'Hara *et al.* (2000), Sanders e Sanders (1997) e Pondschn e Ullman (1998).

**DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM):** Foi realizada para todas os isolados possíveis produtores de ESBL, pela técnica de microdiluição em ágar, conforme descrito pelo NCCLS (2000), utilizando amicacina, aztreonam, cefepime, cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona (Sigma Chemical CO - Louis, USA); ciprofloxacino (ICN Biomedicals Inc - Aurora, Ohio, USA); imipenem e ertapenem (Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda - Campinas, Brasil). O controle de qualidade foi realizado com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922 (NCCLS, 2004).

**CONFIRMAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESBL:** As amostras consideradas positivas no teste de triagem foram submetidas ao teste de adição do ácido clavulânico, realizado por disco difusão. Foram testados discos de ceftazidima (30  $\mu$ g),

cefotaxima (30 µg) e cefpodoxima (30 µg) com e sem a adição de ácido clavulânico (10µg) (Oxoid - Basingstoke, United Kingdom). O aumento do diâmetro do halo de sensibilidade em ao menos 5mm) na presença do inibidor foi considerado evidência confirmatória da produção de ESBL. Foi testado também um disco de cefoxitina, visando buscar a presença de outros mecanismos de resistência a β-lactâmicos que pudessem estar presentes (CLSI, 2005).

## RESULTADOS

De todas os isolados bacterianos estudados cinquenta e cinco apresentaram sensibilidade diminuída as cefalosporinas de terceira geração e aztreonam, sendo consideradas possíveis produtoras de ESBL. Dessas enterobactérias positivas no teste de triagem para ESBL, cento e vinte e uma foram confirmadas pelo teste de adição de ácido clavulânico.

A Tabela 1 apresenta a distribuição das amostras positivas no teste de triagem e no teste confirmatório entre as espécies estudadas, além do número total de isolados em cada espécie. As espécies mais isoladas em amostras clínicas e também com maior frequência de isolados positivos no teste de triagem para ESBL foram *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*. O maior número de espécies confirmadas como ESBL positivas foram *Klebsiella pneumoniae* (67), *Enterobacter cloacae* (20) e *Escherichia coli* (14). *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella oxytoca* tiveram 3 ou 4 isolados

bacterianos confirmados, enquanto outras espécies tiveram 1 ou 2, com exceção de *Enterobacter gergoviae*.

A ocorrência do fenótipo ESBL positivo foi de 24,3% no total de enterobactérias estudadas. Entre as espécies consideradas clássicas produtoras de ESBL, *Klebsiella pneumoniae* foi a espécie com maior ocorrência (67/57,4%), seguida de *Klebsiella oxytoca* (3/21,4%) e por último *Escherichia coli* (14/7,2%). Nas outras espécies a ocorrência foi de 21,6% .

A Tabela 1 apresenta também a ocorrência de ESBL por gênero. Os gêneros com maior porcentagem de isolados ESBL positivos foram: *Klebsiella* (54,3%), *Enterobacter* (27,1%), e *Serratia* (20,9%). Nos gêneros *Citrobacter*, *Morganella*, *Proteus* e *Escherichia* a ocorrência também foi relevante, variando de 7,3 a 14,3%. O gênero *Providencia* teve apenas um isolado no período, sendo esse produtor de ESBL; e o gênero *Pantoea* apresentou dois isolados dos quais um foi produtor de ESBL. Não se calculou a porcentagem para esses gêneros, pois devido ao pequeno número de isolados, a análise estatística não seria significativa. Foi mostrado também o intervalo de confiança das ocorrências encontradas, sendo que para aqueles gêneros com pequeno número de isolados, o intervalo se mostrou muito grande, devendo-se aumentar o número de isolados para obtenção de resultados mais precisos.

Entre as enterobactérias positivas no teste de triagem, 20 isolados de *Enterobacter* (23,5%), 5 de *Klebsiella* (4,0%), 3 de *Serratia* (12,5%), 3 de *Morganella* (17,6%) e 1 de *Citrobacter* (7,1%) tiveram resultados inconclusivos no teste de adição de ácido clavulânico.

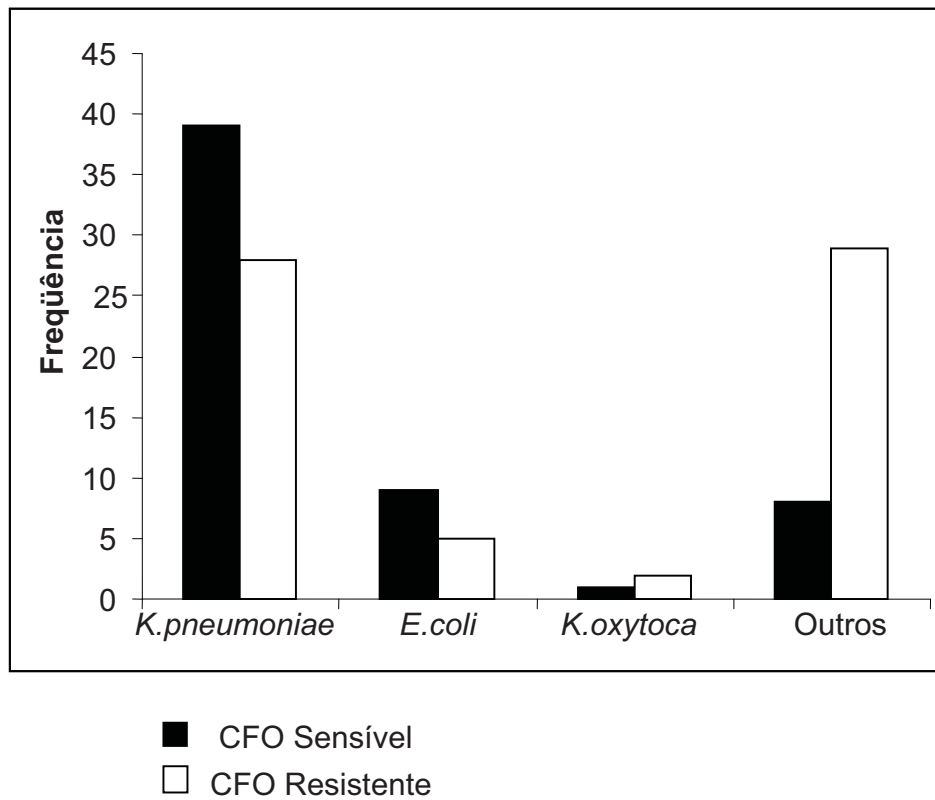
Tabela 1- Distribuição das amostras positivas no teste de triagem (TT) e no teste confirmatório (TC) para pesquisa de ESBL entre as espécies e ocorrência entre os gêneros

Espécies	Isolado	TT (+)	TC (+)	Gêneros	Isolado	ST (+)	%	IC	TC (+)	%	IC
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	1	1								
<i>Citrobacter freundii</i>	13	2	1	<i>Citrobacter</i>	14	3	21.4	5.7-51.2	2	14.3	2.5-43.8
<i>Enterobacter aerogenes</i>	14	7	3								
<i>Enterobacter cloacae</i>	67	34	20								
<i>Enterobacter gergoviae</i>	4	2	0	<i>Enterobacter</i>	85	43	50.6	39.6-61.5	23	27.1	18.3-37.9
<i>Escherichia coli</i>	193	14	14	<i>Escherichia</i>	193	14	7.2	4.2-12.1	14	7.3	4.2-12.1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	14	3	3								
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	115	72	67	<i>Klebsiella</i>	129	75	58.1	49.1-66.7	70	54.3	45.3-63.0
<i>Morganella morganii</i>	17	5	2	<i>Morganella</i>	17	5	29.4	11.38-56.0	2	11.8	2.1-37.7
<i>Pantoea agglomerans</i>	2	1	1	<i>Pantoea</i>	2	1	*	*	1	*	*
<i>Proteus mirabilis</i>	25	4	2								
<i>Proteus vulgaris</i>	8	1	1	<i>Proteus</i>	33	5	15.2	5.7-32.7	3	9.1	2.3-25.5
<i>Providencia rettgerii</i>	1	1	1	<i>Providencia</i>	1	1	*	*	1	*	*
<i>Serratia liquefaciens</i>	4	1	1								
<i>Serratia marcescens</i>	20	7	4	<i>Serratia</i>	24	8	33.3	16.4-55.3	5	20.9	7.9-42.7
Totals	498	155	121		498	155	31.1		121	24.3	

Legenda: TT=Teste de triagem; TC=Teste Confirmatório; IC=intervalo de confiança

Em relação à resistência a cefoxitina, sessenta e quatro das cento e vinte uma amostras produtoras de ESBL foram resistentes (52,9%). A Figura 1 mostra a frequência da sensibilidade a cefoxitina entre as amostras ESBL positivas. O somatório da frequência de amostras resistentes a cefoxitina em espécies não-*Escherichia coli* e não-*Klebsiella* spp. foi superior ao encontrado entre as clássicas produtoras de ESBL, quando consideradas isoladamente. Entre as clássicas produtoras, a maior frequência de resistência à cefoxitina foi encontrada em *Klebsiella pneumoniae*, seguida de *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*. Entre os isolados não-*Escherichia coli* e não-*Klebsiella* spp., a espécie *E. cloacae* teve 18 de seus 20 isolados considerados ESBL positivos resistentes a cefoxitina. *Serratia marcescens* apresentou 3 dos 4 isolados ESBL positivos resistentes à cefoxitina. As demais espécies mostraram 1 isolado ESBL positivo resistente a cefoxitina, com exceção de *Proteus vulgaris*, que não apresentou nenhum.

Figura 1 – Sensibilidade a cefoxitina dos isolados ESBL positivos de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e outras espécies.



Os antimicrobianos utilizados no teste de triagem foram avaliados quanto a sua sensibilidade e especificidade na detecção de ESBL, comparando os isolados triados por esses antibióticos, com aqueles positivos no teste confirmatório. A melhor sensibilidade foi obtida com ceftriaxona e cefotaxima, sendo ceftazidima o antibiótico que apresentou resultado menos satisfatório. A especificidade foi baixa para todos os antimicrobianos (Tabela 2).

Os resultados observados, quando *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. são consideradas separadamente das outras espécies, foram semelhantes, sendo a sensibilidade apresentada pela ceftazidima ainda menor na detecção de espécies não-*E. coli* e não *Klebsiella* spp.

Também no teste confirmatório, pode-se observar uma sensibilidade maior da combinação entre cefotaxima (CTX) e cefotaxima-ácido clavulânico (CTX+AC) na determinação da produção de ESBL. A especificidade foi de 100% para todas as combinações (Tabela 2). Quando *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. são consideradas separadamente das outras espécies, o resultado encontrado é semelhante. Porém, a sensibilidade de todas as combinações é menor para as espécies não-*Escherichia coli* e não-*Klebsiella* spp. Ao avaliar a sensibilidade na detecção de ESBL de duas combinações usadas simultaneamente, o valor encontrado aumenta para 89,2% quando são associados cefpodoxima/cefopodoxima mais ácido clavulânico (CPD/CPD+AC) e ceftazidima/ceftazidima mais ácido clavulânico (CAZ/CAZ+AC); 97,3% quando são associados CPD/CPD+AC e cefotaxima/ cefotaxima mais ácido clavulânico (CTX/CTX+AC) e 99,2% quando são associados CAZ/CAZ+AC e CTX/CTX+AC;



sendo 100% somente quando as três combinações são utilizadas. Na determinação da CIM, assim como no teste de disco-difusão (DD), o antibiótico cefotaxima apresentou maior sensibilidade na detecção de ESBL que a ceftazidima. O resultado obtido com os demais antimicrobianos usados na triagem de ESBL na CIM, também confirma os resultados obtidos na DD.

A potência (CIM 50) e atividade (CIM 90) de alguns antimicrobianos, além da sensibilidade dos isolados produtores de ESBL, podem ser observadas na Tabela 3. O ertapenem foi o antibiótico com maior potência, seguido pelo imipenem, sendo que os dois apresentaram a mesma sensibilidade. Amicacina teve a segunda melhor potência e também a segunda maior sensibilidade. Ciprofloxacino e cefepime apresentaram potências semelhantes, seguidos de aztreonam, ceftazidima, cefotaxima e por último ceftriaxona. A sensibilidade as cefalosporinas de terceira geração e aztreonam variaram de 7,4 a 33%, enquanto da cefepime foi 46,1%. Os mesmos resultados são obtidos se *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. forem consideradas separadamente das outras espécies.

Tabela 2- Sensibilidade e especificidade dos antimicrobianos utilizados na triagem e confirmação de amostras produtoras de ESBL

Teste	ATM	CRO	CPD	CAZ	CTX	DC1	DC2	DC3
Sensibilidade (%)	94,2	99,2	95,9	85,1	99,2	76,9	70,2	96,7
Especificidade (%)	26,5	11,8	11,8	32,3	11,8	100	100	100

Legenda: CPD=cefpodoxima; CAZ=ceftazidima; CTX= cefotaxima; DC1 (disco combinado 1)= cefpodoxima/ cefpodoxima + ácido clavulânico; DC 2 (disco combinado 2)= ceftazidima/ ceftatazidima + ácido clavulânico; DC 3 (disco combinado 3)= cefotaxima/ cefotaxima+ ácido clavulânico.

Tabela 3- Potência (CIM 50), atividade (CIM 90) e perfil de sensibilidade dos antimicrobianos testados contra as amostras produtoras de ESBL

Antibiótico	CIM 50	CIM 90	% Sensível
ATM	32	>256	16,5
CPM	16	64	46,1
CAZ	32	>128	32,9
CTX	128	256	7,4
CRO	256	>256	9,1
IPM	0,5	2	100
AMI	8	32	86,6
CIP	16	>16	33,8
ERT	0,12	2	100

Legenda: CIM 50 : mínima concentração capaz de inibir 50% dos isolados; CIM 90 : mínima concentração capaz de inibir 90% das amostras.

## DISCUSSÃO

Devido a importância da detecção de ESBLs, métodos de triagem e confirmatórios são utilizados rotineiramente para pesquisar a produção dessas enzimas em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. Com o aumento da ocorrência também em outras enterobactérias, é preciso avaliar a ocorrência também em espécies não-*Escherichia coli* e não-*Klebsiella* spp., na rotina laboratorial.

A frequência de amostras possíveis produtoras de ESBL entre as enterobactérias estudadas foi 31,1%. Enquanto a de produtores confirmados foi 24,3%. Esse valor é considerado elevado quando comparado à trabalhos realizados em outras regiões (Schawber *et al.*, 2004), demonstrando a importância da pesquisa desse mecanismo de resistência nos hospitais estudados. O resultado é semelhante ao encontrado por outros autores no Brasil, que detectaram a produção de ESBL em 29% das enterobactérias testadas (Mendes *et al.*, 2000). A proporção de isolados confirmados em relação as possíveis produtoras de ESBL (121/155 ou 78%) reforça a necessidade do teste confirmatório na diferenciação de ESBLs e outros mecanismos de resistência a  $\beta$ -lactâmicos.

A espécie *Klebsiella pneumoniae* (67 isolados ESBL positivos) foi a principal produtora de ESBL, como era esperado (Bradford, 2001). Porém, *Enterobacter cloacae* (20 isolados ESBL positivos) teve prevalência maior que as outras clássicas produtoras (*Escherichia coli* = 14 e *Klebsiella oxytoca* = 3). O mesmo foi descrito por Mendes *et al.* (2000). Foram encontrados isolados

produtores de ESBL entre todas as espécies testadas, com exceção de *Enterobacter gergoviae*. A descrição de ESBL em várias espécies de enterobactérias, também já foi descrita por outros autores (Pagani *et al.*, 2002; Champs *et al.*, 2000; Galbart *et al.*, 2000; Warren *et al.*, 2000; Pitout *et al.*, 2003; Scherawber *et al.*, 2004).

A ocorrência de ESBL em isolados não-*Escherichia coli* e não-*Klebsiella* spp. foi de 21,5%, sendo menor que para *Klebsiella pneumoniae*, considerada a principal espécie produtora, porém semelhante a *Klebsiella oxytoca* (21,4%) e maior que *Escherichia coli* (7,2%), que também são consideradas produtoras clássicas. Esses resultados são maiores que os encontrados nos EUA (Bradford, 2001; Schwaber *et al.*, 2004), porém, semelhante aos estudos obtidos em um levantamento realizado em diversos países da América Latina para *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli* (Sader, 2001), mostrando que a circulação de ESBL é maior na região estudada.

Entre as espécies não-*Escherichia coli* não-*Klebsiella* spp., as maiores percentagens de isolados ESBL positivos foram encontrados nos gêneros *Enterobacter*. (27,1%), *Serratia* (20,9%), *Citrobacter* (14,3%) e *Morganella* (11,8%), sendo que todos esses gêneros produzem  $\beta$ -lactamase do tipo AmpC cromossômica induzível. É sabido que a diminuição na permeabilidade da bactéria aos antimicrobianos e a produção de outras beta-lactamases induzíveis podem mascarar a presença de ESBL (Varela *et al.*, 2001; Schwaber *et al.*, 2004; Tenover *et al.*, 1999; Thomsom, 2001). Como esses gêneros apresentaram também elevado número de amostras inconclusivas, é razoável supor que a ocorrência

nesses gêneros pode ser ainda maior, e deve ser avaliada por técnicas de biologia molecular.

O elevado número de isolados produtores de ESBL resistentes a cefoxitina encontrado (64/121 ou 52,98%), pode ser explicado pela grande quantidade de bactérias que possuem AmpC cromossômica entre as consideradas ESBL positivas, já que as ESBLs não conferem resistência a esse antibiótico. Porém, a cefoxitina não pode ser usada isoladamente para diferenciar ESBL de AmpC ou de outras beta-lactamases, por que outros mecanismos, como mutações em porinas, podem conferir esse fenótipo, quando sozinhos ou associados a  $\beta$ -lactamase na célula bacteriana (Yan *et al.*, 2004).

É importante observar que as espécies clássicas também tiveram isolados ESBL positivos resistentes a cefoxitina (28 isolados em *Klebsiella pneumoniae*; 5 isolados em *Escherichia coli* e 2 isolados em *Klebsiella oxytoca*) e que *Klebsiella pneumoniae* teve ainda, amostras inconclusivas (5 isolados). É conhecida a recente disseminação de enzimas AmpC plasmídicas nessas espécies, podendo ser motivo desses achados, além da possível mutação em porinas (Coudron *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2004).

Além de enzimas que mascaram a presença de ESBL, as enterobactérias podem possuir  $\beta$ -lactamases sensíveis ao ácido clavulânico, que quando produzidas em maiores concentrações, são capazes de reduzir a sensibilidade às cefalosporinas de terceira geração e aztreonam (Schwaber *et al.*, 2004; BUSH *et al.*, 1995; Livermore, 2001) sendo confundidas com ESBLs; é o caso das  $\beta$ -lactamases cromossômicas *Klebsiella oxytoca* e de *Proteus vulgaris* ou

plasmidiana de *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae* (Schwaber *et al.*, 2004).

As diferenças fenotípicas entre as  $\beta$ -lactamases sensíveis aos inibidores e as ESBLs foram utilizadas para distingui-las. No caso das enzimas K1 de *Klebsiella oxytoca* usa-se a propriedade de não conferirem resistência a ceftazidima. Além disso, a enzima K1 só confere resistência à cefalosporinas de terceira geração, quando a enzima está presente em altas concentrações, não sendo o ácido clavulânico, presente nos testes utilizados, suficiente para inibi-la de forma eficaz.

As enzimas cromossômicas de *Proteus vulgaris* foram diferenciadas das ESBLs, por não conferirem resistência ao aztreonam. Já as enzimas pertencentes ao grupo 2f encontradas em *Enterobacter cloacae* e *Serratia marcescens* são enzimas capazes de degradar carbapenems, enquanto as ESBLs não o são (Bush *et al.*, 1995; Livermore, 1995; Bush, 2001).

A ocorrência de ESBL em outras espécies de enterobactérias, além das tradicionais *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., já tem sido descrita por vários autores (Bonnet *et al.*, 2000; Schwaber *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2000; Tenover *et al.*, 1999; Varela *et al.*, 2001). Existe, no entanto, grande dificuldade em avaliar essa ocorrência devido à falta de uma metodologia padronizada.

Schwaber *et al.* (2004) relataram recentemente que nos EUA ainda não existe a necessidade de uma padronização para pesquisa de ESBL em espécies não-*Escherichia coli* e não-*Klebsiella* spp., devido a pequena incidência desse fenótipo, que no trabalho citado foi igual a 2,2%. Mas, na região estudada, a

incidência é aproximadamente dez vezes maior justificando a pesquisa de ESBL em espécies não-*E. coli* e não-*Klebsiella* spp. nos hospitais de Curitiba.

Existem controvérsias a respeito da importância clínica de se reportar ESBL em espécies produtoras de beta-lactamases cromossômicas induzíveis, que corresponderiam à maioria das ESBLs não-clássicas encontradas no presente trabalho. As cefalosporinas de terceira geração são consideradas resistentes para esse grupo. Contudo cabe a consideração de que o cefepime representa uma opção terapêutica para os microrganismos produtores de AmpC, ao passo que cepas produtoras de ESBL são resistentes (Livermore, 1995). No caso do *Proteus mirabilis*, a detecção é tão importante como em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, pois a espécie não possui  $\beta$ -lactamases cromossômicas conhecidas (Livermore, 1995), tendo sido padronizada recentemente pelo CLSI (2005). Além disso, a detecção é epidemiologicamente importante porque o gene de resistência encontra-se em plasmídios dissemináveis (Thomson, 2001).

Quanto à avaliação da eficiência dos substratos utilizados nos testes de triagem e de confirmação da produção de ESBL, verificamos a maior sensibilidade dos antimicrobianos ceftriaxona e cefotaxima na detecção de ESBL, tanto para as clássicas *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., quanto para as demais espécies. Um bom resultado foi também encontrado com cefpodoxima e com aztreonam, ficando a ceftazidima com o resultado menos satisfatório, em especial para espécies não-*Escherichia coli* e não-*Klebsiella* spp. Esses resultados dizem respeito, principalmente ao tipo de enzima presente, que tem afinidade diferente com os diversos substratos. Nesse caso, a enzima tem maior afinidade pela cefotaxima



que pela ceftazidima, característica típica das beta-lactamases do tipo CTX-M, já encontrada em outros hospitais do Brasil (Bonnet *et al.*, 2000; Bonnet *et al.*, 2001) e considerada o tipo dominante na América do Sul (Livermore e Brown, 2001).

A sensibilidade do teste de adição de ácido clavulânico demonstrou a necessidade de associar ao menos duas combinações diferentes de cefalosporinas e de cefalosporinas mais ácido clavulânico, a fim de obter uma sensibilidade satisfatória, principalmente para as espécies não-*E. coli* e não *Klebsiella* spp. M'Zali *et al.* (2000) também observaram o aumento na sensibilidade da detecção de ESBL quando mais de um substrato é utilizado.

Entre os antimicrobianos avaliados quanto à concentração inibitória mínima, os carbapenêmicos apresentaram a melhor potência ( $MIC_{50}$ ), sendo que o ertapenem ( $MIC_{50} = 0,12$ ) foi mais potente que o imipenem ( $MIC_{50} = 0,5$ ). Kholer *et al.* (1999). demonstraram que isso ocorre devido a maior afinidade do ertapenem com as PBP 3, sendo a afinidade com PBP 2 semelhante para os dois. O ertapenem tem sido recomendado para o tratamento de infecções causadas por cepas produtoras de ESBL. Este antibiótico pode ser utilizado em dose diária única, o que reduz o custo e possibilita tratamento ambulatorial; além disso apresenta boa atividade contra não-fermentadores de glicose, não contribuindo na pressão seletiva responsável pelo aumento da incidência de *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. resistentes a carbapenêmicos (Livermore *et al.*, 2003; Livermore *et al.*, 2001; Fuchs *et al.*, 2001).

A reduzida sensibilidade (33,8%) das cepas ESBL positivas a ciprofloxacino confirma que a resistência cruzada entre beta-lactâmicos e quinolonas é bastante

comum em enterobactérias. Esse dado pode ser reforçado quando se considera o total de isolados bacterianos aqui estudados, cuja sensibilidade ao ciprofloxacino é de 67,3%.

A resistência cruzada com amicacina foi um evento menos comum. Este aminoglicosídeo apresentou a melhor potência e sensibilidade depois dos carbapenêmicos, resultado compatível com o encontrado por outros autores (Shukia *et al*, 2004). Porém um antibiótico com elevada toxicidade e seu uso é bastante restrito (Tavares, 2001), sendo os carbapenêmicos, as drogas de escolha para infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL .

A CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> foi elevada para todas as cefalosporinas e aztreonam, como era esperado. Porém, a sensibilidade nos testes *in vitro*, confirma a necessidade de testes específicos para detecção da enzima e a liberação dos resultados de todos os  $\beta$ -lactâmicos, exceto carbapenêmicos, como resistentes. Essa necessidade tem sido discutida por vários autores como essencial para garantir uma terapia adequada para os pacientes e, ainda, para auxiliar na determinação de medidas de controle adequadas (Essack, 2000).

É possível concluir que é necessário buscar a produção de ESBL também em espécies não-*E. coli* e não-*Klebsiella* spp. e que a cefotaxima demonstrou ser o melhor antibiótico para triagem e confirmação de ESBL em espécies produtoras de ESBL clássicas, e também para as outras espécies, nos hospitais envolvidos. Além disso, os carbapenêmicos foram confirmados como os antimicrobianos com melhor potência e atividade contra as bactérias produtoras de ESBL.

## REFERÊNCIAS

1. Bonnet R, Sampaio JLM, Labia R, Champs C, Sirot D, Chanal C, Sirot J (2000) A novel CTX-M  $\beta$ -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1936-1942.
2. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JLM, CHANAL C, Sirot D, Labia R, Champs C, Sirot J (2001) Novel Cefotaximase (CTX-M-16) with Increased Catalytic Efficiency Due to Substitution Asp-240  $\rightarrow$ Gly. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2269-2275.
3. Bonnet R (2004) Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1-14.
4. Bradford P A (2001) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: caracterização, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14: 933-951.
5. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA (1995) A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structures. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1211-1233.
6. Champs C, Bonnet R, Sirot D, Chanal C, Sirot J. (2000) Clinical relevance of *Proteus mirabilis* in hospital patients: a two year survey. *J Antimicrob Chemoter.* 45: 537-539.
7. CLINICAL LABORATORIES STANDARDS INSTITUTE (2005) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI. Wayne. PA.
8. Coudron PE, Hanson ND, Climo MW (2003) Occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediate FOX-5 and ACT-1 AmpC  $\beta$ -lactamases. *J Clin Microbiol* 41: 772-777.
9. Fuchs PC, Barry AL, Brown SD (2001) *In vitro* Activities of Ertapenem (MK-0826) against Clinical Bacterial Isolates from 11 North American Medical Centers. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1915-1918.

10. Gruteke P, Goessens W, Gils J, Peebooms P, Toom NL, Santen-Verheuel M, Belkum A, Verbrugh H (2003) Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. *J Clin Microbiol* 41: 1161-1166.
11. Janda JM, Abbott SL, Cheung WKW, Henson DF (1994) Biochemical identification of Citrobacteria in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 32: 1850-1854.
12. Janis ER (1994) Maintenance by criopreservation . In *Maintenace of Microorganisms a Manual of Laboratory Methods*. 2.ed. London: Academic Press INC, pp 161-165.
13. Kholer J, Dorso KL, Young K, Hammond, Rosen H, Kropp H, Silver LL (1999) *In vitro* Activies of the Potent, Broad-Spectrum Carbapenem MK-0826 (L-749,345) against Broad-Spectrum  $\beta$ -lactamases and Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1170-1176.
14. Knothe H, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitsuhashi S (1983) Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitina, cefamandole e cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 11: 315-317.
15. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Scherckenberger PC, Winm WC (2001) In *Diagnóstico microbiológico*. 5.ed. São Paulo: Editora Médica e Científica, pp 177-250.
16. Livermore DM (1995)  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8: 557-584.
17. Livermore DM, Brown DFJ (2001) Detection of  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. *J Antimicrobial Chemoter* 48: 59-64.
18. Livermore DM, Oakton KJ, Carter MW, Warner M (2001) Activity of Ertapenem (MK-0826) versus *Enterobacteriaceae* with Potent  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2831-2837.

19. Livermore DM, Sefton AM, Scott GM (2003) Properties e Potential of Ertapenem. *J Antimicrobial Chemoter* 52:331-344.
20. Mendes C, Hsiung A, Kiffer C; Oplustil C, Sinto S, Mimica I, Zoccoli C (2000) Evaluation of the *in vivo* Activity of 9 Antimicrobials Against Bacterial Strains Isolated from Patients in Intensive Care Units in Brazil: MYSTIC Antimicrobial Surveillance Program . *Braz J Infect Dis* 4: 236-244.
- 21.M'Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, Birkenhead D, Hawkey PM (2000) Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the MAST DD test, the double disk and the E-test ESBL, *J Antimicrobial Chemoter* 45: 881-885.
22. Mulvey MR, Soule G, Boyd D, Demczuc W, Ahmed R (2003) Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada. *J Clin Microbiol* 41: 460-462.
23. Schreckenberber PC, Janda JM Wong JD, Baron EJ (2003) Algorithms Identification of aerobic Gram -negative bacterias. In *Manual of Clinical Microbiology*. 8.ed. New York: American Society Microbiology, pp 442-483.
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 5.ed. NCCLS Document M7-A5. NCCLS. Wayne. PA.
25. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard. 7.ed. NCCLS Document M2-A7. NCCLS. Wayne. PA.
26. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2004) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS Document M100-S14. NCCLS. Wayne. PA.
- 27.O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM (2000) Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*. *Clin Microbiol Rev* 13: 534-546.

28. Pagani L, Migliavacca R, Pallecchi L, Matti C, Giacobone E, Amicosante G, Romero E, Rossolini GM. (2002) Emerging extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Proteus mirabilis*. *Jf Clinl Microbiol* 40: 1549-1552.
29. Podschun R, Ullmann (1998) *Klebsiella* spp as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *J Clin Microbiol* 11: 589-603.
30. Queenan AM, Foleno B, Gownley C, Wira E, BUSH K (2004) Effects of inoculum and  $\beta$ -lactamase activity in AmpC- and Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Tested by using NCCLS ESBL Methodology. *J Clin Microbiol* 42: 269-275.
31. Sader HS (2000) Antimicrobial resistance in Brazil: Comparison of results from two multicenter studies. *Braz J Infect Dis* 4: 91-99.
32. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zocolli C, Barth A, Jones RN (2001) Pathogen frequency and resistance patterns in brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program . *Braz J Infect Dis* 5: 200-214.
33. Sanders WEJR, Sanders CC (1997) *Enterobacter* spp: Pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev* 10: 220-241.
34. Schwaber MJ, Raney PM, Rasheed LK, Biddle JW, Williams P, McGowan JE, Tenover FC (2004) Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in non-*Escherichia coli* and non-*Klebsiella* spp. of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 42: 294-298.
35. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A (2004) Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram -negative bacilli producing extended-spectrum- $\beta$ -lactamases. *Res Microbiol* 155: 409-421.
36. Shukia i, Tiwari R, Agraval M. (2004) Prevalence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital. *Indian J of Med Microbiol* 22: 87-91.
37. Tavares W. Aminoglicosideos In: Maual de antibiótico e quimiote'rpicos antiinfeciosos. 3.ed. Atheneu: São Paulo, 2001. p. 601-603.

38. Tenover FC, Mohammed MJ, Gorton TS, Dembek ZF (1999) Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: survey of laboratories in Connecticut. *J Clin Microbiol* 37: 4065-4070.
39. Thonson KS (2001) Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *Em Infect Dis* 7: 333-336.
40. Varela C, Oliver A, Coque TM, Baquero F, Canton R (2001) Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in group-1  $\beta$ -lactamases-producing isolates. *Clin Microbiol Infect* 7: 278-282.
41. Yan JJ, KO W, WU H, Tsai S, Chuang C, Wu J (2004) Complexity of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Resistant to Both Cephamycins and Extended-Spectrum Cephalosporins at a Teaching Hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol* 42: 5337-5340.

## ANEXOS

### ANEXO I – FÓRMULAS DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS

#### 1 - MBA – MEIO BASE PARA AÇUCAR - CALDO BASE PÚRPURA DE BROMOCRESOL

##### 1.1.Fórmula:

Peptona de caseína:	10 gram as
Extrato de carne:	1 gram a.
Cloreto de sódio:	5 gram as.
Púrpura de bromocresol (0,04% aq.):	37,5 mL.
Água destilada:	962,5 mL.
pH final:	6,8.

##### 1.2. Modo de Preparo:

Misturar todos os ingredientes e aquecer suavemente até completa dissolução, colocando por ultimo o indicador e ajustando pH. Distribuir 5mL em tubos com tampas, autoclavar a 121° C durante 20 minutos, conservar em geladeira.

1.3. As soluções de: glicose, lactose, adonitol, arabinose, arabitól, celobiose, dulcitol, galactose, inositol, manitol, maltose, melobiose, manose, rafnose, ramnose, sacarose, salicilina, sorbitol, trealose e xilose; são adicionadas no momento do uso, em quantidade suficiente para obter a concentração de 0,5 mg/mL para salicilina e 1,0 mg/mL para os demais.

1.4. No tubo da glicose utiliza-se um tubo de Durham para verificar a formação de gás.

#### 2. CITRATO SIMMONS ÁGAR.

##### 2.1. Fórmula:

Citrato Simmons Ágar	Pesar conforme instrução do fabricante
Água Destilada	1000 ml

##### 2.2. Modo de Preparo:

Pesar o meio, acrescentar água, deixar em repouso por 10 minutos e aquecer homogeneizando levemente até fervura para completa dissolução do ágar. Ajustar o pH conforme instrução do fabricante. Distribuir 4ml em tubos com tampas, autoclavar por 15 minutos 121°C. Conservar em geladeira.

#### 3. FENILALANINA AGAR

##### 3.1. Fórmula:

Extrato de levedura:	3 gram as
Fosfato dipotássico:	1 gram a
Cloreto de sódio:	5 gram as
DL – fenilalanina:	2 gram as
Agar:	12 gram as
Água Destilada q.s.p.	1000mL.
pH final:	7,3

##### 3.2. Modo de Preparo:

Pesar 23 gram as do meio pronto e dissolver em 1000 mL de água destilada. Acertar o pH e aquecer até dissolver completamente. Distribuir em tubos com tampa, esterilizar em autoclave a 121° C durante 15 minutos. Deixar o meio solidificar em posição inclinada. Conservar em geladeira.



#### 4. CALDO MALONATO

##### 4.1. Fórmula:

Malonato Broth	Pesar conforme instrução do fabricante
Água Destilada	1000ml

##### 4.2. Modo de Preparo:

Pesar o meio, acrescentar água, deixar em repouso por 10 minutos e aquecer agitando freqüentemente até fervura para completa dissolução. Ajustar o pH em  $6,7 \pm 0,2$ . Distribuir 4ml em tubos com tampas. Autoclavar a  $121^{\circ}$  C durante 15 minutos. Ajustar o pH em  $7,4 \pm 0,2$ . Autoclavar o meio a  $121^{\circ}$  C durante 15 minutos. Conservar em geladeira.

#### 5. ORNITINA DECARBOXILASE

##### 5.1. Fórmula:

Base de Falkow (Merck 6934):	1,8 gram as.
L-Ornitina:	1 gram a.
Água destilada:	200 mL.

pH:  $6,7 \pm 0,1$ .

##### 5.2. Modo de Preparo:

Pesar os componentes e diluir em 20 mL de água destilada, aquecer somente o suficiente para dissolver, ajustar o pH em 6,7. Distribuir em tubo com tampa a uma altura de 3cm. Autoclavar a  $121^{\circ}$  C durante 15 minutos. Conservar em geladeira.

#### 6. LISINA DECARBOXILASE

##### 6.1. Fórmula:

Base de Falkow:	1,8 gram as.
L-Ornitina:	1 gram a.
Água destilada:	200 mL.

pH:  $6,7 \pm 0,1$

##### 6.2. Modo de Preparo:

Pesar os componentes e diluir em 20 mL de água destilada, aquecer somente o suficiente para dissolver, ajustar o pH em 6,7. Distribuir em tubo com tampa a uma altura de 3cm. Autoclavar a  $121^{\circ}$  C durante 15 minutos. Conservar em geladeira.

#### 7. ARGININA DIHIDROLASE

##### 7.1. Fórmula:

Base de Falkow	9,0 g
L-arginina	5,0 g
Água destilada	1.000ml

##### 7.2. Modo de Preparo:

Pesar os componentes, acrescentar água, homogeneizar deixando em repouso por 10 minutos, aquecer o suficiente para completa dissolução. Ajustar o pH em  $6,8 \pm 0,2$ . Distribuir 4ml em tubos com tampa. Autoclavar a  $121^{\circ}$  C durante 15 minutos. Conservar em geladeira.

#### 8. CALDO INDOL

##### 8.1. Fórmula:

Extrato de carne:	1 gram a.
Peptona:	4 gram as.
Cloreto de sódio:	1 gram a.
L-Triptofano:	0,2 gram a.



B.H.I	40,0g
Ágar	15,0g
Água destilada	1.000ml

#### 12.2. Modo de Preparo:

Pesar todos os componentes, acrescentar água, deixar em repouso por 10 minutos, aquecer agitando freqüentemente até fervura para completa dissolução. Ajustar o pH em  $7,0 \pm 0,2$ . Distribuir 5ml em tubos com tampa. Autoclavar a  $121^\circ \text{C}$  durante 15 minutos. Conservar em geladeira entre  $2$  e  $8^\circ \text{C}$ .

### 13. DETECÇÃO DE $\text{H}_2\text{S}$ (Ágar Sulfito Bismuto – BSA)

#### 13.1. Fórmula:

Caseína/peptona (50/50)	10,0g
Extrato de carne	5,0g
Glucose	5,0g
Fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	4,0g
Sulfeto ferroso ( $\text{Fe SO}_4$ )	0,3g
Sulfito de Bismuto	8,0g
Verde brilhante	0,025g
Ágar	20g
Água destilada	1000mL

#### 13.2. Modo de Preparo:

Pesar todos os componentes, acrescentar água, deixar em repouso por 10 minutos, aquecer agitando freqüentemente até fervura para completa dissolução. Ajustar o pH em  $7,5 \pm 0,2$ . Distribuir 5ml em tubos com tampa. Autoclavar a  $121^\circ \text{C}$  durante 15 minutos. Conservar em geladeira entre  $2$  e  $8^\circ \text{C}$ .

### 14. MEIO DE CLARK E LUBS (PARA VM E VP)

#### 14.1. Fórmula:

Peptona	7,0g
Glucose	5,0g
Tampão fosfato de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	5,0g
Água destilada	1000 mL

#### 14.2. Modo de Preparo:

Acrescentar água após a pesagem dos componentes e aquecer sob agitação até a fervura para completa dissolução. Ajustar o pH em 6,9. Distribuir 5ml em tubos com tampa. Autoclavar a  $121^\circ \text{C}$  durante 15 minutos. Conservar em geladeira entre  $2$  e  $8^\circ \text{C}$ .

14.3. Reativo Vermelho de Metila (VM): 0,1 g de vermelho de metila em 300mL de etanol 95%

14.4. Reativo de Voges-Prostauker (VP): A) 5% de  $\alpha$ -naftol em 95% de etanol. B) Hidróxido de potássio 40%.



### ANEXO III- TÉCNICA DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

#### (CIM) POR MICRODILUIÇÃO EM AGAR (NCCLS, 2000)

##### 1. VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES TESTADAS

Deve abranger as concentrações limite, estabelecidas pela NCCLS (NCCLS, 2004), para a determinação dos padrões de sensibilidade das cepas a serem testadas, e ainda as concentrações padronizadas para as cepas controle. As concentrações a serem testadas para cada antibiótico são determinadas incluindo duas concentrações acima da limite de resistência até o menor valor atribuído as cepas controle.

Tabela 1.1: Antibióticos e Concentrações testadas na determinação da concentração inibitória mínima.

Antibiótico	Concentrações testadas ( $\mu\text{g/mL}$ )
Amicacina	0,5 - 256
Aztreonam	0,06 – 128
Cefepime	0,016 – 256
Cefotaxima	0,03 – 256
Ceftazidima	0,06 – 128
Ceftriaxona	0,03 – 256
Ciprofloxacino	0,004 – 16
Ertapenem	0,006 - 16
Imipenem	0,006 - 16

##### 2. CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE

Determinada de acordo com a maior diluição a ser usada e a quantidade de ágar Miller-Hinton a que será adicionada, pois o ágar dilui a solução do antibiótico. Podem ser usadas placas grandes, com 50 ml de MHA, suficientes para obter 3-4 mm de espessura padronizados, então a maior concentração a ser usada de cada antibiótico é multiplicada por 50 para obter a concentração de cada soluções estoque.

Antes de pesar o sal e preparar as soluções, deve-se corrigir o cálculo de acordo com a potência e pureza do mesmo. Deve-se ainda observar qual é o melhor solvente para aqueles insolúveis em água.

A solução deve ser alíquotada, em volumes menores, e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso.

Tabela 2.1 – Concentração das soluções estoque

<b>Agente antimicrobiano</b>	<b>Forma /Lote</b>	<b>Concentração da SE(ug/ml)</b>	<b>Concentração Io (ug/ml) no MHA</b>	<b>Potencia do ATB</b>	<b>Solvente utilizado</b>
Amicacina	Sal	12.800	256	740	Água
Ciprofloxacino	Sal	800	16	1000	Água
Imipenem	Med	3.200	64	500	NaCl 0,9%
Cefepime	Med	6.400	128	580	NaCl 0,9%
Cefoxitina	Sal	6.400	128	1000	Água
Ceftazidima	Sal	6.400	128	894	Água
Aztreonam	Sal	6.400	128	1000	Água
Cefotaxima	Sal	12.800	256	1000	Água
Ceftriaxona	Sal	12.800	256	1000	Água
Ertapenem	Med	3.200	64	900	NaCl 0,9%

### 3. DILUIÇÕES SERIADAS

A solução estoque é filtrada, para esterilização, e diluída com água destilada estéril (tipo Milli Q), em câmara de fluxo laminar horizontal, a fim de obter as concentrações desejadas. A primeira diluição deve fornecer a maior concentração a ser testada. A seguir, 1 mL é retirado e transferido para o próximo tubo com o mesmo volume de diluente. Esse processo é repetido até alcançar a menor concentração desejada.

### 4. PREPARO DAS PLACAS

O Miller-Hinton ágar deve ser preparado de acordo com as instruções do fabricante, observando os cuidados necessários. Após diluir o ágar em microondas, distribuí-se em alíquotas de 49 mL, usando frascos bem vedados. O pH médio do meio foi mantido entre 7,2 a 7,4. Após a esterilização em autoclave ( $121^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$ ), resfria-se em banho-maria  $48-50^{\circ}\text{C}$ . Adiciona-se o antimicrobiano, e após bem homogêneos distribuí-se em placas descartáveis esterilizadas, em câmara de fluxo laminar horizontal.

## 5. INÓCULO, INCUBAÇÃO E LEITURA DAS PLACAS

Para o inóculo, é recomendada a concentração final de  $10^4$  UFC (unidades formadoras de colônia). Para obtê-la, primeiramente ajust-se a suspensão bacteriana em escala 0,5 de McFarland ( $10^8$  UFC/mL). Esta suspensão é diluída 1:10 a fim de se obter a concentração de  $10^7$  UFC/mL e utilizando o inoculador, que dispensa de 1 a 2  $\mu$ L, o resultado é a concentração final desejada, ou seja,  $10^4$  UFC.

O inóculo é feito usando um multinoculador com 96 pinos por contato, com alíquotas da suspensão bacteriana em placas de ELISA de 96 poços. Primeiramente é inoculada uma placa controle, sem antibiótico, e depois placas com concentração crescente de antibiótico. No final inocula-se também outra placa controle sem antimicrobiano, para avaliar a contaminação e o carregamento de antibióticos pelo multinoculador. Esperou-se que os inóculos secassem (30 minutos), as placas foram incubadas  $36^\circ$  C por 16-20 horas.

A concentração inibitória mínima é a menor concentração do antibiótico que inibe completamente o crescimento bacteriano, não considerando a película causada pelo depósito bacteriano. A potência do antibiótico é definida pela concentração capaz de inibir cinquenta por cento (50%) das cepas (CIM 50) e a atividade pela concentração capaz de inibir noventa por cento (90%) das cepas (CIM 90).

## 6. CONTROLE DE QUALIDADE (NCCLS, 2004).

O controle de qualidade dos testes de sensibilidade, bem como dos testes confirmatórios para ESBL, foram realizados com cepas controle ATCC (American Type Collection Culture) : *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, utilizando para o controle os critérios estabelecidos pelo NCCLS,2004.

**ANEXO IV- RESULTADOS OBTIDOS PARA OS ISOLADOS POSITIVOS NO TESTE DE TRIAGEM**

**A- Resultados do Teste de Disco Difusão**



**ANEXO IV-PLANILHA DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA OS ISOLADOS  
POSITIVOS NO TESTE DE TRIAGEM**

**B- Resultados da concentração inibitória mínima**

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOVA, M.; YANG Y; LIVERMORE, D. M. Interactions of tazobactam and clavulonato with inducibly and constitutively-expressed class 1  $\beta$ -lactamases. **Journal Antimicrobial Chemother**, v. 25, p. 199-208, 1990.

ALBERTI, S. *et al.* A porin from *Klebsiella pneumoniae* sequence homology, three-dimensional structure, and complement binding. **Infectious Immunology**, v. 63, p. 903-910, 1995.

AMBLER, R. P. The structure of  $\beta$ -lactamases. **Philos Trans Society Londres**, v. 289, p. 321-331, 1980.

ARAKAWA, A. *et al.*, Chromosomal  $\beta$ -lactamase of *Klebsiella oxytoca* a new class A enzyme that hydrolyses broad-spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 33, p. 63-70, 1989.

ARLET, G. *et al.* Molecular characterization by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM  $\beta$ -lactamases, **FEMS Microbiology Letters**, v. 134, p. 1498-1500, 1995.

BABCOCK, H. M. *et al.* Ventilator-associated pneumonia in a multi-hospital system: differences in microbiology by location. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v. 24, n.1, p.853-858, 2003.

BAUERNFEIND, A *et al.* A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. **Infection**, v. 20, p. 158-163, 1992.

BAUERNFEIND, A *et al.* A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, v. 18, p. 294-298, 1990.

BEDENIC, B.; BEADER, N.; ZAGAR, Z. Effect of inoculum size on the antibacterial activity of cefpirome and cefepime against *Klebsiella pneumoniae* strains producing SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Clinical Microbiology Infection**, v. 7, p. 626-635, 2001.

BERTRAND, X. *et al.* Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a French university-affiliated hospital. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, p.128-133, 2003.

BIDNENKO, E. *et al.* Estimation of the state of the bacterial cell wall by fluorescent situ hybridization. **Applied Environment Microbiology**, v. 8, p. 3059-3062, 1998.

BOCCIA, D. *et al.* Nosocomial necrotizing enterocolitis outbreaks: epidemiology and control measures. **European Journal Pediatric**, v. 160, p. 385-391, 2001.

BONNET, R. *et al.* A novel CTX-M  $\beta$ -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 1936-1942, 2000.

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

BORNET, C. *et al.* Imipenem and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, p. 985- 990, 2003.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 933-951, 2001.

BRITO, D. V. D. *et al.* An outbreak of nosocomial infection caused by ESBLs producing *Serratia marcescens* in a Brazilian neonatal unit. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 3, p. 149-155, 1999.

BUSH, K. New  $\beta$ -lactamases 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 functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structures. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.1211-1233, 1995.

CARSON, C.; NARBER K. G. Role of fluorquinolones in treatment of serious bacterial urinary tract infections. **Drugs**, v. 64, p. 1359-1373, 2004.

CARTER, M. W. *et al.* Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiellae* with the oxoid combination disk method. V. 38, p. 4228-4232, 2000.

CHAMPS, C. de *et al.* Clinical relevance of *Proteus mirabilis* in hospital patients: a two year survey. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 537-539, 2000.

CHAMPS, C. *et al.*, Prospective survey of colonization and infections caused by expanded-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 12, p. 2887-2890, 2004.

CHASTRE, J. FAGON, J. Y. Ventilator associated pneumonia. **American Journal Respiratory Critical Care**, v. 165, apr. 2002.

CLINICAL LABORATORIES STANDARDS INSTITUTE (2005) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI. Wayne. PA.

COLODNER, R *et al.* Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. **European Journal Microbiology Infectious Diseases**, v.23, p.163-167, 2004.

CORKILL, JE *et al.* SHV-27 a novel cefotaxime-hydrolysing  $\beta$ -lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.47, p.463-465, 2001.

CORNAGLIA, G. *et al.* Relative importances of outer permeability and group 1 beta-lactamases as determinants of meropenem and imipenem activities against *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 2, p. 350-355, 1995.

COUDRON, P. E.; HANSON, N. D.; CLIMO, M. W. Occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC  $\beta$ -lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 772-777, 2003.

DATT, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R-factor in *Enterobacteriaceae*, **Nature**, v. 208, p. 239-241, 1965.

FARMER, J. J. *Enterobacteriaceae*: Introduction and Identification. In: Murray, R. P. *et al.* **Manual of Clinical Microbiology**, 6. ed. Washington: American Society for Microbiology, p. 446-447, 1995.

GALANI, I. *et al.* Transferable plasmid mediating resistance to multiple antimicrobial agents in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Greece. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, p. 579-588, 2002.

GALBART, J. O. *et al.* TEM-24 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter aerogenes*: long-term clonal dissemination in french hospitals. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, p. 316-323, 2000.

GALES, A. C.; SADER, H. S.; JONES, R. N. Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin American: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). **Diagnostics Microbiology and Infectious Diseases**, v. 44, p. 301-311, 2002 (a).

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). **Diagnosics Microbiology and Infectious Diseases**, v. 44, p. 289-299, 2002 (b).

GHUYSEN, J. M. Serine  $\beta$ -lactamases and penicillin-binding proteins. **Annual Review Microbiology**, v. 45, p. 37-67, 1993.

GIAKKOUPI, P. *et al.* VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, p. 3893-3896, 2003.

GNIADKOWSKI, M. *et al.* Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase that is closely related to the CTX-M-1\MEN-1 enzyme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 824-832, 1998.

GNIADKOWSKI, M. Evaluation and epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing organisms. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, p. 597-608, 2001.

GRUTEKE, P. *et al.* Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1161-1166, 2003.

GUPTA, A. Hospital-acquired infections in the neonatal intensive care unit-*Klebsiella pneumoniae*. **Semen Perinatol**, v. 26, p. 340-345, 2002.

HANBERGER, H. *et al.* Antibiotic susceptibility among aerobic gram -negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. **JAMA**, v. 281, p. 67-71, 1999.

HERNANDEZ, J. R. *et al.* *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). **Enferm Infec Microbiol Clin**, v. 21, p. 77-82, 2003.

HUMENIUK, C. *et al.*, Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 46, p. 3045-3049, 2002.

JACOBY, G. A.; CARRERAS L. Activities of  $\beta$ -lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 34, p. 858-862, 1990.

JARLIER, V. *et al.* Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, 1988.

JONES, R. N. *et al.* Antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp with resistance phenotypes consistent with an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in Europe. **Clinical Microbiology and Infectious**, v. 9, p. 708-712, 2003.

KHOLER, J. *et al.* *In vitro* activities of the potent, broad-spectrum carbapenem MK-0826 (L-749,345) against broad-spectrum  $\beta$ -lactamases and Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v. 43, p. 1170-1176, 1999.

KIM, J. *et al.* Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1446-1449, 1998.

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

LEE, K. *et al.* Evaluation of efficiency of screening extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in hospitals where the bacteria are increasingly prevalent. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3696-3699, 2001.

LIVERMORE, D. M. *et al.* Activity of ertapenem (MK-0826) versus *Enterobacteriaceae* with potent  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2831-2837, 2001.

LIVERMORE, D. M. Mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. **Scandinavian Journal Infectious Diseases**, v.78, p. 7-16, 1991.

LIVERMORE, D. M.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 557-584, 1995.

LIVERMORE, D. M.  $\beta$ -lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotic Chemother**, v. 44, p. 215-220, 1991.

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

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

LUCAS, T. J. An evaluation of 12 methods for the demonstration of penicilinase. **Journal Clinical Pathology**, v. 32, p. 1061-1065, 1979.

MABILAT, C. *et al.* Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*, **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 34, p. 2210-2216, 1990.

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

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PASCOAL, A.; JACOBY, G.P. Quinolone resistance from transferable plasmid . **Lancet**, v. 351, p. 797-799, 1998.

MATSUMOTO, Y.; INOUE, M. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 43, p. 307-313, 1999.

MATTHEW, M. Plasmid mediated  $\beta$ -lacmases of gram -negative bacteria: distribution and properties. **Journal Antimicrobial Chemother**, v. 5, p. 349-358, 1979.

MATTHEW, M. Plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases of Gram -negative bacteria: properties and distribution. **Journal Antimicrobial Chemother**, v. 5, p. 349-358, 1979.

MEDEIROS, A. Evolution and dissemination accelerated by gerations of  $\beta$ -lactam antibiotics. **Clinical Infectious diseases**, v. 24, p. S19-S45.

MHAND, R. A. *et al.* Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Salmonella thyphimurium* by phenotypic typing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3769-3773, 1999.

MORITZ, W.; CARSON, P. B. D. Cefoxitin sensitivity as a marker for inducible beta-lactamases. **Journal Medical Microbiology**, v. 21, p. 203-207, 1986.

MOTTA, R.N. *et al.* Plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing strains of *Enterobacteriaceae* isolated from diabetic foot infection in a Brazilian diabetic center. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, p. 129-134, 2003.

MULVEY, M. R. *et al.* Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 460-462, 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: global informational supplement M100- S14**. NCCLS, 2004.

NAVON-VENEZIA, S. *et al.* Occurrence and phenotypic characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among members of the family *Enterobacteriaceae* at the Tel-Aviv medical center (Israel) and evaluation of diagnostics tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 155-158, 2003.

NIKAIDO, H. Outer membrane barrier as mechanism of antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 33, p. 1831-1836, 1989.

NORMARK, S. T.; GRUNDSTROM, T. ; BERGESTROM. Susceptibility to penicillins and cephalosporins in  $\beta$ -lactamase producing strains of *E. coli* and relative amount of  $\beta$ -lactamase produced by these strains. **Scandinavia Journal Infectious Diseases**, v. 25, p. 23-29, 1980.

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.

O'HARA, C. M.; BRENNER, F. W.; MILLER, J. M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 534-546, 2000.

OLIVA, B. *et al.*, Broad-spectrum  $\beta$ -lactamases of *Citrobacter diversus*. **Journal Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 335-341, 1990.

OPLUSTIL, C. O. *et al.* Multicenter Evaluation of resistance patterns of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Shigella* spp isolated from clinical specimens in Brazil: RESISTNET Surveillance Program . **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, p. 8-12, 2001.

PAGANI, L. *et al.* Emerging extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Proteus mirabilis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1549-1552, 2002.

PAGANI, L. *et al.* Multiple CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in Northern Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4264-4269, 2003.



PAI, H. *et al.* Identification of CTX-M-14 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3747-3749, 2001.

PAI, H. *et al.* Survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1758-1763, June 1999.

PARODI, S. *et al.* Nosocomial *Enterobacter* meningitis: risk factors, management, and treatment outcomes. **Clinical Infection Diseases**, v. 15, n. 37, p. 159-166.

PATTERSON, J. E. Antibiotic utilization: is there effect on antimicrobial resistance? **Chest**, v. 119, p. 426S-430S, 2001.

PÉDUZZI, J. *et al.* Characterization and amino acid sequence analysis of a new oxymino cephalosporin-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Serratia fonticola* CUV. **Biochemistry Biophys Acta**, v. 1341, p. 58-70, 1997.

PEÑA, C. *et al.* An outbreak of hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia, including strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. **Journal of Hospital Infection**, v. 47, p. 53-59, 2001.

PITOUT, J. D. D. *et al.* Modification of the double-disk test for detection of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 3933-3935, 2003.

PITOUT, J.D.D.; HOSSAIN, A. HANSON, N.N. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- $\beta$ -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp **Journal Clinical Microbiology**, v.42, p.5715-5721, 2004.

PODSCHUN, R.; ULLMANN. *Klebsiella* spp as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Journal of Clinical Microbiology**, v.11, p. 589-603, 1998.

POIREL, L. *In vivo* acquisition of high-level resistance to imipenem in *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3831- 3833, 2004.

QUEENAN, A. M. *et al.* Effects of inoculum and  $\beta$ -lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL)- producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 269-275, 2004.

RAHAL, J. J. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: how big is the problem? **Clinical Microbiology and Infection** v. 6,p. 2-6, 2000.

REIS, A. O. **Avaliação dos testes laboratoriais para a detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado.** São Paulo, 1999. 138 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

ROCH, A. L. Penicillin binding proteins, beta-lactams and lactamases: offensives, attacks and defensive countermeasures, v. 26, p. 205-220, 2000.

RODRIGUEZ-BANO, J. *et al.* Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamases –producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1089-1094, 2004.

ROUSSEL-DELVALLEZ, M. *et al.* Bactericidal activity of three  $\beta$ -lactams alone or in combination with a  $\beta$ -lactamase inhibitor and two aminoglycosides against *Klebsiella pneumoniae* harboring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 4, p. 570-576, 1998.

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.

SADER, H. S. *et al.* Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infection in Latin American medical centers. **Diagnostics Microbiology and Infectious Diseases**, v. 44, p. 273-280, 2003.

SADER, H. S. *et al.* Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program . **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, p. 200-214, 2001.

SANDERS, C. C. *et al.* Detection of extended-spectrum- $\beta$ -lactamases-producing members of the family *Enterobacteriaceae* with the Vitek ESBL test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2997-3001, 1996.

SANDERS, C. C. SANDERS, W. E. Clinical importance beta-lactamases in Gram -negative bacteria. **European Journal Clinical Microbiology**, v. 6, p. 435-438, 1987.

SANDERS, C. C.; SANDERS, W. E. Jr.  $\beta$ -lactam resistance in gram -negative bacteria: global trends and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, p. 824-839, 1992.

SANDERS, W. E. JR.; SANDERS, C. C.. *Enterobacter* spp: Pathogens poised to flourish at the turn of the century. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 220-241, 1997.

SCHWABER, M. J. *et al.* Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in non-*Escherichia coli* and non-*Klebsiella* spp. of *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 294-298, 2004.

SHAH, A.A. *et al.* Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram -negative bacilli producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 409-421, 2004.

SHANNON K., PHILLIPS I. The effects on  $\beta$ -lactam susceptibility of phenotypic induction and genotypic desrepression of  $\beta$ -lactamase synthesis. **Journal Antimicrobial Chemother**, v. 18, p. 15-22, 1986.

SHERABI, A. A. *et al.* High incidence of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to extended-spectrum  $\beta$ -lactam drugs in intensive care units. **Diagnostics Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, p. 53-56, 2000.

SILVA, J. *et al.* Outbreak of infection with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p. 3193-3196, 2001.

SINGH, N. *et al.* Risk of resistant infections with *Enterobacteriaceae* in hospitalized neonates. **Pediatric Infectious Diseases**, v. 21, p. 1029-1033, 2002.

SIROT, J. Detection of extended-spectrum plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases by disk diffusion. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 2, p. 35-39, 1996.

SPRATT, B. G.; CROMIE, K. D. Penicillin binding proteins of Gram -negative bacteria. **Review Infect Diseases**, v. 10, p. 699-771, 1988.

STEWART, C. D. *et al.* Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended spectrum  $\beta$ -lactamase detection methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2864-2872, 2001.

SU, L. H. *et al.* Extended epidemic of nosocomial urinary tract infection caused by *Serratia marcescens*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4726-4732, 2003.

SWENSON, J. M.; HINDLER, J. A.; PETERSON, L. R. Special tests for antibacterial resistance. In: MURRAY, R. P. *et al.* **Manual of Clinical Microbiology**. 6.ed. Washington, American Society for Microbiology, 1995. p. 1356-1367.

SZABÓ, D. *et al.* Molecular epidemiology of a cluster of cases due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in the premature intensive care unit of a Hungarian hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 12, p. 4167-4169, 1999.

TAKAHASHI, H. *et al.* Nosocomial *Serratia marcescens* outbreak in Osaka, Japan, from 1999 to 2000. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v. 25, p. 156-161, 2004.

TENOVER, F.C. *et al.* Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: survey of laboratories in Connecticut. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 4065-4070, 1999.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

THOMSON, K. S. Controversies about extended-spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamases. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 333-336, 2001.

THOMSON, K. S.; SANDERS, C. C. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 1877-1882, 1992.

TRAUTNER, B. W.; DAUROWCH, R. O. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. **American Journal Infection Control**, v. 32, p. 177-183, 2004.

TZOUVELEKIS, L. S. *et al.* Sporadic emergence of *Klebsiella pneumoniae* strains resistant to cefepime and ceftazidime in Greek Hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 266-268, 1998.

TZOUVELEKIS, L. S.; BONOMO R. A. shv-TYPE BETA-LACTAMASES. **Current Pharmacy Diseases**, v. 5, p. 847-864, 1999

VARELA, C. *et al.* Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in group-1  $\beta$ -lactamases-producing isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, p. 278-282, 2001.

WARREN, J. R. *et al.* Outbreak of nosocomial infections due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing strains of enteric group 137, a new member of the family *Enterobacteriaceae* closely related to *Citrobacter farmeri* and *Citrobacter malonaticus*. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 38, p. 3946-3952, 2000.

WIENER, J. *et al.* Multiple antibiotic-resistance *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. **JAMA**, v. 281, p. 517-523, 1999.

WINOKUR, P. L. *et al.* Russian *Klebsiella pneumoniae* isolates that express extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, p.103-108, 2000.

WU, T. *et al.* Dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in pediatric intensive care units. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4836-4838, 2003.

YAN, J. J. *et al.* Complexity of *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant to both cephamycins and extended-spectrum cephalosporins at a teaching hospital in Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5337-5340, 2004.

ZALI, F. H. *et al.* Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV  $\beta$ -lactamases using polimerase chain reaction single strand conformational polymorfism (PCR-SSCP). **Journal Antimicrobial Chemother**, v. 37, p. 797-802, 1996.

ZAR, H. J.; COTTON, M. F. Nosocomial pneumonia in pediatric patients: practical problems and rational solutions. **Pediatric Drugs**, v. 4, p. 73-83, 2002.