

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**PREVALÊNCIA DAS FAMÍLIAS TEM, SHV E CTX-M
DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO EM
ESCHERICHIA COLI E *KLEBSIELLA* SPP. NO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA, RIO
GRANDE DO SUL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caio Fernando de Oliveira

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

O482p Oliveira, Caio Fernando de
Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de β -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. no Hospital Universitário de Santa Maria, Rio Grande do Sul / Caio Fernando de Oliveira – Santa Maria: [S.n.], 2009.
68 fls.

Dissertação (Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas) – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 2009.

1. β -lactamases de espectro estendido 2. *Escherichia coli* 3. *Klebsiella* spp. 4. Reação em cadeia da polimerase I. Título

CDU 615

**PREVALÊNCIA DAS FAMÍLIAS TEM, SHV E CTX-M DE β -
LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO EM
ESCHERICHIA COLI E *KLEBSIELLA SPP.* NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL**

por

Caio Fernando de Oliveira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a aquisição do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PREVALÊNCIA DAS FAMÍLIAS TEM, SHV E CTX-M DE β -
LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO EM *ESCHERICHIA COLI*
E *KLEBSIELLA* SPP. NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA
MARIA, RIO GRANDE DO SUL**

elaborada por
Caio Fernando de Oliveira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sydney Hartz Alves, Dr.
(Presidente/Orientador)

Andréia Rosane de Moura Valim, Dr^a. (UNISC)

Agueda Palmira Castagna de Vargas, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 08 de outubro de 2009.

*À minha mãe, porto seguro nas horas difíceis,
base de sustentação para seguir adiante.*

Agradecimentos

À minha família, pai, mãe, irmãos, avós, Di, Nuno e Uschi por serem parte fundamental em minha vida e tornarem menos árduas as dificuldades do dia-a-dia.

Ao professor Sydney Hartz Alves, por lembrar e confiar em mim para a realização deste trabalho; pela orientação, exemplo, conselhos e ensinamentos.

Ao professor Jorge André Horta, pela idéia e desenvolvimento inicial deste projeto; pela ajuda e oportunidade.

Ao professor Alexandre Rieger, por disponibilizar o laboratório de Biotecnologia e Genética, fornecendo suporte tecnológico para a realização deste trabalho; pela experiência e conhecimento repassados; pela amizade e dedicação.

Aos colegas de laboratório e funcionários da Unisc Luciane Gobbi, Aline Teichmann, Paulo A. Leusin, João R. W. Fernandes, Carolina e Antonieta, por contribuírem de diversas maneiras na realização deste trabalho; em especial à Clara Forrer Charlier, pelo conhecimento em biologia molecular a mim repassado.

Aos colegas do laboratório de microbiologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFSM, em especial à professora Rosmari Hörner e à colega Vanessa de Oliveira Domingues pela amizade, carinho e auxílio técnico.

À professora Dr^a. Andréia Rosane de Moura Valim pelo carinho, atenção e profissionalismo.

À professora Dr^a. Agueda Palmira Castagna de Vargas pela disponibilidade, profissionalismo, correções e sugestões.

À coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM, pela oportunidade, ensinamentos e acolhimento.

Ao secretário Paulo do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM, pela amizade, dedicação e orientação.

À Adenilde Salla e ao Setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria, pela seleção e armazenamento dos microrganismos utilizados.

À Claudia Mugnaiolli e ao professor Gian Maria Rossolini da Seção de Microbiologia do Departamento de Biologia Molecular da Universidade de Siena pelo envio de microrganismos controle.

À professora Anaelena Bragança de Moraes, pelos ensinamentos em estatística.

Aos meus colegas de curso, em especial Viviane Souza, Vilmar C. Banderó Filho, Magda, Leticia E. Mayer, Marciele R. Pilau, Renata Pereira, Patrícia B. Cavalheiro e Tarcielli Venturini, pelo companheirismo e amizade.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

PREVALÊNCIA DAS FAMÍLIAS TEM, SHV E CTX-M DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO EM *ESCHERICHIA COLI* E *KLEBSIELLA SPP.* NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL

Autor: Caio Fernando de Oliveira

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 08 de outubro de 2009.

As β -lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) são enzimas bacterianas mediadas por plasmídeos que conferem resistência à maioria dos antibióticos β -lactâmicos. Estas enzimas estão amplamente disseminadas em microrganismos nos ambientes hospitalares do mundo. Este estudo estimou a distribuição e prevalência das principais famílias de ESBLs entre amostras de *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Rio Grande do Sul. Durante um período de 14 meses, 90 microrganismos foram selecionados como prováveis produtores de ESBLs de acordo com os critérios estabelecidos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Os microrganismos isolados foram submetidos a testes fenotípicos confirmatórios para a presença de ESBL. As amostras que apresentaram resultado negativo nestes testes tiveram sua susceptibilidade testada frente à cefoxitina. Os tipos de ESBLs presentes em cada microrganismo foram determinados pela pesquisa dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Empregando-se o método do disco combinado, a presença de ESBLs foi confirmada em 55 (61,1%) amostras; quando o método do duplo disco foi utilizado, 57 (63,3%) amostras foram confirmadas. No teste de susceptibilidade à cefoxitina, 16 das 39 amostras testadas apresentaram resistência a este substrato. Com base na PCR, 74 (82,2%) amostras possuíam genes para a família TEM de ESBLs, 61 (67,8%) para a família SHV e 19 (21,1%) para a família CTX-M. Apenas um isolado de *Escherichia coli* demonstrou possuir genes para a família CTX-M de ESBLs. A distribuição de ESBLs das famílias TEM, SHV e CTX-M no HUSM apresentou semelhanças e diferenças em comparação com ESBLs de outros ambientes hospitalares.

Palavras-chaves: β -lactamases de espectro estendido; *Escherichia coli*; *Klebsiella spp.*; *bla*_{TEM}; *bla*_{SHV}; *bla*_{CTX-M}.

ABSTRACT

Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) are plasmid-mediated bacterial enzymes that confer resistance for most β -lactams antibiotics. These enzymes are widespread in microorganisms in hospital settings worldwide. This study estimated the distribution and prevalence of the main ESBLs families among samples of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in the university hospital of Santa Maria (HUSM), Rio Grande do Sul. During a period of 14 months 90 microorganisms were selected as probable ESBL producers according to the recommendations of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The isolated microorganisms were submitted to phenotypic confirmatory tests for the presence of ESBL. Samples that showed negative results were tested against their susceptibility to ceftazidime. The ESBLs types found in each organism were determined by the research of the genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} by polymerase chain reaction (PCR). Fifty-five (61.1%) samples were confirmed as ESBL positive by the combined disc method and fifty-seven (63.3%) by the double disc method. In the ceftazidime susceptibility test 16 of the 39 samples presented resistance to this agent. Based on PCR, 74 (82,2%) samples harbored TEM-type ESBL gens, 61 (67,8%) SHV-type and 19 (21,1%) CTX-M-type. Only one *Escherichia coli* isolate appeared harboring genes for the CTX-M family of ESBLs. The distribution of TEM, SHV and CTX-M ESBL families from HUSM presented some similarities and differences compared with ESBLs of other hospital settings.

Key-words: extended spectrum β -lactamases; *Escherichia coli*; *Klebsiella* spp.; *bla*_{TEM}; *bla*_{SHV}; *bla*_{CTX-M}.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC** – American Type Culture Collection
- BHI** – Brain Heart Infusion
- CDC** – Center for Disease Control
- CIM** – Concentração Inibitória Mínima
- CLSI** – Clinical and Laboratory Standards Institute
- ColS** – Colaboradores
- CTIs** – Centros de Tratamento Intensivo
- E. coli*** – *Escherichia coli*
- EDTA** – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
- ESBLs** – β -Lactamases de Espectro Estendido
- FDA** – Food and Drug Administration
- Gli** – Glicina
- Glu** – Glutamato
- HUSM** – Hospital Universitário de Santa Maria
- IRT** – TEM β -lactamases resistentes aos inibidores
- K. oxytoca*** – *Klebsiella oxytoca*
- K. pneumoniae*** – *Klebsiella pneumoniae*
- LAC** – Laboratório de Análises Clínicas do HUSM
- Lis** – Lisina
- MRSA** – *Staphylococcus aureus* resistente à metilcolina
- n** – Número total
- NNIS** – National Nosocomial Infections Surveillance
- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase
- PRP** – Pneumococo Resistente a Penicilina
- Ser** – Serina
- SUS** – Sistema Único de Saúde
- Tampão TE** – Tampão Tris/EDTA
- VRE** – *Enterococcus* Resistente a Vancomicina

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	7
SUMÁRIO	8
1 – INTRODUÇÃO	10
2 – REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 – β-lactamases de espectro estendido	14
2.1.1 – Histórico.....	14
2.1.2 – Definição de ESBL.....	15
2.1.3 – Classificação das ESBLs.....	16
2.1.4 – Susceptibilidade e características bioquímicas.....	18
2.1.5 – Plasmídeos.....	18
2.1.6 – Tipos de ESBLs.....	19
2.1.6.1 – ESBLs tipo TEM.....	19
2.1.6.2 – ESBLs tipo SHV.....	21
2.1.6.3 – ESBLs tipo CTX-M.....	23
2.1.7 – Atividade hidrolítica.....	24
2.1.8 – Epidemiologia.....	25
2.1.8.1 – Distribuição mundial.....	25
2.1.8.1.1 – Europa.....	25
2.1.8.1.2 – América do Norte.....	26
2.1.8.1.3 – América Latina.....	27
2.1.8.1.4 – Ásia, África e Austrália.....	27
2.1.8.2 – Epidemiologia molecular das infecções hospitalares.....	28
2.1.8.3 – Fatores de risco.....	29

2.1.9 – Detecção de ESBLs.....	30
2.1.9.1 – Triagem inicial.....	30
2.1.9.2 – Testes fenotípicos confirmatórios para a produção de ESBLs.....	31
2.1.9.2.1 – Método sinérgico do duplo disco ou disco aproximação.....	31
2.1.9.2.2 – Método do disco combinado.....	32
2.1.9.3 – Teste de Susceptibilidade à cefoxitina.....	33
2.1.9.4 – Controle de Qualidade para testes fenotípicos.....	33
2.1.9.5 – Significado e importância da detecção fenotípica de ESBLs.....	33
2.1.9.6 – Problemas associados com a detecção de ESBLs.....	34
2.1.9.7 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção de ESBLs.....	35
2.1.10 – Opções terapêuticas.....	36
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 – Seleção dos microrganismos.....	38
3.2 – Armazenamento dos microrganismos.....	38
3.3 – Testes fenotípicos.....	39
3.3.1 – Método sinérgico do duplo disco.....	39
3.3.2 – Método do disco combinado.....	39
3.3.3 – Teste de susceptibilidade à cefoxitina.....	41
3.4 – Extração de DNA.....	41
3.5 – Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	42
3.5.1 – Preparação dos iniciadores (“primers”).....	42
3.5.2 – Preparação da reação de PCR.....	43
3.5.3 – Amplificação do DNA.....	43
3.6 – Eletroforese em gel de agarose.....	43
3.7 – Visualização do DNA amplificado.....	44
3.8 – Microrganismos utilizados no controle de qualidade.....	44
3.9 – Análises estatísticas.....	45
3.10 – Aspectos éticos.....	45
4 – RESULTADOS.....	46
5 – DISCUSSÃO.....	50
6 – CONCLUSÕES.....	56
7 – REFERÊNCIAS.....	57
8 – ANEXO.....	69
8.1- Artigo aceito pela Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical..	69

1 – INTRODUÇÃO

Atualmente um dos mais graves problemas que atingem os serviços de saúde em todo o mundo é a emergência de microrganismos resistentes a diversos antimicrobianos. A falta de adesão dos profissionais da saúde às medidas recomendadas para prevenção da transmissão de microrganismos e o uso inadequado de antimicrobianos estão entre as principais causas deste problema (ANVISA, 2008).

A proliferação e disseminação de microrganismos resistentes ocorrem principalmente nos ambientes hospitalares e preocupam as instituições de saúde. As infecções hospitalares causam deficiências funcionais e “stress” emocional nos pacientes e podem, em alguns casos, resultar em condições de incapacidade que reduzem a qualidade de vida (WHO, 2002). Além disso, as infecções hospitalares contribuem para períodos de internação prolongados, maiores índices de morbidade e mortalidade e significativo aumento nos custos do tratamento (PITTET, 1994).

Nos países desenvolvidos, a prevalência de pacientes hospitalizados que adquirem uma infecção hospitalar é em média 8,7%. O Brasil carece de dados mais consistentes e atuais a respeito da prevalência das infecções de origem hospitalar (WHO, 2002; OPAS, 2000).

A medida mais eficaz para pacientes com infecções hospitalares é a administração de antimicrobianos. Entretanto, a escolha da terapia adequada é tarefa criteriosa das mais difíceis atualmente. Através da seleção e troca de elementos genéticos de resistência, os antimicrobianos podem promover a emergência de bactérias multirresistentes; microrganismos da microbiota normal susceptíveis ao antimicrobiano administrado são suprimidos, enquanto os resistentes persistem e podem se tornar endêmicos nos hospitais (WHO, 2002).

No final do século XX, em um período de 20 anos (1983 a 2002), a aprovação pelo FDA (United States Food and Drug Administration) de novos antimicrobianos foi reduzida em 56% (SPELBERG, 2004). Além disso, a grande maioria dos novos antimicrobianos aprovados desde 1999 pelo FDA tem atividade aumentada principalmente contra cocos Gram-positivos como *Staphylococcus aureus* resistente

à metilina (MRSA), pneumococo resistente à penicilina (PRP) e enterococo resistente à vancomicina (VRE) (NORRBY, 2005).

Nas duas últimas décadas, nos países em desenvolvimento, o aumento da resistência microbiana ocorreu principalmente entre os bacilos Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp.). Esses microrganismos desenvolveram resistência inclusive aos antimicrobianos de amplo espectro mais comumente utilizados como quinolonas, carbapenens e cefalosporinas de terceira geração (CDC, 2009). Em um relatório anual publicado pelo “National Nosocomial Infections Surveillance System” americano em 2004, 20,6% dos isolados de *Klebsiella* spp. eram resistentes a cefalosporinas de terceira geração, significando um aumento de 47% em relação a um período anterior compreendendo cinco anos (NNIS, 2004).

O principal mecanismo de resistência dos bacilos Gram-negativos contra os antimicrobianos β -lactâmicos é a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) (AGRAWAL, 2008). Estas enzimas hidrolisam o anel β -lactâmico destes antimicrobianos, inativando-os e conferindo resistência aos microrganismos que as produzem (PHILIPPON, 1989).

A resistência dos microrganismos produtores de ESBLs a uma grande variedade de antimicrobianos tornou sua disseminação um sério problema de saúde mundial, que tem complicado as estratégias de tratamento de um crescente número de pacientes. Neste contexto, a pesquisa de rotina de microrganismos produtores de ESBLs é de grande importância. Entretanto, a implementação desta pesquisa aos testes de rotina dos laboratórios de microbiologia é relativamente baixa (PFALLER, 2006).

Em escala mundial, a incidência de microrganismos produtores de ESBLs é sub-estimada. Além da dificuldade de determinação, principalmente por diferenças entre os métodos de detecção e interpretação utilizados em cada um dos países e instituições envolvidos, existem também diferenças em relação à notificação do aparecimento de tal fenômeno (STEWART, 2000). Contudo, devido ao fato de que microrganismos produtores de ESBLs frequentemente se originam em surtos localizados, sua prevalência pode variar de um local para outro e mesmo ao longo do tempo em um mesmo local (PFALLER, 2006; STEWARD, 2001). Como resultado, estimativas locais e regionais são provavelmente mais úteis para as tomadas de

decisões clínicas e controle de infecção do que as avaliações mais globais (FANG, 2008; PFALLER, 2006).

A principal metodologia utilizada para a detecção de ESBLs pelos laboratórios de microbiologia é baseada em métodos fenotípicos. Entretanto, estes testes são passíveis de interferência por outros mecanismos de resistência e não são capazes de diferenciar as ESBLs entre as diversas famílias existentes (PATERSON, 1999). Tal diferenciação é importante, pois cada tipo de ESBL possui características diferentes no que diz respeito à interação com antimicrobianos específicos. A necessidade de melhoramento na detecção de ESBLs em isolados clínicos é evidente (TENOVER, 2003). Atualmente, muitos testes moleculares estão sendo utilizados, principalmente nos centros de pesquisa, no intuito de melhorar a detecção e monitoramento das ESBLs (PATERSON, 2005).

O principal objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de genes codificadores para as famílias TEM, SHV e CTX-M de ESBLs em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). Também são objetivos deste trabalho:

- Correlacionar os resultados de um método molecular (PCR) com os resultados de dois métodos fenotípicos (duplo disco e disco combinado) utilizados na detecção de ESBLs.
- Avaliar a relação dos testes fenotípicos de triagem para ESBL com os testes confirmatórios.
- Comparar os resultados dos dois métodos fenotípicos utilizados na detecção de ESBLs: duplo disco e disco combinado.
- Determinar, entre ceftazidima, cefotaxima e cefpodoxima, qual o melhor substrato para a detecção de ESBLs nos testes fenotípicos confirmatórios.
- Analisar a relação entre a resistência à cefoxitina e a dificuldade de detecção de ESBLs pelos métodos fenotípicos utilizados.

- Determinar a espécie bacteriana mais prevalente como produtora de ESBL entre as amostras estudadas.
- Determinar a família de ESBL prevalente entre as amostras estudadas.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – β -lactamases de espectro estendido (ESBLs)

2.1.1 – Histórico

A emergência da resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos começou antes mesmo do primeiro β -lactâmico, a penicilina, ser desenvolvida. A primeira penicilinase foi identificada em *Escherichia coli* antes da liberação da penicilina para uso na prática médica (ABRAHAM, 1940 apud BRADFORD, 2001). Esta enzima rapidamente se disseminou e foi identificada em vários outros isolados clínicos de *S. aureus* bem como em outras espécies de estafilococos (BUSH, 1989; PHILIPPON, 1989).

A introdução das cefalosporinas e das penicilinas de amplo espectro na segunda metade da década de 60 proveu os substratos que tornaram possível a detecção de inúmeras novas β -lactamases. Assim, embora a primeira β -lactamase originalmente descrita fosse efetiva apenas na hidrólise de penicilinas, muitas outras enzimas relacionadas (com diferentes tipos de substratos) foram sendo descobertas (BUSH, 1989). Entre os anos 70 e 80, além do surgimento das novas penicilinas e cefalosporinas vieram as cefamicinas, carbapenens e monobactâmicos e, junto com eles, uma grande quantidade de novas β -lactamases (BUSH, 1986).

Nas últimas duas décadas do século XX, novos antibióticos β -lactâmicos foram especialmente desenhados para serem resistentes à ação hidrolítica das β -lactamases (BRADFORD, 2001). As cefalosporinas de terceira geração foram desenvolvidas em resposta ao aumento da prevalência de β -lactamases em certos organismos (por exemplo, β -lactamases dos tipos TEM-1 e SHV-1 hidrolizadoras de ampicilina em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) e a disseminação dessas enzimas em novos microrganismos (por exemplo, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*). As cefalosporinas de terceira geração (amplo espectro) não apenas eram efetivas contra a maioria dos microrganismos produtores de β -lactamases, como também apresentavam menos efeitos nefrotóxicos do que os aminoglicosídeos e polimixinas (PATERSON, 2005). Contudo, a cada nova classe que era usada para tratar pacientes, novas β -lactamases emergiam apresentando resistência a essa classe de antibiótico. Presumivelmente, a pressão seletiva do uso

excessivo dos novos antibióticos tenha selecionado novas variantes de β -lactamases (BRADFORD, 2001; BUSH, 1989).

O primeiro relato de β -lactamases capazes de hidrolisar as cefalosporinas de amplo espectro foi publicado em 1983. O gene codificador dessas β -lactamases apresentou uma mutação de um único nucleotídeo em comparação com o gene codificador da enzima SHV-1 (KNOTHE, 1983). Devido ao aumento no seu espectro de atividade, especialmente contra cefalosporinas de terceira geração, essas enzimas foram chamadas de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) (BRADFORD, 2001). A primeira dessas enzimas capaz de hidrolisar os novos β -lactâmicos, a SHV-2, foi encontrada em uma única amostra de *Klebsiella ozaenae* isolada na Alemanha em 1985 (KLIEBE, 1985).

Essas novas β -lactamases bacterianas presentes em bacilos entéricos comuns demonstraram propriedades hidrolíticas únicas. Mutações pontuais nos genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* que resultaram em simples troca de aminoácidos (Glu238→Ser, Glu240→Lis, Arg164→Ser, Arg164→His, Asp179→Asn e Glu(Asp)104→Lis) formaram as bases deste notável fenótipo de resistência (JACOBY, 1991a; PHILIPPON, 1989).

2.1.2 – Definição de ESBL

Não há um consenso na definição precisa de ESBL. Uma definição comum utilizada é que as ESBLs são β -lactamases capazes de conferir resistência bacteriana às penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração e ao aztreonam (mas não às cefamicinas e carbapenens) através da hidrólise desses antibióticos e que são inibidas por inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico (PATERSON, 2005).

2.1.3 – Classificação das ESBLs

As ESBLs estão inseridas em dois principais esquemas de classificação das β -lactamases: a classificação molecular de AMBLER (1991) e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH, 1995). O esquema de Ambler divide as β -lactamases em quatro classes maiores (A a D). A base desse esquema de classificação reside sobre a homologia protéica (similaridade de aminoácidos) e não nas características fenotípicas. A classificação de Bush-Jacoby-Medeiros usa as propriedades funcionais da enzima mais a estrutura molecular e a seqüência de nucleotídeos dos genes para classificar as β -lactamases em grupos funcionais (BRADFORD, 2001; BUSH, 1995). Esta classificação é de maior relevância imediata aos médicos e microbiologistas porque considera os inibidores de β -lactamases e os substratos β -lactâmicos clinicamente relevantes (PATERSON, 2005) (Tabela 1).

A maioria das ESBLs contém uma serina no sítio ativo e por isso pertence à classe molecular A de Ambler (AMBLER, 1980 apud BRADFORD, 2001). As β -lactamases desta classe incluem as enzimas TEM-1, SHV-1 e a penicilinase encontrada em *S. aureus*. Este esquema molecular de classificação ainda é usado para caracterizar β -lactamases, contudo, não diferencia suficientemente os muitos tipos de enzimas da classe A (BRADFORD, 2001).

Na classificação de Bush-Jacoby-Medeiros, as ESBLs estão classificadas no grupo 2be. A designação 2be indica que estas enzimas são derivadas das β -lactamases do grupo 2b (TEM-1, TEM-2 e SHV-1); o “e” de 2be indica que estas enzimas têm um espectro estendido (BUSH, 1995).

TEM-1 é a β -lactamase mediada por plasmídeo mais comum dos bacilos Gram-negativos entéricos resistentes à ampicilina (por exemplo, *Escherichia coli*), enquanto SHV-1 é produzida pela vasta maioria de *Klebsiella pneumoniae* (LIVERMORE, 1995). As ESBLs derivadas das β -lactamases TEM-1, TEM-2 e SHV-1 diferem de suas progenitoras por no mínimo um aminoácido. Isto resulta em uma profunda mudança na atividade enzimática, tanto que elas passam a hidrolisar, a partir disso, as cefalosporinas de terceira geração e o aztreonam (PATERSON, 2005).

Tabela 1 – Classificação das β -lactamases

Grupo de Bush-Jacoby-Medeiros	Classe molecular de Ambler	Substratos preferenciais	Inibição pelo ácido clavulânico	Principais representantes
1	C	Cefalosporinas	-	Enzimas AmpC de BGN*
2a	A	Penicilinas	+	Penicilinases de estafilococos
2b	A	Penicilinas e cefalosporinas	+	TEM-1, TEM-2 e SHV-1
2be (ESBLs)	A	Penicilinas, cefalosporinas de espectro estendido e monobactâmicos	+	TEM-3 a TEM-160, SHV-2 a SHV-101 e <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	A	Penicilinas	+/-	TEM resistentes aos inibidores
2c	A	Penicilinas e carbenicilina	+	Hidrolisam carbenicilina
2d	D	Penicilinas e cloxacilina	+/-	OXA-1 a OXA-11, PSE-2
2e	A	Cefalosporinas	+	Cefalosporinases inibidas pelo ácido clavulânico
2f	A	Penicilinas, cefalosporinas e carbapenems	+	Carbapenemases inibidas pelo ácido clavulânico
3	B	Maioria dos β -lactâmicos (incluindo carbapenens)	-	Carbapenemases dependentes de zinco (metalo- β -lactamases)
4	Não determinada	Penicilinas	-	Penicilinase de <i>Burkholderia cepacia</i>

Fonte: adaptado de PEREZ (2007) e BUSH (1995).

* BGN: bacilos Gram-negativos.

Ainda na classificação de Bush, em comum com as ESBLs existem outros grupos de β -lactamases (2d, 2e e 2f) que hidrolisam cefalosporinas e são inibidas pelo ácido clavulânico. O grupo 2e carece de boa atividade hidrolítica contra penicilinas e o grupo 2f é fracamente inibido pelo ácido clavulânico. Entretanto, tem sido observada uma extensão do espectro das β -lactamases do grupo 2d (tipo OXA)

em direção às cefalosporinas de espectro estendido e muitos autores referem-se a algumas dessas enzimas como ESBLs (MEDEIROS, 1997).

2.1.4 – Susceptibilidade e características bioquímicas

As substituições na sequência de aminoácidos das ESBLs alteram as configurações e propriedades do seu sítio ativo e, conseqüentemente, o perfil dos substratos em que a enzima atuará. As substituições mais importantes são as mutações que conferem amplo espectro a estas enzimas, produzindo espaço suficiente no seu sítio ativo para a interação com os antibióticos β -lactâmicos de amplo espectro portadores de grandes cadeias oxi-amino. Como resultado, esta modificação faz com que estas enzimas sejam capazes de hidrolisar antibióticos como: ceftazidima, cefotaxima, cefuroxima e aztreonam (KNOX, 1995). Entretanto, a expansão do sítio ativo, que permite a atividade aumentada contra cefalosporinas de espectro-estendido, pode também resultar no aumento da susceptibilidade das ESBLs aos inibidores de β -lactamases (JACOBY, 1991a).

As ESBLs não são ativas contra cefamicinas e a maioria das amostras que expressam ESBLs são susceptíveis à cefoxitina e cefotetan. Contudo, amostras produtoras de ESBLs podem se tornar resistentes às cefamicinas devido à perda de uma porina na membrana externa (MARTINÉZ-MARTINÉZ, 1996).

2.1.5 – Plasmídios

Os plasmídios responsáveis pela transferência e produção de ESBLs tendem a ser longos (80 kb ou mais) e carregam resistência a vários agentes, uma importante limitação no delineamento de alternativas de tratamento (JACOBY, 1991b). Estes plasmídeos de multirresistência são prontamente transmissíveis e podem carregar resistência aos aminoglicosídeos como amicacina, gentamicina e tobramicina (PHILIPPON, 1989) além de sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina (JACOBY, 1991a). Esta usual transmissibilidade dos plasmídeos permite que a

resistência se dissemine rapidamente a outros patógenos, tanto que enzimas de espectro estendido têm sido encontradas (além de *E. coli* e *Klebsiella* spp.) em *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Salmonella* spp. e *Serratia marcescens* (JACOBY, 1991b).

2.1.6 – Tipos de ESBLs

A maioria das ESBLs é derivada das β -lactamases TEM e SHV (BUSH, 1995; JACOBY, 1991a). Entre as ESBLs não-TEM e não-SHV, as β -lactamases do tipo CTX-M são as mais prevalentes (PEREZ, 2007).

2.1.6.1 – ESBLs tipo TEM

As ESBLs do tipo TEM são derivadas das enzimas TEM-1 e TEM-2. TEM-1 foi pela primeira vez relatada em 1965 em uma amostra de *Escherichia coli* de um paciente grego chamado Temoniera (DATTA, 1965 apud BRADFORD, 2005).

TEM-1 é a β -lactamase mais comumente encontrada em bactérias Gram-negativas. Mais de 90% da resistência à ampicilina em *E. coli* é devida à produção de TEM-1 (LIVERMORE, 1995). TEM-1 hidrolisa ampicilina num índice maior que carbenicilina, oxacilina ou cefalotina, mas tem atividade insignificante contra cefalosporinas de espectro estendido. TEM-2 tem o mesmo perfil hidrolítico que TEM-1; ambas são inibidas pelo ácido clavulânico. TEM-13 também tem um perfil hidrolítico similar a TEM-1 e TEM-2, portanto estas três enzimas não são consideradas ESBLs (JACOBY, 1991a).

Existem algumas discordâncias a respeito de quando e qual foi a primeira ESBL do tipo TEM relatada na década de 80. O importante é que ela provavelmente surgiu a partir de mutações em TEM-1 em resposta à pressão seletiva induzida por cefalosporinas de espectro estendido. A partir daí, mais de 100 β -lactamases do tipo TEM têm sido descritas, a maioria delas são ESBLs (PATERSON, 2005).

Várias enzimas derivadas de TEM com afinidade reduzida aos inibidores de β -lactamases também têm sido encontradas. Com muito poucas exceções, estas enzimas, que são menos susceptíveis aos efeitos dos inibidores de β -lactamases, têm atividade hidrolítica insignificante contra as cefalosporinas de espectro estendido e não são consideradas ESBLs. Estas enzimas foram revisadas em 1999 e são chamadas β -lactamases resistentes aos inibidores ou IRT (inhibitor-resistant TEM β -lactamases) (CHAIBI, 1999).

Embora as β -lactamases do tipo TEM sejam mais frequentemente encontradas em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, elas também são encontradas em outras espécies de bacilos Gram-negativos. ESBLs do tipo TEM têm sido relatadas em espécies da família *Enterobacteriaceae* como *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. e *Salmonella* spp. (LUZZARO, 2006; TASLI, 2005; PERILLI, 2002; SPANU, 2002).

2.1.6.2 – ESBLs tipo SHV

A β -lactamase SHV-1 é mais comumente encontrada em *K. pneumoniae* e é responsável por mais de 20% da resistência à ampicilina mediada por plasmídios nesta espécie (TZOUVELEKIS, 1999a). Em muitas amostras de *K. pneumoniae*, *bla*_{SHV-1} ou outro gene relacionado encontra-se integrado ao cromossomo bacteriano (LIVERMORE, 1995). Embora tenha sido hipotetizado que o gene codificador para SHV-1 possa existir como parte de um elemento transferível, isto nunca foi provado (JACOBY, 1991a).

Diferentemente das β -lactamases do tipo TEM, existem relativamente poucas enzimas derivadas de SHV-1. Além disso, as mudanças que vem sendo observadas em *bla*_{SHV} para dar origem as variantes SHV ocorrem também em menos posições diferentes. A maioria das variantes de SHV que possuem um fenótipo de ESBL é caracterizada pela substituição de uma serina por uma glicina na posição 238. Algumas variantes relacionadas à SHV-5 também têm uma substituição de lisina por glutamato na posição 240. É interessante notar que estas duas substituições (Gli238Ser e Glu240Lis) são as mesmas, porém no sentido inverso, daquelas vistas nas ESBLs do tipo TEM. O resíduo de serina na posição 238 é crítico para a

A maioria das enzimas derivadas de SHV-1 possui o fenótipo de ESBLs. As ESBLs do tipo SHV são encontradas principalmente em amostras de *K. pneumoniae*, contudo, estas enzimas também têm sido encontradas em uma grande variedade de espécies da família *Enterobacteriaceae* (LUZZARO, 2006; TASLI, 2005; PERILLI, 2002; SPANU, 2002).

2.1.6.3 – ESBLs tipo CTX-M

No final do século XX, surgiu uma nova família de ESBLs mediadas por plasmídios chamada CTX-M. Inicialmente, ela foi principalmente encontrada em amostras de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium e *Escherichia coli* (BRADFORD, 1997; BONNET, 2000). Posteriormente esta enzima também foi descrita em outras espécies da família *Enterobacteriaceae*, mas sua grande prevalência tem se confirmado mesmo em amostras de *E. coli* (LIVERMORE, 2007; PITOUT, 2007; MUGNAIOLI, 2006; BONNET, 2004; PAGANI, 2003). O nome CTX se refere à potente atividade hidrolítica dessas β -lactamases contra cefotaxima (POIREL, 2002).

A família CTX-M é formada por cerca de 60 enzimas, que são divididas em cinco grupos, de acordo com a similaridade das sequências de aminoácidos: grupo CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (BONNET, 2004).

As β -lactamases do tipo CTX-M parecem estar intimamente relacionadas às β -lactamases de *Kluyvera* spp. (HUMENIUK, 2002; POIREL, 2002; OLIVER, 2001). O gene de β -lactamase cromossomal de *Kluyvera georgiana* codifica uma ESBL chamada KLUG-1, que compartilha 99% de sua sequência de aminoácidos com a ESBL CTX-M-8 (POIREL, 2002). Existe também uma grande similaridade entre a enzima cromossomal AmpC de *Kluyvera ascorbata* (designada Klu-1 e Klu-2) e as enzimas do tipo CTX-M, sugerindo que estas últimas provavelmente se originaram a partir destas espécies (HUMENIUK, 2002). Em contrapartida, as enzimas CTX-M não são molecularmente muito relacionadas com as β -lactamases TEM ou SHV, com as quais demonstram apenas 40% de homologia (PATERSON, 2005).

Com relação às posições dos aminoácidos importantes para a atividade hidrolítica, o resíduo de serina na posição 237, que está presente em todas as

enzimas CTX-M, desempenha importante papel na atividade de espectro estendido das β -lactamases do tipo CTX-M (TZOUVELEKIS, 2000).

A relação entre o consumo de antibióticos e a ocorrência de β -lactamases do tipo CTX-M ainda não foi estudada. Entretanto, a prevalência destas enzimas em agentes de diarreia adquirida na comunidade levanta especulações de que algumas cefalosporinas disponíveis fora do ambiente hospitalar como ceftriaxona possam ser importantes (GNIADKOWSKI, 1998).

Desde seu surgimento, o número de ESBLs do tipo CTX-M se expandiu rapidamente. Neste início de século XXI, estas enzimas já foram encontradas em diversos países, sendo consideradas, em alguns estudos, provenientes de áreas onde surtos têm ocorrido, como as ESBLs mais freqüentemente encontradas atualmente (GALAS, 2008; LIVERMORE, 2007; PITOUT, 2007; MUGNAIOLI, 2006; PAGANI, 2003; WANG, 2003; COQUE, 2002; RADICE, 2002; KARIUKI, 2001).

2.1.7 – Atividade hidrolítica

As β -lactamases são enzimas responsáveis por muitas falhas na terapia antimicrobiana devido à hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos tornando-os agentes inertes e não-efetivos (BUSH, 1989).

Estudos cinéticos têm demonstrado que as β -lactamases do tipo CTX-M hidrolisam cefalotina ou cefaloridina melhor do que benzilpenicilina e preferencialmente, hidrolisam cefotaxima com relação à ceftazidima. Além disso, outra característica dessas enzimas é que elas são mais eficientemente inibidas por tazobactam do que por sulbactam ou ácido clavulânico (TZOUVELEKIS, 2000).

2.1.8 – Epidemiologia

2.1.8.1 – Distribuição mundial

Descritas pela primeira vez na Alemanha (1983) e na França (1985) em espécies de *Klebsiella* as ESBLs existem em todos os continentes do mundo na maioria dos gêneros de enterobactérias (PEREZ, 2007).

2.1.8.1.1 – Europa

Microrganismos produtores de ESBLs foram detectados pela primeira vez na Europa, provavelmente porque foi lá onde clinicamente os antibióticos β -lactâmicos de espectro estendido foram pela primeira vez utilizados (BRADFORD, 2001). Todavia, embora o primeiro relato tenha sido na Alemanha (KNOTHE, 1983), a grande maioria dos surtos e relatos na primeira década da descoberta das ESBLs originaram-se da França (PHILIPPON, 1989).

Na Europa, a prevalência de isolados produtores de ESBLs varia bastante de país para país. Entre os países, a variabilidade de hospital para hospital também precisa ser destacada (BABINI, 2000a; BRADFORD, 2001). Em 1999, uma pesquisa com 448 isolados clínicos produtores de ESBLs provenientes de 10 diferentes hospitais italianos encontrou principalmente ESBLs dos tipos TEM e SHV (PERILLI, 2002). Uma pesquisa similar foi realizada pelo mesmo grupo em 2003 e constatou-se que a prevalência geral de ESBLs aumentou de 6,3 para 7,4%. Neste segundo estudo, as ESBLs TEM e SHV continuaram como mais prevalentes, entretanto, a emergência das ESBLs do tipo CTX-M começava a aparecer (LUZZARO, 2006). Outro grande estudo em mais de 100 unidades de tratamento intensivo de cinco países europeus encontrou que a prevalência de ESBLs em *Klebsiella* spp. variou de 3% na Suécia até 34% em Portugal (HANBERGER, 1999). Na França, um estudo com enterobactérias de 88 hospitais encontrou que 1,7% de 10.872 isolados armazenavam ESBLs (GALAS, 2008).

Uma perspectiva contemporânea na epidemiologia das ESBLs revela a grande disseminação das ESBLs do tipo CTX-M atualmente na Europa

(LIVERMORE, 2007; BONNET, 2004). Amostras expressando ESBLs do tipo CTX-M têm sido isoladas em muitas partes do mundo, mas têm mais frequentemente sido associadas com surtos locais na Europa oriental (GNIADKOWSKI, 1998). Alguns relatos dessas enzimas têm ocorrido em amostras de pacientes da Europa ocidental, mas a maioria composta de imigrantes provenientes das áreas de surtos (TZOUVELEKIS, 2000). Contudo, SABATÉ e cols. (2000) relataram que 23 amostras de *E. coli* e *Salmonella* spp. isoladas na Espanha expressaram a ESBL CTX-M-9, sugerindo que deve haver um foco endêmico desta enzima também na Europa ocidental.

2.1.8.1.2 – América do Norte

De maneira geral, os índices de prevalência de ESBLs nos Estados Unidos e Canadá são inferiores em comparação com outros países. Resultados de um estudo multicêntrico entre 1997 e 1999 revelaram maiores índices fenotípicos de produção de ESBLs em amostras da América Latina (45%), seguidos pelos índices da região do Pacífico Oeste (Ásia e Austrália) (25%), Europa (23%), Estados Unidos (8%) e Canadá (5%) (WINOKUR, 2001). MOLAND e cols. (2002) demonstraram que isolados produtores de ESBLs foram encontrados em apenas 75% de 24 hospitais nos Estados Unidos.

No Canadá, em um estudo com 34.479 amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae* provenientes de 12 hospitais de diferentes regiões foram confirmadas 116 amostras (0,34%) como produtoras de ESBLs das famílias TEM e SHV (MULVEY, 2004). Embora as ESBLs do tipo CTX-M não tenham sido pesquisadas neste estudo, PITOUT e cols. (2004) encontraram grande prevalência destas enzimas (68%) entre isolados clínicos produtores de ESBLs coletados entre 2000 e 2002 em Calgary.

2.1.8.1.3 – América Latina

Em contraste com a América do Norte, a prevalência de microrganismos produtores de ESBLs (principalmente *K. pneumoniae*) é alta na América Latina. WINOKUR e cols. (2001) demonstraram a alta prevalência de ESBLs (45%) em isolados de hemoculturas de *E. coli* e *K. pneumoniae* provenientes de 10 centros da Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, México e Uruguai. A Argentina foi um dos primeiros países onde se isolaram microrganismos produtores de ESBLs do tipo CTX-M (RADICE, 2002) e possui a enzima CTX-M-2 como a ESBL mais frequentemente isolada do país (TRUPPIA, 2005).

No Brasil, a prevalência de ESBLs foi pesquisada em hospitais de Porto Alegre (FREITAS, 2003), São Paulo (DROPA, 2009), Curitiba (NOGUEIRA, 2006) e Goiânia (SANTOS, 2008). Também algumas enzimas do tipo CTX-M (CTX-M-8, -9 e -16) foram descritas pela primeira vez no Rio de Janeiro (BONNET, 2000; BONNET, 2001).

2.1.8.1.4 – Ásia, África e Austrália

Foram descritos isolados coletados em hospitais chineses entre 1998 e 1999, 30,7% dos isolados de *K. pneumoniae* e 24,5% dos isolados de *E. coli* eram produtores de ESBLs. No mesmo período, a prevalência de ESBLs em *K. pneumoniae* em um hospital japonês foi de 25% (BELL, 2002). Em um estudo multicêntrico, envolvendo 13 hospitais universitários na Coreia do Sul, foram encontrados 39,2% dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* armazenando algum tipo de ESBL (JEONG, 2004). Também em amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae*, a prevalência de ESBLs em um único hospital na Índia durante um período de seis meses em 2006 foi de 22% (AGRAWAL, 2008). Em 2009, um estudo com pacientes hospitalizados e da comunidade na Arábia Saudita relatou a prevalência de 15,4% dos microrganismos Gram-negativos como produtores de ESBLs (KHANFAR, 2009).

Apesar de não possuir nenhum estudo de vigilância nacional, a África do Sul é o país com o maior número de pesquisas referentes a ESBLs do continente

africano. Em 1998 e 1999, foi relatado que 36,1% dos isolados de *K. pneumoniae* coletados em um único hospital eram produtores de ESBLs (BELL, 2002).

Na última década do século XX, microrganismos produtores de ESBLs foram detectados em todos os estados australianos e no Território Norte. Entretanto, a proporção dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBLs nos hospitais australianos é de 5% (BELL, 2002).

2.1.8.2 – Epidemiologia molecular das infecções hospitalares

No final do século XX e início do século XXI, um grande número de estudos foi publicado utilizando métodos de tipagem molecular no estudo da epidemiologia das infecções hospitalares por microrganismos produtores de ESBLs (BRADFORD, 2005; PATERSON, 1999). A maioria desses estudos correlacionou a presença de ESBLs em *K. pneumoniae*, fato que nunca foi claramente explicado. As enzimas do tipo TEM aparecem disseminadas em outras espécies, mas interessante é a frequente presença de ESBLs do tipo SHV em *K. pneumoniae* (BRADFORD, 2005); quase todos os isolados de *K. pneumoniae* não produtores de ESBLs possuem a β -lactamase SHV-1 mediada por cromossomos (BABINI, 2000b). Em contraste, menos de 10% dos isolados de *E. coli* resistentes à ampicilina possuem SHV-1 (LIVERMORE, 1995).

Muitos genes para ESBLs estão localizados em plasmídios; mesmo antes do advento das ESBLs, plasmídios multirresistentes eram mais comuns em espécies de *Klebsiella* do que em *E. coli*. (LIVERMORE, 1995). Também é importante destacar a evidente adaptação do gênero *Klebsiella* ao ambiente hospitalar. Este gênero de microrganismos sobrevive mais tempo que outras enterobactérias em mãos e superfícies ambientais, facilitando a infecção cruzada entre hospitais (CASEWELL, 1981).

Na grande maioria dos estudos que utilizam métodos moleculares para a identificação de ESBLs pelo menos dois pacientes estão colonizados ou infectados com amostras similares genotipicamente. Muitos surtos têm sido descritos com a disseminação de um único clone de um microrganismo genotipicamente idêntico (MENA, 2006; COQUE, 2002; GNIADKOWSKI, 1998).

Contudo, em muitos hospitais a epidemiologia molecular dessas enzimas têm se apresentado de uma maneira diferente (BABINI, 2000a). Muitos estudos têm relatado a presença de microrganismos armazenando mais de um tipo de ESBLs (LUZZARO, 2006; TASLI, 2005; JEONG, 2004; MULVEY, 2004; SANGUINETTI, 2003; PERILLI, 2002; SPANU, 2002). MOLAND e cols. (2007) em 2007 alertaram para a presença de um isolado de *K. pneumoniae* produzindo pelo menos oito β -lactamases diferentes em Nova York. Além disso, isolados genotipicamente não-relacionados podem produzir a mesma ESBL devido à transferência de plasmídios entre espécies diferentes (LIVERMORE, 1995).

2.1.8.3 – Fatores de risco

Os estudos têm revelado a existência de fatores de risco independentes entre si, associados à produção de ESBLs (PFALLER, 2006; TUMBARELLO, 2006, LAUTENBACH, 2001). Além da severidade da doença (PATERSON, 2005; BRADFORD, 2001), o principal fator está relacionado ao tempo de permanência do paciente nos hospitais, principalmente nos centros de tratamento intensivos (CTIs). A hospitalização anterior, onde houve uso de antimicrobianos, também desempenha papel importante neste sentido (DALMARCO, 2006; TUMBARELLO, 2006).

O uso de antibióticos de amplo espectro, principalmente as cefalosporinas de terceira geração, é um importante fator de risco para a aquisição de microrganismos produtores de ESBLs (PFALLER, 2006). Outro fato importante é que pacientes infectados com esses microrganismos tendem a ser aqueles onde houve um longo atraso até o início do tratamento com um antibiótico realmente efetivo (LAUTENBACH, 2001).

Outros importantes fatores de riscos estão associados à utilização de procedimentos invasivos como cateteres venosos centrais, cateteres arteriais, urinários, além de intubações pulmonares e mecanismos de ventilação mecânica (PFALLER, 2006; LAUTENBACH, 2001). Além disso, inúmeros outros fatores têm sido relatados, como administração de nutrição parenteral total, cirurgia recente, hemodiálise, úlcera de decúbito, mau estado nutricional (PATERSON, 2005) e *diabetes mellitus* (RODRIGUEZ-BAÑO, 2004). Em um estudo realizado em Salvador

(BA) por SILVA e cols. (2006) de 2000 a 2004, *diabetes mellitus*, uso prévio de antibióticos e diagnóstico de doença maligna foram identificados como fatores de risco independentes para a aquisição de uma infecção por *K. pneumoniae* produtora de ESBL.

2.1.9 – Detecção de ESBLs

O aumento da prevalência de enterobactérias produtoras de ESBLs criou a necessidade dos laboratórios testarem métodos que pudessem identificar precisamente a presença dessas enzimas nos isolados clínicos (BRADFORD, 2001). Os testes fenotípicos de disco-difusão e de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) são as principais metodologias utilizadas pelos laboratórios clínicos para a detecção da resistência microbiana (PFALLER, 2006; SANGUINETTI, 2003). Entretanto, a falta de sensibilidade e especificidade nos testes fenotípicos tradicionais de susceptibilidade (disco-difusão e CIM) em detectar ESBLs tem incentivado à procura por um teste mais preciso para detectar a presença dessas enzimas em isolados clínicos (Perez, 2007).

2.1.9.1 – Triagem inicial

Para a triagem inicial de ESBLs o “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) recomenda os métodos de disco difusão e diluição em caldo. O método de disco difusão para a triagem inicial da produção de ESBLs é válido para *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* (CLSI, 2009; PEREZ, 2007).

Os laboratórios que utilizam métodos de disco difusão para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos podem suspeitar da produção de ESBLs nos microrganismos referidos pela redução, abaixo dos pontos de corte, no diâmetro da zona de inibição de um ou mais dos seguintes discos de antimicrobianos: cefpodoxima (10 µg), ceftazidima (30 µg), aztreonam (30 µg), cefotaxima (30 µg) e

ceftriaxona (30 µg) (CLSI, 2009) (Tabela 2). Aztreonam e ceftriaxona não são recomendados para *Proteus mirabilis*. O uso de mais de um desses agentes aumenta a sensibilidade da triagem. Se qualquer um dos diâmetros das zonas de inibição estiver reduzido abaixo dos pontos de corte estabelecidos pelo CLSI, testes fenotípicos confirmatórios devem ser utilizados para confirmar a presença de ESBLs (CLSI, 2009; CARTER, 2000).

Para os laboratórios que utilizam metodologia automatizada, o CLSI propõe métodos de diluição para a triagem inicial da produção de ESBLs em *E. coli* e *Klebsiella* spp. (BRADFORD, 2001). Neste caso, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima ou ceftriaxona são utilizados. O crescimento nas concentrações mais altas desses antimicrobianos (CIM ≥ 2 µg/mL) indicam uma provável presença de ESBLs e a necessidade de realização de um teste fenotípico confirmatório. Cefpodoxima também pode ser utilizada, porém, neste caso a confirmação de ESBLs deve ser feita apenas em casos de CIM ≥ 8 µg/mL (CLSI, 2009).

Tabela 2 – Pontos de corte para a triagem de ESBLs

Agente antimicrobiano	Halo de difusão do disco (mm)	Concentração Inibitória Mínima (CIM)
Cefpodoxima	≤ 17	≥ 8 µg/mL
Ceftazidima	≤ 22	≥ 2 µg/mL
Aztreonam	≤ 27	≥ 2 µg/mL
Cefotaxima	≤ 27	≥ 2 µg/mL
Ceftriaxona	≤ 25	≥ 2 µg/mL

Fonte: adaptado de CLSI (2009).

2.1.9.2 – Testes fenotípicos confirmatórios para a produção de ESBLs

2.1.9.2.1 – Método sinérgico do duplo disco ou disco aproximação

Neste teste, o sinergismo entre cefotaxima e ácido clavulânico é detectado colocando-se um disco de amoxicilina + clavulanato e um disco de cefotaxima a uma distância de 30 mm (centro a centro) em uma placa de ágar Mueller-Hinton

inoculada com o microrganismo a ser testado. Um claro aumento na zona de inibição do disco de cefotaxima em direção ao disco contendo clavulanato (“zona fantasma”) indica a presença de uma ESBL. Discos de ceftazidima, aztreonam e cefpodoxima também podem ser colocados na placa, pois, muitas vezes o sinergismo não é observado com cefotaxima (JARLIER, 1988 apud BRADFORD, 2001). Além disso, a sensibilidade do teste pode ser aumentada reduzindo-se a distância entre os discos para 20 mm (THOMSON, 1992).

A avaliação do teste sinérgico do duplo disco através da confirmação genotípica da presença de ESBLs tem revelado uma sensibilidade que varia entre 79 e 97% e uma especificidade entre 94 e 100% (TRUPPIA, 2005; PITOUT, 2004; SANGUINETTI, 2003; MACKENZIE, 2002; CARTER, 2000; THOMSON, 1992). A grande vantagem do teste sinérgico do duplo disco é que ele é tecnicamente simples. Contudo, a interpretação do teste pode se tornar bastante subjetiva. A sensibilidade pode ser reduzida quando a atividade da ESBL é muito fraca, levando a grandes zonas de inibição ao redor dos discos de cefalosporinas e aztreonam (MACKENZIE, 2002).

2.1.9.2.2 – Método do disco combinado

No final do século XX, algumas empresas desenvolveram discos que continham uma cefalosporina de espectro estendido associada ao ácido clavulânico. Estes discos combinados demonstraram ser bastante precisos na detecção de ESBLs (CARTER, 2000). Uma diferença ≥ 5 mm no diâmetro da zona de inibição do disco de cefalosporina e seu respectivo disco combinado com ácido clavulânico confirma fenotipicamente a produção de ESBLs (CLSI, 2009; CARTER, 2000).

O CLSI defende o uso de discos de cefotaxima e ceftazidima com e sem ácido clavulânico para a confirmação fenotípica da presença de ESBLs em *Klebsiella* spp. e *E. coli*. (CLSI, 2009). Em uma avaliação de 139 isolados de *K. pneumoniae* que foram selecionados como prováveis produtores de ESBLs pelos critérios do CLSI, STEWARD e cols. (2001) confirmaram 84% (117 de 139) como produtores de ESBLs pelo método do disco combinado. Dos 117 isolados, 104

(89%) foram positivos com ambos cefotaxima e ceftazidima, 11 (9%) apenas com ceftazidima e 2 (2%) apenas com cefotaxima.

2.1.9.3 – Teste de Susceptibilidade a cefoxitina

Inicialmente, a resistência a cefoxitina foi considerada como um marcador substituto para a perda dos poros da membrana externa e presença de enzimas do tipo AmpC (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 1999; ARDANUY, 1998; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 1996). Entretanto, mais tarde a resistência a cefoxitina demonstrou ser um indicador não-específico da produção de β -lactamases do tipo AmpC (STEWART, 2001; COUDRON, 2000). Em seu estudo, COUDRON e cols. (2000) relataram considerável melhora na especificidade dos testes apenas modificando o tamanho de halo a ser considerado (< 18 cm). Apesar disso, STEWARD e cols. (2001) associaram a resistência a cefoxitina à presença de mecanismos de resistência que podem prejudicar a detecção de ESBLs pelos métodos fenotípicos.

2.1.9.4 – Controle de Qualidade para testes fenotípicos

A recomendação de controle de qualidade é de que seja feito teste simultâneo com um microrganismo não produtor de ESBL (*Escherichia coli* ATCC 25922) e um microrganismo produtor de ESBL (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603) (CLSI, 2009). O microrganismo controle produtor de ESBL *K. pneumoniae* K6 (ATCC 700603) já foi bem caracterizado e produz SHV-18 (RASHEED, 2000).

2.1.9.5 – Significado e importância da detecção fenotípica de ESBLs

Pacientes com infecções causadas por microrganismos produtores de ESBLs têm um risco aumentado de falha no tratamento com antibióticos β -lactâmicos de

amplo espectro (BRADFORD, 2001). Por isso, para todos os produtores de ESBLs confirmados o consenso geral determina que esses microrganismos sejam relatados como resistentes a todas as penicilinas, cefalosporinas (exceto as cefamicinas cefoxitina e cefotetan), e o aztreonam, independente dos resultados do teste de susceptibilidade. Particularmente, combinações de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases (Ex: piperacilina-tazobactam, amoxicilina-ácido clavulânico e ampicilina-sulbactam) não são afetados por essa regra e devem ser relatados conforme os resultados obtidos (CLSI, 2009; PEREZ, 2007; PATERSON, 2005).

Enquanto algumas amostras produtoras de ESBLs possuem evidente resistência aos antibióticos β -lactâmicos de amplo espectro, muitos isolados podem não ser fenotipicamente resistentes de acordo com as recomendações dos manuais. Por isso, é importante para o laboratório de microbiologia estar atento aos isolados que podem apresentar CIM aumentadas para as cefalosporinas mesmo que eles possam não ser relatados como resistentes, pois isso pode sugerir a presença de uma ESBL. Este fato torna mais importante ainda a implementação de um ou mais métodos de detecção de ESBLs pelos laboratórios de microbiologia (BRADFORD, 2001).

2.1.9.6 – Problemas associados com a detecção de ESBLs

As falhas, tanto dos testes de determinação da CIM, como nos de disco difusão sozinhos para detectar a presença de ESBLs em amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae*, já foram documentadas. Em uma pesquisa conduzida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), apenas 2 entre 130 laboratórios pesquisados especificamente detectaram a presença de ESBL em uma amostra teste (TENOVER, 2003).

Uma das principais dificuldades consiste na diferente afinidade das diversas variantes de ESBLs às cefalosporinas de terceira geração. Os resultados dos testes fenotípicos dependem dos substratos usados para a detecção; um determinado microrganismo pode não ser propriamente reconhecido como um produtor de ESBL dependendo do substrato específico utilizado. Neste sentido, quanto maior o número de substratos utilizados, maior a chance se detecção de ESBLs (PFALLER, 2006).

Outro problema importante diz respeito aos resultados falso negativos. Embora os testes fenotípicos de triagem inicial e confirmação sejam usualmente confiáveis na identificação de ESBLs, resultados falso negativos podem ocorrer quando um inóculo diluído é usado no teste. Este fenômeno foi observado quando o efeito do inóculo foi estudado em amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de ESBLs (QUEENAN, 2004). Resultados falso negativos podem ocorrer também quando a atividade da enzima é muito fraca (MACKENZIE, 2002).

Alguns isolados de *Klebsiella pneumoniae* foram caracterizados acumulando β -lactamases do tipo AmpC e ESBLs, ao mesmo tempo (TZOUVELEKIS, 1999b). A coexistência dos dois tipos de enzimas na mesma amostra também resulta em resultados fenotípicos falso negativos para a detecção de ESBLs. As β -lactamases do tipo AmpC resistem a inibição pelo clavulanato e obscurecem o efeito sinérgico deste agente (TOFTELAND, 2007; PATERSON, 2005; PERILLI, 2002).

As β -lactamases do tipo AmpC, que não são inibidas pelo ácido clavulânico, também constituem um problema mesmo quando estas enzimas se encontram sozinhas, sem a companhia de ESBLs. A emergência destas enzimas em membros da família *Enterobacteriaceae* é, provavelmente, a explicação para muitos microrganismos que apresentam testes de triagem positivo para ESBLs e, posteriormente, evidenciam testes confirmatórios negativos (BELL, 2007).

Por outro lado, isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* não produtores de ESBLs, mas com hiperprodução de SHV-1 podem apresentar testes fenotípicos confirmatórios falso positivos (RICE, 2000; RASHEED, 1997). RICE e cols. (2000) caracterizaram um microrganismo onde uma mudança em um único par de bases resultou em aumento da produção da enzima cromossomal SHV-1.

2.1.9.7 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção de ESBLs

Os testes fenotípicos confirmatórios apenas presuntivamente identificam a presença de uma ESBL. A tarefa de identificar qual ESBL específica está presente em uma amostra é mais complicada. No início do século XXI a determinação do ponto isoelétrico era usualmente suficiente para identificar o tipo de ESBL que estava presente. Contudo, com o grande número de variantes de ESBLs do tipo

TEM muitas dessas acabam por possuir pontos isoelétricos idênticos. Uma situação similar é encontrada nos tipos SHV e CTX-M de ESBLs (BRADFORD, 2001).

Atualmente, o método molecular mais comumente utilizado para detectar a presença de uma β -lactamase e a que família esta enzima pertence é a PCR com utilização de iniciadores específicos para determinado gene de β -lactamase. Os iniciadores podem ser escolhidos de seqüências disponíveis em bancos de dados públicos como o Genbank (Genbank, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). Contudo, a PCR não discrimina entre as diferentes variantes de cada família de ESBLs (Ex: TEM-1, TEM-2, etc.) (BRADFORD, 2001).

Embora a maioria dos laboratórios de microbiologia, rotineiramente, utilize métodos fenotípicos para detectar ESBLs, a detecção molecular dos pontos de mutação no sítio ativo do gene das β -lactamases confirma a presença de ESBLs e permite a caracterização dos tipos de ESBLs, o que é importante no monitoramento de sua disseminação (SPEERS, 2006). Contudo, deve-se ressaltar que a discriminação entre as variantes de cada família só é possível através do sequenciamento (PERILLI, 2002).

2.1.10 – Opções terapêuticas

Pacientes com infecções devido a microrganismos produtores de ESBLs tendem a ter resultados menos satisfatórios do que aqueles infectados por patógenos que não produzem ESBLs (PEREZ, 2007; TUMBARELLO, 2006). Um dos fatores determinantes no resultado dos pacientes infectados é a escolha da terapia empírica apropriada dentro das primeiras 24 – 48 horas de apresentação (PEREZ, 2007).

No caso das ESBLs, os plasmídeos armazenadores de genes codificadores dessas enzimas frequentemente também carregam genes codificadores de resistência aos aminoglicosídeos, quinolonas e sulfametoxazol/trimetoprim. Este fato somado a habilidade dos microrganismos produtores de ESBLs em hidrolisar muitos antibióticos β -lactâmicos faz com que as opções de tratamento fiquem seriamente reduzidas (PATERSON, 2005; LAUTENBACH, 2001; BABINI, 2000a).

As combinações β -lactâmico/inibidor de β -lactamase são usualmente ativas contra microrganismos que possuem uma única ESBL. Entretanto, atualmente muitos microrganismos produzem múltiplas ESBLs, o que pode reduzir a efetividade destas associações (PATERSON, 2005). Em um estudo com isolados de 35 CTIs na Europa a porcentagem de isolados produtores de ESBLs resistentes a piperacilina-tazobactam aumentou de 31% em 1994 para 63% em 1997-1998 (BABINI, 2000a).

In vitro, os carbapenens possuem a atividade mais consistente contra microrganismos produtores de ESBLs (MENEZES, 2007a; MENEZES, 2007b; LIVERMORE, 2001). O ertapenem possui estabilidade frente a elevados inóculos bacterianos (assim como o imipenem), pode ser administrado via intramuscular e não contribui para a seleção de *Pseudomas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenêmicos (LIVERMORE, 2001). As cefamicinas também são estáveis frente a ação hidrolítica das β -lactamases, mas microrganismos produtores de ESBLs podem se tornar resistentes às cefamicinas através da perda de proteínas da membrana externa (PATERSON, 2005).

Os carbapenens são considerados como os antibióticos de escolha para infecções graves por microrganismos produtores de ESBLs (PATERSON, 2000; PEREZ, 2007). Entretanto, é necessário estar atento aos isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenens (PATERSON, 2005; PEREZ, 2007).

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Seleção dos microrganismos

Durante o período de abril de 2007 a maio de 2008 foram selecionados 90 isolados clínicos consecutivos não-duplicados de *E. coli* e *Klebsiella* spp. provenientes de materiais biológicos diversos (ferida operatória, escara, urina, swab anal, secreção traqueal, escarro, etc.) de pacientes internados no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). O HUSM é um hospital-escola com 336 leitos de referência regional no atendimento de pacientes pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Para a seleção dos microrganismos, contou-se com a ajuda dos profissionais do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HUSM. No LAC, os microrganismos foram selecionados e identificados através do sistema automatizado autoSCAN-4 (Dade Behring Inc., West Sacramento, CA, USA) e através de métodos microbiológicos convencionais. Os critérios de seleção adotados foram aqueles recomendados pelo CLSI para triagem de microrganismos produtores de ESBLs em *E. coli* e *Klebsiella* spp. (CLSI, 2009).

Os microrganismos selecionados foram transportados para o Laboratório de Biotecnologia e Genética da Universidade de Santa Cruz do Sul onde foram realizados os testes fenotípicos e moleculares.

3.2 – Armazenamento dos microrganismos

Os microrganismos foram armazenados em alíquotas em freezer à – 20°C utilizando-se a técnica do glicerol (OPLUSTIL, 2004). No momento da utilização para os testes fenotípicos e moleculares uma amostra de cada microrganismo era descongelada a temperatura ambiente. Para a realização dos testes fenotípicos, cada microrganismo era inoculado em uma placa com ágar Mueller-Hinton (Merck; Darmstadt, Alemanha) e incubado em estufa para crescimento bacteriano a 35°C por 24 horas. Para a extração de DNA, cada microrganismo era inoculado em um

tubo de ensaio contendo 2 mL de caldo BHI (brain-heart infusion) (Merck; Darmstadt, Alemanha) e incubado a 35°C por 48 horas.

3.3 – Testes fenotípicos

Todos os testes fenotípicos foram realizados em ágar Mueller-Hinton (Merck; Darmstadt, Alemanha) de acordo com o método de disco difusão desenvolvido por Kirby e Bauer padronizado pelo CLSI (CLSI, 2006).

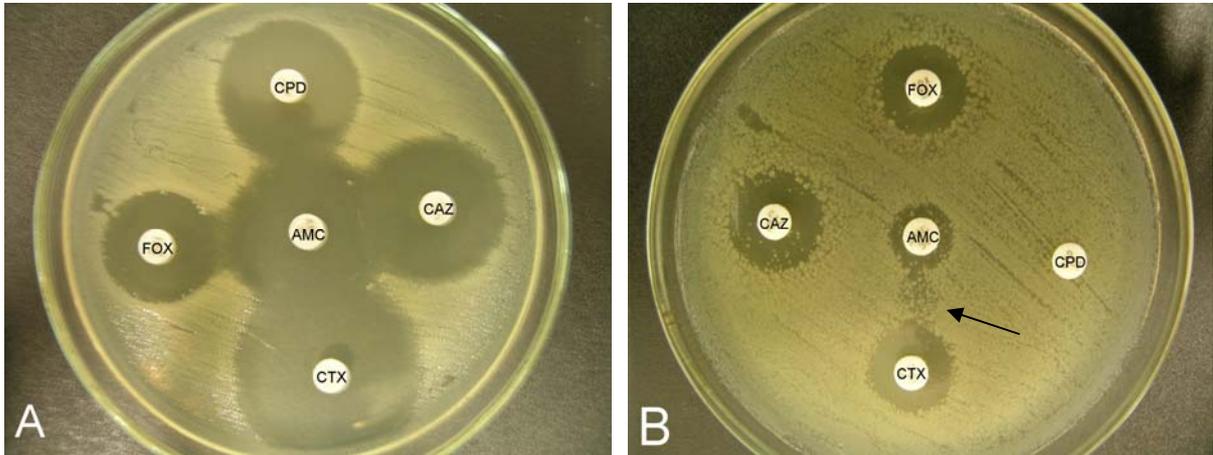
3.3.1 – Método sinérgico do duplo disco ou disco-aproximação

Discos para antibiograma contendo cefpodoxima (10 µg), ceftazidima (30 µg) e cefotaxima (30 µg) (Oxoid; Basingstoke, Inglaterra) foram distribuídos a uma distância de 20 mm de um disco contendo amoxicilina-ácido clavulânico (20/10 µg) (Oxoid; Basingstoke, Inglaterra). A presença de deformação no halo de inibição de qualquer um dos discos de cefalosporinas em direção ao disco de amoxicilina-ácido clavulânico confirmava o teste como positivo. Este efeito (conhecido como “zona fantasma”) caracteriza a ação inibitória do ácido clavulânico e confirma fenotipicamente o microrganismo como produtor de ESBL (JARLIER, 1988) (Figura 3).

3.3.2 – Método do disco combinado

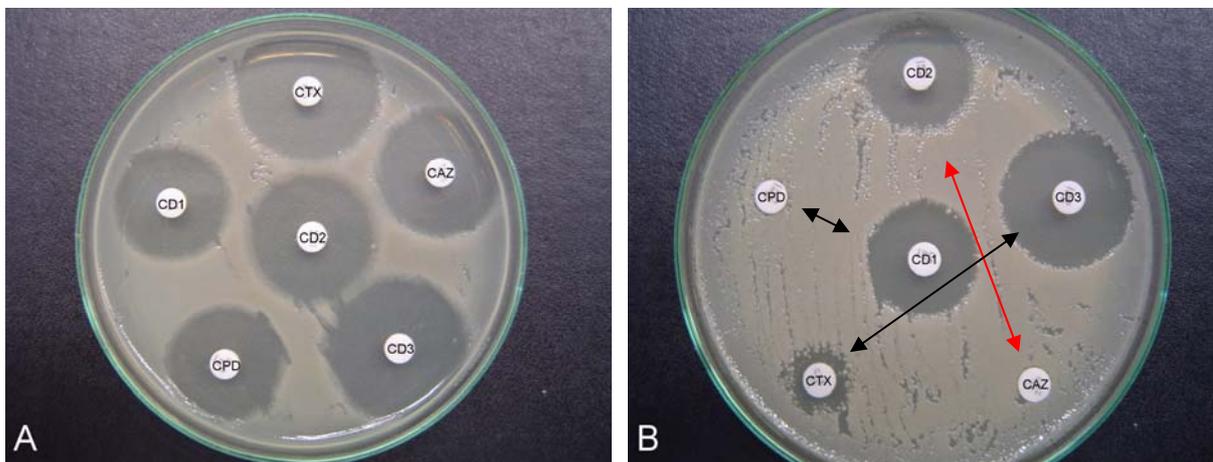
Foram utilizados os mesmos discos de antimicrobianos citados anteriormente isoladamente, e em associação, com ácido clavulânico (Oxoid; Basingstoke, Inglaterra). Neste teste, a produção de ESBL foi confirmada pelo aumento (≥ 5 mm) no diâmetro do halo de inibição de qualquer um dos três discos contendo o

antibiótico em combinação com o ácido clavulânico quando comparado ao seu correspondente sem a presença deste inibidor (CLSI, 2009) (Figura 4).



A: teste negativo; B: teste positivo. CPD: cefpodoxima (10 μ g); CAZ: ceftazidima (30 μ g); CTX: cefotaxima (30 μ g); AMC: amoxicilina-ácido clavulânico (20/10 μ g); FOX: cefoxitina (30 μ g).

Figura 3 – Método sinérgico do duplo disco



A: teste negativo; B: teste positivo. CPD: cefpodoxima (10 μ g); CAZ: ceftazidima (30 μ g); CTX: cefotaxima (30 μ g); CD1: cefpodoxima-ácido clavulânico (10/10 μ g); CD2: ceftazidima-ácido clavulânico (30/10 μ g); CD3: cefotaxima-ácido clavulânico (30/10 μ g).

Figura 4 – Método do disco combinado

3.3.3 – Teste de susceptibilidade a cefoxitina

Os microrganismos que evidenciaram ausência do efeito inibitório do ácido clavulânico nos dois métodos fenotípicos foram avaliados frente a discos de cefoxitina (30 µg) (Oxoid; Basingstoke, Inglaterra). A determinação da susceptibilidade a cefoxitina foi realizada com o propósito de fazer uma correlação entre a resistência a cefoxitina e a falha na detecção de ESBLs pelos métodos fenotípicos utilizados. A resistência à cefoxitina está associada a presença de outros mecanismos de resistência como mudanças nos poros e presença de enzimas do tipo AmpC (STEWART, 2001). Halos menores ou iguais a 14 mm foram considerados resistentes, halos entre 15 e 17 mm, intermediários e halos maiores ou iguais a 18 mm, sensíveis.

3.4 – Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com a metodologia descrita por van Soolingen (VAN SOOLINGEN, 1991) com algumas modificações.

A primeira modificação ocorreu na etapa inicial onde a inoculação de cada microrganismo em placa de ágar MacConkey e incubação a 35°C por 24 horas foi substituída pela inoculação em um tubo de ensaio estéril contendo 2 mL de caldo de enriquecimento BHI a 35°C por 48 horas (conforme descrito anteriormente).

A segunda etapa da metodologia descrita por van Soolingen também foi substituída. Assim, transferiu-se o caldo BHI com crescimento bacteriano para um micro tubo plástico de 1,5 mL e centrifugou-se a 13.000 rotações por minuto (RPM) durante cinco minutos. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido com 400 µL de tampão TE 1x (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) (SAMBROOK, 2001a). As modificações feitas nas duas primeiras etapas tiveram o objetivo de obter um maior crescimento bacteriano e, conseqüentemente, maior quantidade de DNA.

Como última modificação, juntamente com a quarta etapa da metodologia descrita por van Soolingen foi adicionado 2 µL de RNase A (20 µg/mL) (Invitrogen;

Carlsbad, CA, USA). O objetivo desta modificação foi eliminar a interferência do RNA (como o aparecimento de bandas de arraste na eletroforese em gel de agarose, por exemplo) e extrair somente DNA.

Depois de terminada a extração de DNA, foi realizada uma rápida estimativa da quantidade de DNA obtido através de eletroforese em gel de agarose (VAN SOOLINGEN, 1994). Ao se constatar (visualmente) suficiente quantidade de DNA extraído, o mesmo era armazenado em três alíquotas a 4°C para posterior utilização.

3.5 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)

3.5.1 – Preparação dos iniciadores (primers)

A técnica de PCR foi realizada para confirmar a presença dos genes codificadores de ESBLs dos tipos TEM, SHV e CTX-M em cada amostra. Para cada família de ESBL foi utilizado um par de iniciadores (primers) específico, que amplificava uma sequência de pares de bases comum a todas as variantes de ESBLs de cada família.

Os três pares de primers utilizados foram adquiridos da Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, USA). Os primers foram dissolvidos de sua forma concentrada (liofilizada) com água estéril, conforme as recomendações do fabricante. Os primers tinham as seguintes quantidades de oligonucleotídeos, respectivamente: TEM = 95,9 e 70,6 nMol; SHV = 68,7 e 89,2 nMol e CTX-M = 73,5 e 65,6 nMol. Cada primer foi dissolvido em uma quantidade de água (em microlitros) dez vezes maior que o número de nanomóis de oligonucleotídeos presente em cada tubo. Foram feitas diversas alíquotas de cada primer em micro tubos de 0,2 µL que foram armazenadas em freezer à – 20°C até o momento de sua utilização.

O par de primers 5'- ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG -3' e 5'- CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA -3' (RASHEED, 1997) foi utilizado para amplificação de uma sequência de 1.076 pares de bases (pb) comum em todas as variantes da família TEM. Para a família SVH foi utilizado o par de primers 5'- TTA GCG TTG CCA GTG CTC -3' e 5'- GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC -3' (930 pb) (RASHEED, 1997) e para a família CTX-M, 5'- ACC GCG ATA TCG TTG GT -3' e 5'- CGC TTT GCG ATG TGC AG -3' (550 pb) (BONNET, 2001).

3.5.2 – Preparação da reação de PCR

Os procedimentos da PCR foram realizados em capela de fluxo laminar modelo Trox Technik (Biosystems). As reações (mix) de todos os PCR foram realizadas em micro tubos de 0,2 mL. Em cada reação foi utilizado 1 µL do DNA extraído de cada microrganismo, 0,25 µL de cada primer específico, 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/ µL) (Ludwig Biotec), 2,5 µL de tampão MgCl₂ (50 mM/mL) (Fermentas), 2,5 µL de solução dNTP (0,2 mM/mL) (Ludwig Biotec) e água miliQ em um volume total de 25 µL.

3.5.3 – Amplificação do DNA

Após preparada a reação os micro tubos foram acondicionados no termociclador MJ96G (Biocycler). As condições de cada reação foram as seguintes: para a família TEM, 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C, seguidos de 30 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (58°C por 1 minuto) e extensão (72°C por 1 minuto), finalizando com um período de extensão final de 72°C por 7 minutos. Para a família SHV, 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguidos de 35 ciclos de desnaturação (95°C por 45 segundos), anelamento (59°C por 45 segundos) e extensão (72°C por 1 minuto), finalizando com um período de extensão final de 72°C por 7 minutos. E finalmente para a família CTX-M, 7 minutos de desnaturação inicial a 94°C, seguidos de 35 ciclos de desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (54°C por 45 segundos) e extensão (72°C por 1 min), com um período de extensão final de 7 minutos a 72°C.

3.6 – Eletroforese em gel de agarose

Para visualização e avaliação do padrão dos amplicons de DNA o material amplificado de cada reação foi submetido à eletroforese em gel agarose 1%

(BioRad) com brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O gel de agarose 1% foi preparado conforme descrito por Sambrook (SAMBROOK, 2001b). Em um micro tubo de 0,2 µL, foi misturado 1 µL do DNA amplificado de cada amostra, 4 µL de tampão TE 1x e 6 µL de tampão de corrida (SAMBROOK, 2001c). Dez microlitros dessa mistura de cada amostra era colocado em cada cavidade do gel de agarose o qual foi submetido a uma tensão de 6 volts/cm durante uma hora em um sistema de eletroforese horizontal. A fonte de eletroforese utilizada foi o modelo LPS 300V (Loccus biotecnologia) e a cuba horizontal, HU13 Midi (Scie-Plas).

3.7 – Visualização do DNA amplificado

Após a corrida eletroforética, o DNA amplificado pode ser visualizado em UV (312 nm) com auxílio do Transiluminador Série-ECX (Vilber Lourmat) sendo foto documentado pelo sistema DP-001.FDC (Vilber Lourmat).

Os microrganismos com genes para uma determinada família de ESBL evidenciaram o mesmo tamanho de DNA que a seqüência iniciadora amplifica o que foi confirmado pelos respectivos controles positivos e pelo marcador de tamanho molecular DNA λ clivado com Eco RI + Rind III (PB-L Productos Bio-lógicos).

3.8 – Microrganismos utilizados no controle de qualidade

No controle de qualidade dos testes fenotípicos e moleculares foram utilizados os seguintes microrganismos: *Escherichia coli* ATCC 25922 (controle negativo), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (*bla*_{SHV-18}) e *Escherichia coli* VA1341/03 (*bla*_{CTX-M-1}) (MUGNAIOLI, 2005).

3.9 Análises estatísticas

Foi utilizado um teste de hipóteses paramétrico (Teste para a proporção populacional p) para se fazer uma comparação entre os índices de detecção de ESBLs pelos métodos fenotípicos e moleculares. Também foi utilizado um teste de hipóteses não-paramétrico (Teste qui-quadrado de independência) com o objetivo de verificar a relação entre os índices de detecção de cada família de ESBLs e os índices de detecção de ESBLs pelos métodos fenotípicos (MORAES, 2008).

3.10 Aspectos éticos

O presente estudo faz parte do projeto “Prevalência e caracterização de microrganismos produtores de β -lactamases de espectro estendido em amostras ambulatoriais e hospitalares” aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) sob protocolo número 2862.

4 – RESULTADOS

Na triagem inicial, os 90 microrganismos selecionados como prováveis produtores de ESBL ficaram assim divididos: *K. pneumoniae* 71,1% (n = 64), *E. coli* 24,4% (n = 22) e *K. oxytoca* 4,4% (n = 4). Com relação aos testes fenotípicos para a produção de ESBLs nestes microrganismos, *K. pneumoniae* foi a espécie que mais apresentou resultados positivos; pelo duplo disco 46 isolados (71,9%) e pelo disco combinado 45 (70,3%). Neste sentido, *K. oxytoca* apresentou 2 isolados (50%) em ambos os métodos e *E. coli*, 9 isolados pelo duplo disco (40,9%) e 8 pelo disco combinado (36,4%).

Com relação ao desempenho dos testes fenotípicos confirmatórios, em 67,8% (61/90) das amostras selecionadas foi observado sinergismo entre o ácido clavulânico e pelo menos uma das cefalosporinas testadas pelos métodos fenotípicos utilizados. O teste sinérgico do duplo disco confirmou 63,3% dos isolados (n = 57) e o teste do disco combinado, 61,1% (n = 55) dos microrganismos previamente selecionados como produtores de ESBLs (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação entre métodos fenotípicos para detecção de ESBLs destacando-se o desempenho individual de cada substrato

Metodologia	Ceftazidima	Cefotaxima	Cefpodoxima	Total
Duplo disco	52 (91,2%)	52 (91,2%)	36 (63,2%)	57 (100%)
Disco combinado	27 (49,1%)	45 (81,8%)	48 (87,3%)	55 (100%)
Os dois métodos	57 (93,4%)	59 (96,7%)	53 (86,9%)	61 (100%)

A Tabela 3 também evidencia diferenças em termos de sensibilidade de detecção quando cada substrato é comparado com a detecção total do teste. Neste sentido, ceftazidima apresentou sensibilidade de 91,2% pelo duplo disco e 49,1% pelo disco combinado; cefpodoxima evidenciou 87,3% de sensibilidade pelo disco

combinado e 63,2% pelo duplo disco. Já cefotaxima demonstrou sensibilidades de 91,2% e 81,8% respectivamente, para duplo disco e disco combinado.

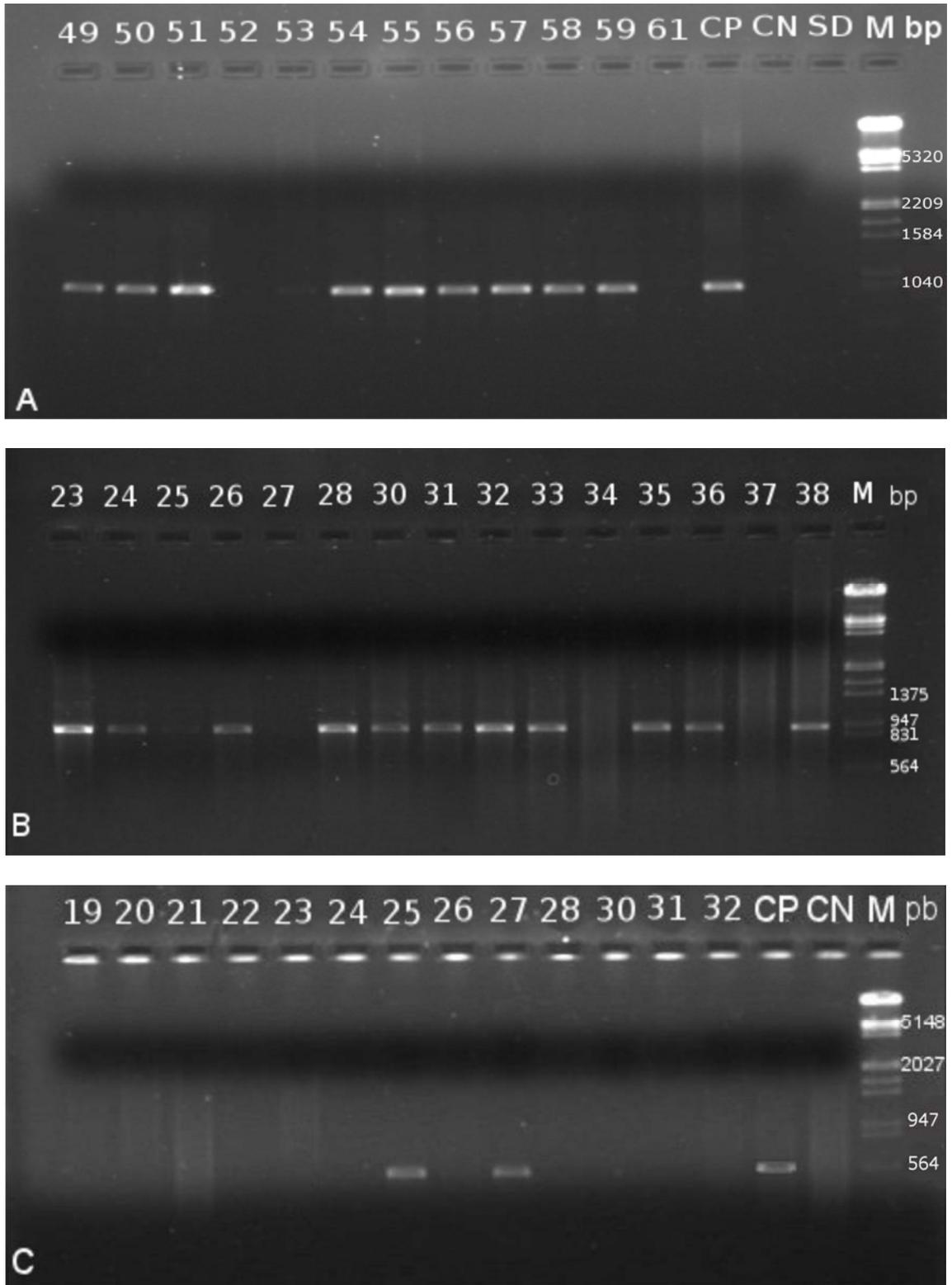
Quando se avaliou a susceptibilidade a cefoxitina, entre as 39 amostras testadas (isolados que apresentaram resultados negativos em um dos testes fenotípicos confirmatórios), 19 foram sensíveis, 16 resistentes e 4 foram consideradas intermediárias.

Os genes codificadores de ESBLs do tipo TEM foram detectados em 82,2% (n = 74) das amostras, os do tipo SHV em 67,8% (n = 61) e do tipo CTX-M, em 21,1% (n = 19). Entre as espécies estudadas, *K. pneumoniae* foi a que evidenciou os maiores percentuais dos genes TEM (89,1%) e SHV (79,7%) enquanto que em *K. oxytoca* o gene CTX-M foi detectado em 50% das cepas. Apenas um isolado de *E. coli* evidenciou genes codificadores da família CTX-M (Tabela 4) (Figura 5).

Tabela 4 - Detecção dos genes codificadores de ESBLs em *E. coli* e *Klebsiella* spp. através da reação de PCR

Microrganismo	TEM	SHV	CTX-M	TEM ou SHV ou CTX-M	Total
<i>E. coli</i>	14 (63,3%)	9 (40,9%)	1 (4,5%)	18 (81,8%)	22 (100%)
<i>K. pneumoniae</i>	57 (89,1%)	51 (79,7%)	16 (25,0%)	62 (96,9%)	64 (100%)
<i>K. oxytoca</i>	3 (75,0%)	1 (25,0%)	2 (50,0%)	4 (100,0%)	4 (100%)
Total	74 (82,2%)	61 (67,8%)	19 (21,1%)	84 (93,3%)	90 (100%)

A tabela 4 também mostra que em 93,3% (84/90) dos microrganismos selecionados foi constatada a presença de genes codificadores para pelo menos uma das três famílias de ESBLs. Neste sentido, a porcentagem entre as espécies ficou assim distribuída: *K. oxytoca* 100% (4/4); *K. pneumoniae* 96,9% (62/64) e *E. coli* 81,8% (18/22).



A: PCR com primers para ESBLs do tipo TEM; B: SHV e C: CTX-M. CP: controle positivo; CN: controle negativo; SD: sem DNA; M: marcador de tamanho molecular de DNA (PB-L Produtos Bio-Lógicos) em pares de bases (bp).

Figura 5 - Visualização do produto amplificado em gel de agarose

Quanto a presença de mais de um tipo de ESBL em uma mesma amostra, 39 isolados possuíam genes dos tipos TEM e SHV, 3 possuíam genes dos tipos TEM e CTX-M, e em apenas 1 isolado detectou-se a combinação dos genes SHV e CTX-M. Em 12 isolados foram detectados genes codificadores para os três tipos de ESBLs.

5 – DISCUSSÃO

Na triagem inicial, os 90 microrganismos selecionados como prováveis produtores de ESBL foram identificados como *K. pneumoniae* 71,1% (n = 64), *E. coli* 24,4% (n = 22) e *K. oxytoca* 4,4% (n = 4). A prevalência de espécies bacterianas produtoras de ESBLs varia conforme o país ou região de abrangência do estudo, todavia, *K. pneumoniae* e *E. coli* são as espécies mais frequentemente encontradas como produtoras destas enzimas (DROPA, 2009; KHANFAR, 2009; GALAS, 2008; LUZZARO, 2006; NOGUEIRA, 2006; SANGUINETTI, 2003; FREITAS, 2003; PERILLI, 2002; SPANU, 2002).

Com relação aos testes fenotípicos para a confirmação da produção de ESBLs a espécie mais prevalente em nosso estudo, *K. pneumoniae* também foi a que apresentou maior quantidade de resultados positivos: 46 (71,9%) isolados pelo método do duplo disco e 45 (70,3%), pelo método do disco combinado. Apesar de *E. coli* ter aparecido em segundo lugar entre as espécies selecionadas na triagem inicial, proporcionalmente, *K. oxytoca* apresentou mais resultados positivos confirmatórios da presença de ESBLs: *K. oxytoca* apresentou 2 isolados (50%) em ambos os métodos e *E. coli*, 9 isolados pelo duplo disco (40,9%) e 8 pelo disco combinado (36,4%). Em um estudo similar realizado no Canadá a confirmação de ESBLs por métodos fenotípicos foi maior em *K. pneumoniae* (46,3%) seguida de *E. coli* (17,4%) e *K. oxytoca* (6,3%) (MULVEY, 2004). Na maioria dos estudos nacionais e internacionais, *K. pneumoniae* aparece como a espécie mais frequentemente encontrada como produtora de ESBLs pelos métodos fenotípicos, seguida por *E. coli* (DROPA, 2009; LUZZARO, 2006; NOGUEIRA, 2006; D'AZEVEDO, 2004; FREITAS, 2003; PERILLI, 2002).

Com relação ao desempenho dos testes fenotípicos confirmatórios, em 67,8% (61/90) das amostras selecionadas foi observado sinergismo entre o ácido clavulânico e pelo menos uma das cefalosporinas testadas nos dois métodos utilizados. Em estudos de outros países a prevalência de ESBLs pelos métodos fenotípicos varia entre 20 a 67% (AGRAWAL, 2008; WIEGAND, 2007; TOFTELAND, 2007; TASLI, 2005; MULVEY, 2004; JEONG, 2004; SANGUINETTI, 2003). No Brasil, FREITAS e cols. (2003) utilizando o método do duplo disco obtiveram 26% de

positividade avaliando amostras de *Klebsiella* spp. e *E. coli* previamente selecionadas como prováveis produtoras de ESBLs. Também pelo método do duplo disco, D'AZEVEDO e cols. (2004) relataram 67% de testes positivos, resultado bastante semelhante ao encontrado em nosso estudo. Já NOGUEIRA e cols. (2006) confirmaram a presença de ESBLs pelo método do disco combinado em 78% de isolados da família *Enterobacteriaceae* previamente resistentes às cefalosporinas de terceira geração e ao aztreonam. A prevalência de confirmação da produção de ESBLs por métodos fenotípicos pode apresentar algumas variações dependendo do método fenotípico utilizado. Além disso, a sensibilidade de cada método depende do número e do tipo de antimicrobiano utilizado como será discutido a seguir.

Em uma comparação entre os dois métodos fenotípicos utilizados, o teste sinérgico do duplo disco confirmou 63,3% dos isolados (n = 57) e o teste do disco combinado, 61,1% (n = 55) dos microrganismos previamente selecionados como produtores de ESBLs. Embora os resultados referentes a detecção de ESBLs pelos dois métodos fenotípicos tenham apresentado resultados semelhantes (61,1 e 63,3%) em 16 amostras ocorreram resultados discordantes. Estas amostras tiveram seus testes repetidos e confirmaram seus resultados, fato que evidenciou algumas diferenças entre as duas metodologias. A variação no desempenho de acordo com a distância entre os discos no método do duplo disco pode ter contribuído para essa discordância (TOFTELAND, 2007, PATERSON, 2005). Além disso, o desempenho individual diferenciado de cada substrato faz com que um mesmo antimicrobiano às vezes demonstre resultado diferente nos dois métodos (TOFTELAND, 2007; PITOUT, 2004).

Na avaliação do desempenho individual de cada um dos três substratos utilizados nos testes fenotípicos houve diferenças significativas em termos de sensibilidade. Pelo método do duplo disco, ceftazidima e cefotaxima permitiram ótimos índices de detecção de ESBLs e cefpodoxima apresentou rendimento inferior. Já no método do disco combinado, ceftazidima evidenciou menor rendimento e cefpodoxima e cefotaxima constituíram-se em melhores substratos. Com base no método do disco combinado, alguns estudos confirmam o baixo desempenho da ceftazidima principalmente na presença de ESBLs do tipo CTX-M (TOFTELAND, 2007; TRUPPIA, 2005; PITOUT, 2004). No Brasil, NOGUEIRA e cols. (2006), comparando substratos para a detecção de ESBLs, relataram melhor desempenho da cefotaxima e menor eficiência da cefpodoxima e ceftazidima. Com

relação aos estudos que utilizaram o método do duplo disco, TRUPPIA e cols. (2005) e D'AZEVEDO e cols. (2004) relataram melhor desempenho da cefotaxima em comparação com a ceftazidima. Provavelmente, o desempenho inferior da cefpodoxima pelo método do duplo disco se deve a diferença da distância entre os discos (que ainda não está definida e para esse substrato parece ser menor) fato que não ocorre com o disco combinado onde este substrato apresenta melhor desempenho.

Na detecção de ESBLs por métodos fenotípicos, a utilização de dois ou mais dos substratos recomendados aumenta significativamente a sensibilidade de detecção (CLSI, 2009; TOFTELAND, 2007; PITOUT; 2004; SANGUINETTI, 2003; WINOKUR, 2001; CARTER, 2000). Entretanto, a utilização de um maior número de substratos é mais onerosa e trabalhosa, principalmente para os laboratórios que não utilizam metodologias automatizadas. Por isso, a escolha do substrato a ser utilizado é muito importante devido ao desempenho individual diferenciado de cada substrato em cada um dos dois métodos testados.

A prevalência de isolados com testes confirmatórios negativos para ESBLs após uma triagem inicial positiva é comum em diversos estudos (AGRAWAL, 2008; BELL, 2007; WIEGAND, 2007; NOGUEIRA, 2006; TASLI, 2005; JEONG, 2004; FREITAS, 2003). Em nosso estudo, considerando os dois testes fenotípicos, esta prevalência foi de 32,2% (29/90). Em um estudo realizado com amostras coletadas entre 1998 e 2004 na região da Ásia e Oceania, esta condição (falha na demonstração da ação inibitória do ácido clavulânico) foi observada em 33,3% dos isolados de *E. coli* e 15,2% dos isolados de *K. pneumoniae* (BELL, 2007). Com relação a estas espécies, encontramos relação semelhante: 50% (11/22) de testes confirmatórios negativos para *E. coli* e 25% (16/64) para *K. pneumoniae*. Interessantemente, BELL e cols. (2007) pesquisaram a presença de outros mecanismos de resistência e encontraram 62% das *E. coli* e 75% das *K. pneumoniae* armazenando enzimas do tipo AmpC. A presença de enzimas do tipo AmpC é a principal justificativa para microrganismos que têm testes de triagem positivo para ESBLs e posteriormente apresentam testes confirmatórios negativos (BELL, 2007).

Quando se avaliou a susceptibilidade a cefoxitina, entre 39 amostras testadas, 19 foram sensíveis, 16 resistentes e 4 foram consideradas intermediárias. Na detecção molecular dos genes codificadores das enzimas ESBL, a técnica de

PCR revelou genes de pelo menos uma das três famílias de ESBLs pesquisadas em 15 dos 16 isolados resistentes a cefoxitina. Tal achado é importante porque a resistência a cefoxitina foi correlacionada com a possível presença de outros mecanismos de resistência que podem prejudicar a detecção de ESBLs pelos métodos fenotípicos (STEWART, 2001). Por outro lado, assim como relatado por D'AZEVEDO e cols. (2004), nosso estudo também encontrou mais isolados sensíveis do que resistentes a cefoxitina, confirmando a necessidade de melhores resultados para que o teste de susceptibilidade a cefoxitina seja considerado útil em isolados negativos nos testes fenotípicos confirmatórios para ESBLs.

Os genes codificadores de ESBLs do tipo TEM foram detectados em 82,2% (n = 74) das amostras, os do tipo SHV em 67,8% (n = 61) e do tipo CTX-M, em 21,1% (n = 19). Em concordância com outros estudos (LUZZARO, 2006; MULVEY, 2004; SANGUINETTI, 2003; SPANU, 2002; PERILLI, 2002), a grande maioria dos nossos isolados evidenciou genes codificadores para os tipos TEM e SHV de ESBLs. A frequência dos genes dos tipos TEM, SHV e CTX-M foi bastante similar a reportada por MULVEY e cols. (2004) em estudo semelhante realizado em amostras de *E. coli* e *Klebsiella* spp. no Canadá: respectivamente, 77, 67,5 e 28%.

Entre as espécies estudadas, *K. pneumoniae* foi a que evidenciou os maiores percentuais dos genes TEM (89,1%) e SHV (79,7%) enquanto que em *K. oxytoca* o gene CTX-M foi detectado em 50% das cepas. A alta prevalência de ESBLs do tipo CTX-M em *E. coli* relatada em estudos internacionais mais recentes (GOYAL, 2009; GALAS, 2008; FANG, 2008; TOFTELAND, 2007), não foi constatada neste estudo: apenas um isolado de *E. coli* evidenciou ESBL do tipo CTX-M. GALAS e cols. (2008) consideraram *E. coli* armazenando ESBL do tipo CTX-M como a enterobactéria produtora de ESBL mais frequentemente encontrada na França.

De uma maneira geral, a maior prevalência de *K. pneumoniae* armazenando principalmente ESBLs do tipo SHV observada neste trabalho leva a conclusão de que o HUSM ainda está em um estágio anterior na evolução mundial de ESBLs. A explosão de ESBLs do tipo CTX-M, principalmente em *E. coli*, relatada nos estudos mais recentes (GOYAL, 2009; GALAS, 2008; FANG, 2008; TOFTELAND, 2007) não foi verificada nos isolados coletados no HUSM.

Quanto a presença de mais de um tipo de ESBL em uma mesma amostra, 39 (43,3%) isolados possuíam genes dos tipos TEM e SHV, 3 (3,3%) possuíam genes dos tipos TEM e CTX-M, e em apenas 1 (1,1%) isolado detectou-se a combinação

dos genes SHV e CTX-M. Em 12 (13,3%) isolados foram detectados genes codificadores para os três tipos de ESBLs, proporção similar a encontrada por GOYAL e cols. (2009). A ocorrência de mais de um tipo de ESBL em um mesmo isolado é bastante comum, sendo a associação mais frequente a dos tipos TEM e SHV (LUZZARO, 2006; TASLI, 2005; MULVEY, 2004; JEONG, 2004; SANGUINETTI, 2003; PERILLI, 2002; SPANU, 2002). Em *E. coli* e *K. pneumoniae* JEONG e cols. (2004) encontraram 25 (4,9%) isolados produzindo essa combinação de ESBLs e SANGUINETTI e cols. (2003) reportaram 28 (5,5%), em espécies da família *Enterobacteriaceae*.

A correlação entre a confirmação da presença de ESBLs pelos métodos fenotípicos e a presença de diferentes famílias dessas enzimas determinada pela PCR possui algumas particularidades. Alguns mecanismos têm sido descritos no sentido de explicar alguns resultados negativos dos testes fenotípicos principalmente em isolados de *E. coli* que possuem apenas genes para a família TEM. Estes mecanismos incluem hiperprodução de TEM-1, modificação de proteínas da membrana externa e a presença de β -lactamases do tipo TEM resistentes aos inibidores (CHAIBI, 1999). Neste estudo os métodos fenotípicos constataram que 67,8% dos isolados eram produtores de ESBLs, entretanto, pelo método molecular (PCR) este percentual foi de 93,3%; a comparação entre os métodos revelou pelo Teste para Proporções Populacionais p diferenças significativas ($p < 0,0001$). Por outro lado, empregando-se o teste do Qui-quadrado de Independência, demonstrou-se que as ESBLs dos tipos TEM e SHV (detecção molecular) estão associadas aos testes fenotípicos positivos ($p < 0,05$). Contudo, ao analisarmos esses resultados devemos também levar em conta a presença das β -lactamases TEM-1, TEM-2 e SHV-1, que não são ESBLs, mas são detectadas pelos primers utilizados neste estudo. Além disso, a presença de mecanismos adicionais de resistência, como enzimas do tipo AmpC (TOFTELAND, 2007; PATERSON, 2005; PERILLI, 2002), mudanças nos poros e β -lactamases do tipo TEM e SHV com reduzida afinidade aos inibidores de β -lactamases podem mascarar a inibição do ácido clavulânico resultando em resultados falsos negativos (STEWART, 2001).

Ainda correlacionando os resultados dos testes fenotípicos e moleculares, entre as 19 amostras CTX-M positivas, 14 apresentaram maior nível de resistência (menor halo) a cefotaxima do que a ceftazidima. Este achado confirma a proposição de que a elevada resistência a cefotaxima e a menor resistência a ceftazidima estão

associadas a presença de ESBLs do tipo CTX-M (PITOUT, 2004; RODRIGUEZ-BAÑO, 2004; BONNET, 2004).

6 – CONCLUSÕES

- Os genes codificadores para as famílias TEM, SHV e CTX-M de ESBLs estão presentes entre as espécies de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. isoladas do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).
- A correlação entre a confirmação da presença de ESBLs pelos métodos fenotípicos e a presença de genes codificadores para as famílias de ESBLs determinada pela PCR revela maior sensibilidade e menor especificidade do método molecular e algumas limitações dos métodos fenotípicos.
- A presença de resultados negativos para a confirmação de ESBLs após teste de triagem positivo é fator importante na detecção de ESBLs pelos métodos do duplo disco e do disco combinado.
- A comparação dos resultados entre os dois métodos fenotípicos utilizados para detecção de ESBLs mostra desempenho geral similar, embora com alguns resultados divergentes decorrentes das limitações de cada teste.
- Na detecção de ESBLs pelos métodos fenotípicos, ceftazidima e cefotaxima foram igualmente os melhores substratos pelo método do duplo disco e cefpodoxime, pelo método do disco combinado.
- A falha na detecção de ESBLs pelos métodos fenotípicos está relacionada com a resistência à cefoxitina em aproximadamente metade dos isolados clínicos deste estudo.
- No HUSM, a principal espécie produtora de ESBL entre as amostras selecionadas é *Klebsiella pneumoniae*.
- A principal família de ESBL entre as amostras selecionadas é a TEM.

7 – REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P.; GHOSH, A. N.; KUMAR, S.; BASU, B.; KAPILA, K. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary care hospital. **Indian Journal of Pathology and Microbiology** v. 51, n. 1, p. 139-142, 2008.
- AMBLER, R. P.; COULSON, A. F. W.; FRÈRE, J. M.; GHUYSEN, J. M.; JORIS, B.; FORSMAN, M.; LEVESQUE, R. C.; TIRABY, G.; WALEY, S. G. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. **Biochemical Journal** v. 276, p. 269–270, 1991.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Uso racional de antimicrobianos para prescritores ATMracional**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/inicio.htm>. Acesso em: 16/07/2009.
- ARDANUY, C.; LIÑARES, J.; DOMINGUEZ, M. A.; HERNÁNDEZ-ALLÉZ, S.; BENEDI, V. J.; MARTINEZ-MARTINEZ, L. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 42, n. 7, p. 1636–1640, 1998.
- BABINI, G. S.; LIVERMORE, D. M. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997–1998. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 45, n. 2, p. 183–189, 2000a.
- BABINI, G. S.; LIVERMORE, D. M. Are SHV beta-lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 44, n.6, p. 2230, 2000b.
- BELL, J. M.; TURNIDGE, J. D.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–99). **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases** v. 42, n. 3, p. 193–198, 2002.
- BELL, J. M.; CHITSAZ, M.; TURNIDGE, J. D.; BARTON, M.; WALTERS, L. J.; JONES, R. N. Prevalence and significance of a negative extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) confirmation test result after a positive ESBL screening test result for isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: results from the SENTRY Asia-Pacific Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology** v. 45, n. 5, p. 1478-1482, 2007.
- BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004.
- BONNET, R.; SAMPAIO, J. L. M.; LABIA, R.; CHAMPS, C. D.; SIROT, D.; CHANEL, C.; SIROT, J. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 44, n.7, p. 1936–1942, 2000.

BONNET, R.; DOTOUR, C.; SAMPAIO, J. L. M.; CHANAL, C.; SIROT, D.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, J. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240–Gly. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 45, n. 8, p. 2269–2275, 2001.

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

BRADFORD, P. A. Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of *bla*SHV genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 43, n. 12, p. 2960–2963, 1999.

BRADFORD, P. A.; YANG, Y.; SAHM, D.; GROPE, I.; GARDOVSKA, D.; STORCH, G. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 42, n. 8, p. 1980–1984, 1997.

BUSH, K.; SYKES, R. B. Methodology for the study of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 30, n. 1, p. 6–10, 1986.

BUSH, K. Characterization of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 33, n. 3, p. 259–263, 1989.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995.

CARTER, M. W.; OAKTON, K. J.; WARNER, M.; LIVERMORE, D. M. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiellae* with the Oxoid Combination Disk Method. **Journal of Clinical Microbiology** v. 38, n. 11, p. 4228–4232, 2000.

CASEWELL, M. W.; PHILLIPS, I. Aspects of the plasmid-mediated antibiotic resistance and epidemiology of *Klebsiella* species. **The American Journal of Medicine** v. 70, n. 2, p. 459–462, 1981.

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS). Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/nnis_pubs.html>. Acesso em: 16/07/2009.

CHAIBI, E. B.; SIROT, D.; PAUL, G.; LABIA, R. Inhibitor-Resistant TEM β -lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 43, p. 447–458, 1999.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE, Wayne, PA. CLSI document. **Clinical and Laboratory Standard Methods**. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement M100-S19, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE, Wayne, PA. CLSI document. **Clinical and Laboratory Standard Methods**. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement M100-S17, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE, Wayne, PA. CLSI document. **Clinical and Laboratory Standard Methods**. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition M2-A9, 2006.

COQUE, T. M.; OLIVER, A.; PEREZ-DIAZ, J. C.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 46, n. 2, p. 500–510, 2002.

COUDRON, P. E.; MOLAND, E. S.; THOMSON, K. S. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. **Journal of Clinical Microbiology** v. 38, n. 5, p. 1791–1796, 2000.

DALMARCO, E. M.; BLATT, S. L.; CÓRDOVA, C. M. M. Identificação laboratorial de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) – Revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas** v. 38, n. 3, p. 171-177, 2006.

D'AZEVEDO, P. A.; GONÇALVES, A. L.; MUSSKOPF, M. I.; RAMOS, C. G., DIAS, C. A. Laboratory tests in the detection of extended spectrum beta-lactamase production: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) screening test, the E-test, the double disk confirmatory test, and cefoxitin susceptibility testing. **Brazilian Journal of Infectious Diseases** v. 8, n. 5, p. 372-377, 2004.

DROPA, M.; BALSALOBRE, L. C.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; MURAKAMI, T.; CASSETTARI, V. C.; FRANCO, F.; GUIDA, S. M.; BALABAKIS, A. J.; PASSADORE, L. F.; SANTOS, S. R.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** v. 51, N.4, p. 203-209, 2009.

FANG, H.; ATAKER, F.; HEDIN, G.; DORNBUSCH, K. Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamases among *Escherichia coli* Isolates Collected in a Swedish Hospital and Its Associated Health Care Facilities from 2001 to 2006. **Journal of Clinical Microbiology** v. 46, n. 2, p. 707-712, 2008.

FREITAS, A. L. P.; MACHADO, D. P.; SOARES, F. da S. C.; BARTH, A. L. Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella* spp and *Escherichia coli* obtained in a brazilian teaching hospital: detection, prevalence and molecular typing. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 34, n. 4, p. 344-348, 2003.

GALAS, M.; DECOUSSER, J.; BRETON, N.; GODARD, T.; ALLOUCH, P. Y.; PINA, P.; Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (ColBVH) Study Group. Nationwide

Study of the Prevalence, Characteristics, and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 52, n. 2, p. 786-789, 2008.

GNIADKOWSKI, M.; SCHNEIDER, I.; PALUCHA, A.; JUNGWIRTH, R.; MIKIEWICZ, B.; BAUERNFEIND, A. Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 42, n. 4, p. 827–832, 1998.

GOYAL, A.; PRASAD, K. N.; PRASAD, A.; GUPTA, S.; GHOSHAL, U.; AYYAGARI, A. Extended spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* & associated risk factors. **The Indian Journal of Medical Research** v. 129, p. 695-700, 2009.

HANBERGER, H.; GARCIA-RODRIGUEZ, J. A.; GOBERNADO, M.; GOOSSENS, H.; NILSSON, L. E.; STRUELENS, M. J. Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. French and Portuguese ICU Study Groups. **Journal of American Medical Association** v. 281: 67–71, 1999.

HULETSKY, A.; KNOXLL, J. R.; LEVESQUE, R. C. Role of Ser-238 and Lys-240 in the Hydrolysis of Third-generation Cephalosporins by SHV-type β -Lactamases Probed by Site-directed Mutagenesis and Three-dimensional Modeling. **The Journal of Biological Chemistry** v. 268, n. 5, p. 3690-3697, 1993.

HUMENIUK, C.; ARLET, G.; GAUTIER, V.; GRIMONT, P.; LABIA, R.; PHILIPPON, A. β -Lactamases of *Kluyvera ascorbata*, Probable Progenitors of Some Plasmid-Encoded CTX-M Types. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 46, n. 9, p. 3045–3049, 2002.

JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. More extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 35, n. 9, p. 1697–1704, 1991a.

JACOBY, G. A.; SUTTON, L. Properties of Plasmids Responsible for Production of Extended-Spectrum β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 35, n. 1, p. 164-169, 1991b.

JARLIER, V. ; NICOLAS, M. H. ; FOURNIER, G. ; PHILIPPON, A. 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, n. 4, 867-878, 1988.

JEONG, S. H.; BAE, I. K.; LEE, J. H.; SOHN, S. G.; KANG, G. H.; JEON, G. J.; KIM, Y. H.; JEONG, B. C.; LEE, S. H. Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamases Produced by Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean Nationwide Survey. **Journal of Clinical Microbiology** v. 42, n. 7, p. 2902-2906, 2004.

- KARIUKI, S.; CORKILL, J. E.; REVATHI, G.; MUSOKE, R.; HART, C. A. Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 45, n. 7, p. 2141–2143, 2001.
- KHANFAR, H. S.; BINDAYNA, K. M.; SENOK, A. C.; BOTTA, G. A. Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: trends in the hospital and community settings **Journal of Infection in Developing Countries** v. 3, n. 4, p. 295-299, 2009.
- KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRCHERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofur, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection** v. 11, n. 6, p. 315-317, 1983.
- KNOX, J. R. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 39, n. 12, p. 2593-2601, 1995.
- KLIEBE, C.; NIES, B. A.; MEYER, J. F.; TOLXDORFF-NEUTZLING, R. M.; WIEDEMANN, B. Evolution of Plasmid-Coded Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 28, n. 2, p. 302-307, 1985.
- LAUTENBACH, E.; PATEL, J. B.; BILKER, W. B.; EDELSTEIN, P. H.; FISHMAN, N. O. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. **Clinical Infectious Diseases** v. 32, n. 8, p. 1162-1171, 2001.
- LIVERMORE, D. M.; OAKTON, K. J.; CARTER, M. W.; WARNER, M. Activity of ertapenem (MK-0826) versus *Enterobacteriaceae* with potent β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 45, n. 10, p. 2831-2837, 2001.
- LIVERMORE, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews** v. 8, n. 4, p. 557–584, 1995.
- LIVERMORE, D. M.; CANTON, R.; GNIADKOWSKI, M.; NORDMANN, P.; ROSSOLINI, G. M.; ARLET, G.; AYALA, J.; COQUE, T. M.; KERN-ZDANOWICZ, I.; LUZZARO, F.; POIREL, L.; WOODFORD, N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 59, n. 2, p. 165–174, 2007.
- LUZZARO, F.; MEZZATESTA, M.; MUGNAIOLI, C.; PERILLI, M.; STEFANI, S.; AMICOSANTE, G.; ROSSOLINI, G. M.; TONIOLO, A. Trends in Production of Extended-Spectrum β -Lactamases Among Enterobacteria of Medical Interest: Report of the Second Italian Nationwide Survey. **Journal of Clinical Microbiology** v. 44, n. 5, p. 1659-1664, 2006.
- MACKENZIE, F. M.; MILLER, C. A.; GOULD, I. M. Comparison of screening methods for TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamase detection. **Clinical Microbiology and Infection** v. 8, n. 11, p. 715–724, 2002.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; HERNÁNDEZ- ALLÉS, S.; ALBERTI, S.; TOMÁS, J.; BENEDI, V.; JACOBY, G. *In vivo* selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 40, n. 2, p. 342–348, 1996.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A.; HERNÁNDEZ- ALLÉS, S.; ALVAREZ-DÍAZ, D.; SUÁREZ, A. I.; TRAN, J.; BENEDÍ, V. J.; JACOBY, G. A. Roles of β -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 43, n. 7, p. 1669–1673, 1999.

MEDEIROS, A. A.; CRELLIN, J. Comparative susceptibility of clinical isolates producing extended-spectrum beta-lactamases to ceftibuten: effect of a large inoculum. **The Pediatric Infectious Diseases Journal** v. 16, n. 3, p. 49–55, 1997.

MENA, A.; PLASMENCIA, V.; GARCÍA, L.; HIDALGO, O.; AYESTARÁN, J. I.; ALBERTI, S.; BORRELL, N.; PÉREZ, J. L.; OLIVER, A. Characterization of a Large Outbreak by CTX-M-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* and Mechanisms Leading to In Vivo Carbapenem Resistance Development. **Journal of Clinical Microbiology** v. 44, n. 8, p. 2831–2837, 2006.

MENEZES, E. A.; ALVES, E. G. B.; CUNHA, F. A.; ÂNGELO, M. R. F.; SALVIANO, M. N. C.; OLIVEIRA, I. R. N. Avaliação do ertapenem frente a bacilos gram negativos produtores de enzima beta lactamase de espectro expandido (ESBL). **Revista Brasileira de Análises Clínicas** v. 39, n. 3, p. 189-191, 2007a.

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

MOLAND, E. S.; BLACK, J. A.; OURADA, J.; REISBIG, M. D.; HANSON, N. D.; THOMSON, K. S. Occurrence of newer beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 U.S. hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 46, n. 12, p. 3837–3842, 2002.

MOLAND, E. S. ; HONG, S. G.; THOMSON, K. S.; LARONE, D. H.; HANSON, N. D. *Klebsiella pneumoniae* isolate producing at least eight different beta-lactamases, including AmpC and KPC beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 51, n. 2, p. 800-801, 2007.

MORAES, A. B.; JACOBI, L. F.; ZANINI, R. R. **Estatística: caderno didático**. Departamento de Estatística, CCNE, UFSM, 56 p., 2008.

MUGNAIOLI, C.; LUZZARO, F.; DE LUCA, F.; BRIGANTE, G.; AMICOSANTE, G.; ROSSOLINI, G. M. Dissemination of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamase Genes to Unusual Hosts. **Journal of Clinical Microbiology** v. 43, n. 8, p. 4183–4185, 2005.

MUGNAIOLI, C.; LUZZARO, F.; DE LUCA, F.; BRIGANTE, G.; PERILLI, M.; AMICOSANTE, G.; STEFANI, S.; TONIOLO, A.; ROSSOLINI, G. M. CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 50, n. 8, p. 2700–2706, 2006.

MULVEY, M. R.; BRYCE, E.; BOYD, D.; OFNER-AGOSTINI, M.; CHRISTIANSON, S.; SIMOR, A. E.; PATON, S.; The Canadian Hospital Epidemiology Committee of the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, Health Canada. Ambler Class A Extended-Spectrum β -Lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 48, n. 4, p. 1204-1214, 2004.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. **American Journal of Infection Control** 32: 470-85, 2004.

NOGUEIRA, K. da S.; HIGUTI, I. H.; DO NASCIMENTO, A. J.; TERASAWA, L. B.; DE OLIVEIRA, S.; MATOS, A. P.; DE SOUZA, H. A. P. H. de M.; COGO, L. L.; COSTA, L. M. D. Occurrence of Extended-Spectrum β -Lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases** v. 10, n. 6, p. 390-395, 2006.

NORRBY, S. R.; NORD, C. E.; FINCH, R.; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. **Lancet Infectious Diseases** v. 5, n. 2, p. 115-119, 2005.

OLIVER, A.; WEIGEL, L. M. RASHEED, J. K.; MCGOWAN JR, J. E.; RANEY, P.; TENOVER, F. C. Mechanisms of decreased susceptibility to cefpodoxime in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 46, n. 12, p. 3829–3836, 2001.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S. I. **Procedimentos básicos em Microbiologia Clínica**, 2ª Ed. Sarvier, São Paulo, 2004.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. **Infecção hospitalar** 15/08/2000. Disponível em: < <http://www.opas.org.br/sistema/fotos/hospitala1.PDF>>. Acesso em: 15/07/2009.

PAGANI, L.; DELL'AMICO, E.; MIGLIAVACCA, R.; D'ANDREA, M. M.; GIACOBONE, E.; AMICOSANTE, G.; ROMERO, E.; ROSSOLINI, G. M. Multiple CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy. **Journal of Clinical Microbiology** v. 41, n. 9, p. 4264–4269, 2003.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews** v. 18, n. 4, p. 657–686, 2005.

PATERSON, D. L. Recommendation for treatment of severe infections caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). **Clinical Microbiology and Infectious Diseases** v. 6, p. 460-463, 2000.

PATERSON, D. L.; YU, V. L. Extended-spectrum beta-lactamases: a call for improved detection and control. **Clinical Infectious Diseases** v. 29, n. 6, p. 1419–1422, 1999.

PEREZ, F.; ENDIMIANI, A.; HUJER, K. M.; BONOMO, R. A. The continuing challenge of ESBLs. **Current Opinion in Pharmacology** v. 7, n. 5, p. 459-469, 2007.

PERILLI, M.; FELICI, A.; FRANCHESCHINI, N.; SANTIS, A. D. PAGANI, L.; LUZZARO, F. ORATORE, A.; ROSSOLINI, G. M. KNOX, J. R.; AMICOSANTE, G. Characterization of a new TEM-derived β -lactamase produced in a *Serratia marcescens* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 41, n. 11, p. 2374–2382, 1997.

PERILLI, M.; DELL'AMICO, E.; SEGATORE, B.; DE MASSIS, M. R.; BIANCHI, C.; LUZZARO, F.; ROSSOLINI, G. M.; TONIOLO, A.; NICOLETTI, G.; AMICOSANTE, G. Molecular characterization of Extended-Spectrum β -Lactamases produced by nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from an Italian nationwide survey. **Journal of Clinical Microbiology** v. 40, n. 2, p. 611-614, 2002.

PFALLER, M. A.; SEGRETI, J.; Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum β -lactamases. **Clinical Infectious diseases** v. 42, n. 4, p. 153-163, 2006.

PHILIPPON, A.; LABIA, R.; JACOBY, G. Extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 33, n. 8, p. 1131–1136, 1989.

PITOUT, J. D. D.; CHURCH, D. L.; GREGSON, D. B.; CHOW, B. L.; MCCRACKEN, M.; MULVEY, M. R.; LAUPLAND, K. B. Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the Calgary health region: emergence of CTX-M-15-producing isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 51, n. 4, p. 1281-1286, 2007.

PITOUT, J. D.; HOSSAIN, A.; HANSON, N. D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Journal of Clinical Microbiology** v. 42, n. 12, p. 5715–5721, 2004.

PITTET, D.; TARAARA, D.; WENZEL, R. P. Nosocomial bloodstream infections in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. **Journal of the American Medical Association** v. 271, n. 20, p. 1598–1601, 1994.

POIREL, L.; GNIADKOWSKI, M.; NORDMANN, P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase CTX-M-3. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 50, p. 1031–1034, 2002.

QUEENAN, A. M.; FOLENO, B.; GOWNLEY, C.; WIRA, E.; BUSH, K. 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 National Committee for Clinical Laboratory Standards ESBL methodology. **Journal of Clinical Microbiology** v. 42, n. 1, p. 269–275, 2004.

RADICE, M.; POWER, P.; DI CONZA, J.; GUTKIND, G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 46, n. 2, p. 602–604, 2002.

RASHEED, J. K.; ANDERSON, G. J.; YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; SWENSON, J. M.; BIDDLE, J. W.; FERRARO, M. J.; JACOBY, G. A.; TENOVER, F. C. Characterization of the extended-spectrum beta-lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 44, n. 9, p. 2382–2388, 2000.

RASHEED, J. K.; JAY, C.; METCHOCK, B.; BERKOWITZ, F.; WEIGEL, L.; CRELLIN, J.; STEWARD, C.; HILL, B.; MEDEIROS, A. A.; TENOVER, F. C. Evolution of extended-spectrum β -lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 41, n. 3, p. 647–653, 1997.

RICE, L. B.; CARIAS, L. L.; HUJER, A. M.; BONAFEDE, M.; HUTTON, R.; HOYEN, C.; BONOMO, R. A. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 β -Lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 44, n. 2, p. 362–367, 2000.

RODRIGUEZ-BAÑO, J.; NAVARRO, M. D.; ROMERO, L.; MARTINEZ-MARTÍNEZ, L.; MUNIAIN, M. A.; PEREA, E. J.; PÉREZ-CANO, R.; PASCUAL, A. Epidemiology and clinical features of infections caused by Extended-Spectrum β -Lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. **Journal of Clinical Microbiology** v. 42, n. 3, p. 1089–1094, 2004.

SABATÉ, M.; TARRAGÓ, R.; NAVARRO, F.; MIRO, E.; VERGÉS, C.; BARBÉ, J.; PRATS, G. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing β -Lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 44, n. 7, p. 1970–1973, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Preparation of buffers and stock solutions for use in molecular biology – pH buffers. In: Sambrook, J.; Russel, D. W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. Volume 3. Appendix 1. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001a.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Agarose gel electrophoresis. In: Sambrook, J.; Russel, D. W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. Volume 1. Chapter 5. Protocol 1. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001b.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Preparation of reagents and buffers used in molecular cloning – gel loading buffers. In: Sambrook, J.; Russel, D. W. **Molecular**

Cloning: a Laboratory Manual. Volume 3. Appendix 1. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001c.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; SPANU, T.; CICCAGLIONE, D.; ROMANO, L.; FIORI, B.; NICOLETTI, G.; ZANETTI, S.; FADDA, G. Characterization of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD Phoenix Extended-Spectrum β -Lactamase detection method. **Journal of Clinical Microbiology** v. 41, n. 4, p. 1463-1468, 2003.

SANTOS, D. F.; PIMENTA, F. C.; ALVES, R.; MONTALVÃO, E. R.; DOS SANTOS, D. B.; DO CARMO FILHO, J. R. Extended-Spectrum β -Lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in two hospitals in Goiânia/Brazil: detection, prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 39, n. 4, p. 608-612, 2008.

SILVA, N.; OLIVEIRA, M.; BANDEIRA, A. C.; BRITES, C. Risk factors for infection by extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Salvador, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases** v. 10, n. 3, p. 191-193, 2006.

SPANU, T.; LUZZARO, F.; PERILLI, M.; AMICOSANTE, G.; TONIOLO, A.; FADDA, G.; The Italian ESBL Study Group. Occurrence of Extended-Spectrum β -Lactamases in Italy: implications for resistance to β -lactams and other antimicrobial drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 46, n. 1, p. 196-202, 2002.

SPEERS, D. J. Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. **The Clinical Biochemist Reviews** v. 27, n. 1, p. 39-51, 2006.

SPELLBERG, B.; POWERS, J. H.; BRASS, E. P.; MILLER, L. G.; EDWARDS JR., J. E. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. **Clinical Infectious Diseases** v. 38, n. 9, p. 1279-1286, 2004.

STEWARD, C. D., RASHEED, J. K.; HUBERT, S. K.; BIDLLE, J. W.; RANEY, P. M.; ANDERSON, G. J.; WILLIAMS, P. P.; BRITAIN, K. L.; OLIVER, A.; MCGOWAN JR, J. E.; TENOVER, F. C. 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, n. 8, p. 2864-2872, 2001.

STEWARD, C. D.; WALLACE, D.; HUBERT, S. K.; LAWTON, R.; FRIDKIN, S. K.; GAYNES, R. P.; MCGOWAN JR, J. E.; TENOVER, F. C. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: a survey of project ICARE laboratories. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases** v. 38, n. 1, p. 59-67, 2000.

SUTCLIFFE, J. G. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 75, n. 8, p. 3737-3741, 1978.

TASLI, H.; BAHAR, H. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived Extended-Spectrum β -Lactamases in hospital-based *Enterobacteriaceae* in Turkey. **Japanese Journal of Infectious Diseases** v. 58, n. 3, p. 162-167, 2005.

TENOVER, F. C.; RANEY, P. M.; WILLIAMS, P. P.; RASHEED, J. K.; BIDLLE, J. W.; OLIVER, A.; FRIDKIN, S. K.; JEVITT, L.; MCGOWAN JR, J. E. Evaluation of the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum beta-lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during Project ICARE. **Journal of Clinical Microbiology** v. 41, n. 7, p. 3142–3146, 2003.

THOMSON, K. S.; SANDERS, C. C. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 36, n. 11, p. 1877–1882, 1992.

TOFTELAND, S.; HALDORSEN, B.; DAHL, K. H.; SIMONSEN, G. S.; STEINBAKK, M.; WALSH, T. R.; SUNDSFJORD, A.; Norwegian ESBL Study Group. Effects of phenotype and genotype on methods for detection of Extended-Spectrum β -Lactamases-Producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. **Journal of Clinical Microbiology** v. 45, n. 1, p. 199-205, 2007.

TRUPPIA, L. A.; MOLLERACH, A.; DI CONZA, J. A.; RADICE, M.; MUNGA, V.; MÉNDEZ, E.; GUTKIND, G. O. Comparación de tres métodos microbiológicos para la detección de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas en Santa Fe (Argentina). **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica** v. 23, n. 9, p. 525-528, 2005.

TUMBARELLO, M.; SPANU, T.; SANGUINETTI, M.; CITTON, R.; MONTUORI, E.; LEONE, F.; FADDA, G.; CAUDA, R. Bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology, and clinical outcome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 50, n. 2, p. 498–504, 2006.

TZOUVELEKIS, L. S.; TZELEPI, E.; TASSIOS, P. T.; LEGAKIS, N. J. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 14, n. 2, p. 137-142, 2000.

TZOUVELEKIS, L. S.; BONOMO, R. A. SHV-type beta-lactamases. **Current Pharmaceutical Design** v. 5, n. 11, p. 847-864, 1999a.

TZOUVELEKIS, L. S.; VATOPOULUS, A. C.; KATSANIS, G. TZELEPI, E. Rare case of failure by an automated system to detect extended-spectrum beta-lactamase in a cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate. **Journal of Clinical Microbiology** v. 37, n. 7, p. 2388, 1999b.

VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P. E. W.; HERMANS, P. W. M. VAN EMBDEN, D. A. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods in Enzymology** v. 235, p. 196-204, 1994.

VAN SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W. M.; DE HAAS, P. E. W.; SOLL, D. R.; VAN EMBDEN, J. D. A. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology** v. 29, n. 11, p. 2578-2586, 1991.

WANG, H.; KELKAR, S.; WU, W.; CHEN, M.; QUINN, J. P. Clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing Extended-Spectrum β -Lactamases: prevalence of CTX-M-3 at a hospital in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 47, n. 2, p. 790–793, 2003.

WIEGAND, I.; GEISS, H. K.; MACK, D.; STÜRENBURG, E.; SEIFERTS, H. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases among *Enterobacteriaceae* by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. **Journal of Clinical Microbiology** v. 45, n. 4, p. 1167-1174, 2007.

WINOKUR, P. L.; CANTON, R.; CASELLAS, J. M.; LEGAKIS, N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. **Clinical Infectious Diseases** v. 32, Suppl. 2, p. 94–103, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention of Hospital-Acquired infections: a practical guide**. WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12 Disponível em: <www.who.int/csr/resources/publications/whocdscsreph200212.pdf>. Acesso em: 15/07/2009.

8 – ANEXO

8.1 – Artigo aceito pela Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical