

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós Graduação em Medicina – Ciências Médicas

β -lactamases na família *Enterobacteriaceae*:

Métodos de detecção e prevalência

Autora: Katia Ruschel Pilger de Oliveira

Orientador: Dr Afonso L. Barth

Dissertação de Mestrado

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. Afonso Luís Barth pela dedicação e paciência em todos os momentos de execução deste trabalho. Sempre disponível e acessível, me incentivando nos momentos mais difíceis ao longo de toda vida acadêmica.

Ao meu marido Alexandre Santos de Oliveira Pilger pelo amor, compreensão, incentivo e paciência em todos os momentos. Especialmente a minha filha Eduarda que em muitos momentos sentiu minha ausência. A minha mãe, minha irmã, meus sogros e demais familiares pelo auxílio nas horas difíceis.

À minha amiga Carolina S. Brochado pelo auxílio nas traduções. À minha amiga Denise Willers pelo auxílio e companheirismo.

Às bolsistas de iniciação científica Cristiane Maurer, Ana Carolina Lamaison e Caroline Raupp que auxiliaram na coleta de amostras e na execução de algumas técnicas do projeto.

Às colegas Alice Pinheiro Machado e Fernanda de Paris pelo auxílio na padronização das técnicas de PCR.

A todos os colegas da Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular pela amizade e colaboração quanto ao tempo disponível para assistir às aulas e a realização da pesquisa.

Dedicatória

Dedico esta conquista a meu marido Alexandre e a minha querida filha Eduarda pelo carinho, compreensão e incentivo.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATCC – *American Type Culture Collection*

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

ESBL – *Extended Spectrum β -Lactamase*

IEF - *Isoelectric Focusing*

KPC – *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

MYSTIC – *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SENTRY – Programa Internacional de Vigilância Antimicrobiana

SSCP – *Single Strand Conformational Polymorphism*

UTI – Unidade de Tratamento Intensivo

Lista de Tabelas

TABELA 1: Classificação das β -lactamases.....	20
TABELA 2: Halos de inibição sugestivos de ESBL para <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>K. oxytoca</i>	29
TABELA 3: Halos de inibição sugestivos de ESBL para <i>P. mirabilis</i>	29

Lista de Figuras

FIGURA 1: Detecção de ESBL usando discos combinados.....	31
FIGURA 2: Detecção de ESBL por aproximação de disco.....	33
FIGURA 3: Uso da fita de E-test® para detecção de ESBL.....	35
FIGURA 4: Detecção da CIM por E-test®.....	46
FIGURA 5: Teste de Hodge Modificado com imipenem.....	47

Sumário

RESUMO.....	08
INTRODUÇÃO.....	09
REVISÃO DA LITERATURA.....	12
1. Família <i>Enterobacteriaceae</i>	12
2. Mecanismos de Resistência.....	15
3. Mecanismos de Resistência Enzimáticos.....	17
3.1 β -lactamases.....	17
4. AmpC.....	21
5. ESBL.....	24
5.1 Prevalência de ESBL.....	25
5.2 Perfil de Suscetibilidade.....	26
5.3 Detecção Laboratorial de ESBL.....	27
5.3.1 Teste de Triagem para ESBL.....	28
5.3.2 Testes Confirmatórios Fenotípicos para ESBL.....	30
5.3.2.1 Discos Combinados.....	30
5.3.2.2 Teste de Aproximação de Disco.....	33
5.3.2.3 Testes que Determinam a CIM.....	34
5.3.3 Detecção de ESBL por Sistemas Automatizados.....	36
5.3.4 Técnicas Moleculares para Detecção de ESBL.....	39
6. KPC.....	43
OBJETIVOS.....	48
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	49
ARTIGO.....	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88

Resumo

Entre membros da Família *Enterobacteriaceae* a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL – Extended-Spectrum β -lactamase) se constitui em um importante mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de ESBL em diferentes gêneros da Família *Enterobacteriaceae* em um hospital universitário no sul do Brasil. Além disso, avaliou-se o teste de triagem proposto pelo CLSI, o teste que utiliza discos combinados e técnica de PCR para detecção de ESBL na Família *Enterobacteriaceae*. De forma complementar, foi feita pesquisa de KPC em amostras com resistência (plena ou intermediária) ao ertapenem. Foram analisados 731 isolados da Família *Enterobacteriaceae*, obtidos a partir de amostras clínicas de pacientes hospitalizados. A prevalência de isolados produtores de ESBL na Família *Enterobacteriaceae* foi de 26,8% (196/731). Destacam-se *Providencia* spp. com uma prevalência de 91,7% (11/12), seguida de *Klebsiella pneumoniae* com 56,7% (59/104) e *Enterobacter* spp. com 40,7% (48/118). Entre os antibióticos utilizados no Teste Confirmatório Fenotípico, a cefepima foi o substrato que detectou o maior percentual dos isolados (90,6% - 183/202) como produtores de ESBL. Utilizando a técnica de PCR foi possível detectar bla_{TEM} em 89,6% (208/232), bla_{SHV} em 59% (137/232) e bla_{CTX-M} em 37,9% (88/232) dos isolados. Comparando o perfil de suscetibilidade global das amostras ESBL com as demais amostras consideradas como não produtoras de ESBL, notou-se um grande decréscimo na sensibilidade de todos antimicrobianos testados ($p < 0,05$) nas ESBL positivas. Apenas os carbapenêmicos (Imipenem e Meropenem) apresentaram total eficácia *in vitro*. Outros antibióticos com maior percentual de sensibilidade para isolados produtores de ESBL foram Amicacina, Doxaciolina e Piperacilina/Tazobactam com 35,1%, 29,9% e 28,0% de sensibilidade, respectivamente. Entre os microrganismos com teste de triagem para ESBL positivo, 39 apresentaram resistência (plena ou intermediária) ao ertapenem, mas em nenhuma destas amostras foi detectado o gene bla_{KPC} por técnica de PCR.

Introdução

A Família *Enterobacteriaceae* é composta por mais de 30 gêneros e 130 espécies (26, 34) que podem ser responsáveis por qualquer tipo de doença infecciosa, sendo isolados de qualquer amostra clínica (34). Neste grupo, os gêneros mais frequentemente isolados de amostras biológicas são *Escherichia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella spp.*, *Providencia spp.*, *Shigella spp.* e *Salmonella spp.*

Entre membros da Família *Enterobacteriaceae* a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL – Extended-Spectrum β -lactamase) tem emergido como um importante mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos. Estas enzimas hidrolisam praticamente todos os β -lactâmicos, exceto carbapenens e cefamicinas (cefotaxima), são mediadas por genes plasmidiais não induzíveis e são inibidas por compostos como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (71).

As ESBL (Grupo 2be de Bush, Jacoby e Medeiros) são derivadas das enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 (Grupo 2b) que sofreram mutações pontuais, com a substituição de um a quatro aminoácidos acarretando a ampliação da atividade hidrolítica das enzimas originais (38, 61). Entre as enzimas ESBLs não derivadas de TEM e SHV, as enzimas CTX-M são as β -lactamases mais prevalentes (59), estas são mais ativas contra cefotaxima do que ceftazidima e aztreonam (9). Além dessas famílias de ESBL já bem estabelecidas (TEM, SHV e CTX-M), há outras enzimas que também possuem atividade de espectro-estendido sendo descritas (K1, BES-1, CME-1, GES-1, IBI-1, IBI-2, PER-1,

PER 2, VEB-1, SFO-1, derivadas OXA), porém estas são encontradas com menor frequência (59, 71).

A prevalência das enzimas ESBL, bem como as características fenotípicas dos isolados clínicos podem variar entre áreas geográficas (61, 70, 82). Ocorrem principalmente em *Klebsiella* spp. e *E. coli*, mas podem ser, também, produzidas por outros membros da Família *Enterobacteriaceae*, como *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Salmonella* spp., e *Serratia* spp. (11, 22, 25, 39, 44, 70, 82).

Os plasmídeos que possuem o gene que codifica para ESBL podem conter genes que codificam resistência a outros antimicrobianos como aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclina, quinolonas e cloranfenicol (47, 71).

Como Teste de Triagem para detecção de ESBL, o CLSI preconiza diminuição dos halos de inibição para determinados antibióticos (Aztreonam, Cefotaxima, Ceftriaxona, Cefpodoxima e Cefotaxima) para *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *P. mirabilis* (20). Neste caso, devem ser feitos testes complementares para confirmar se a bactéria é produtora de ESBL. Como testes confirmatórios podemos citar: discos combinados (padronizado pelo CLSI), aproximação de disco e diminuição da CIM (Microdiluição em Caldo e E-test®). Além disso, no Brasil, existem diferentes sistemas automatizados com capacidade de detectar ESBL em isolados bacterianos, os mais utilizados são Vitek 1® (bioMérieux), Vitek 2® (bioMérieux), BD Phoenix® (Becton Dickinson) e MicroScan WalkAway-96 SI System® (Dade Behring); a performance (sensibilidade e especificidade) destes sistemas varia de acordo com as espécies investigadas (86).

Os testes já citados para detecção de ESBL baseiam-se na detecção da presença da enzima através de suas características fenotípicas. Contudo, outros mecanismos de resistência aos β -lactâmicos podem estar presentes isoladamente ou juntamente com ESBL interferindo no resultado desses testes (23, 59). Os testes mais específicos para a detecção de ESBL incluem as técnicas que detectam os genes responsáveis pela produção da enzima, como o método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), bem como técnicas para detecção direta da enzima em extratos celulares através da eletroforese de ponto isoelétrico (Isoelectric Focusing - IEF) (23, 71).

Revisão da Literatura

1. Família Enterobacteriaceae:

Os bacilos Gram-Negativos pertencentes à Família *Enterobacteriaceae* são bactérias anaeróbias facultativas ou aeróbias, são catalase positiva e oxidase negativa (26). Caracterizam-se, do ponto de vista bioquímico, pela capacidade de reduzir nitratos a nitritos, fermentar a glicose com produção de ácido ou ácido e gás (26, 34).

Esses microrganismos estão distribuídos amplamente na natureza, sendo encontrados na água, solo, plantas e no trato intestinal de seres humanos e animais (26, 34). São os maiores componentes da flora normal do intestino, mas são relativamente incomuns em outros sítios do corpo (26). No homem, são suspeitos de qualquer tipo de doença infecciosa e podem ser isolados de qualquer amostra recebida no laboratório (34). Entre as doenças infecciosas podem-se citar abscessos, pneumonia, meningite, septicemia, infecções do trato urinário e intestinal (26, 34). As infecções mais freqüentes são do trato urinário, seguido de infecções respiratórias, de feridas, sangue e Sistema Nervoso Central. Muitas dessas infecções, especialmente bacteremias e meningite, são de origem hospitalar (26).

Atualmente, estão descritos mais de 30 gêneros e 130 espécies dentro da Família *Enterobacteriaceae* (26, 34). Neste grupo, os gêneros mais freqüentemente isolados de amostras biológicas são *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* spp.

A Família *Enterobacteriaceae* compreende 50% de todos isolados de infecções hospitalares e 80% de todos os isolados Gram-negativos (1). No laboratório clínico, as enterobactérias são responsáveis por aproximadamente 50% dos casos de septicemia, mais de 70% das infecções do trato urinário e uma significativa percentagem das infecções intestinais. A maioria das infecções extra-intestinais é causada por um pequeno número de espécies: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. aerogenes*, *E. cloacae* e *S. marcescens* (26).

E. coli é a espécie bacteriana mais comumente isolada nos laboratórios clínicos, sendo o patógeno mais comum nas infecções urinárias. Além disso, pode estar relacionada com infecções de feridas, pneumonias em pacientes imunossuprimidos, bacteremias, infecções intestinais e meningites em neonatos (34, 49).

No gênero *Klebsiella*, *K. pneumoniae* é isolada com maior frequência de amostras clínicas, podendo causar pneumonia, meningite, infecções urinárias e septicemias (34). No gênero *Enterobacter*, as espécies mais comumente isoladas de amostras biológicas são *E. aerogenes* e *E. cloacae*, podendo estar associadas a uma variedade de infecções oportunistas que afetam as vias urinárias, trato respiratório, feridas cutâneas ou ainda serem responsáveis por sepse (34). *K. pneumoniae* e *E. cloacae* causam sepse com menor frequência que isolados Gram-positivos, porém a mortalidade nestes pacientes chega a ser duas vezes maior (1).

No gênero *Proteus*, *P. mirabilis* é a espécie isolada com maior frequência em humanos, principalmente em infecções urinárias e de feridas (1, 34). *P. vulgaris* é principalmente isolado de pacientes imunodeprimidos, especialmente quando estes se encontram sob tratamentos prolongados (34).

As espécies do gênero *Shigella* são responsáveis por disenterias, raramente causando infecções fora do trato intestinal (26). Da mesma forma, espécies do gênero *Salmonella* são mais comumente isoladas de pacientes com infecções intestinais, raramente causando infecções extraintestinais (bacteremia) em pacientes imunodeprimidos (49). *Salmonella* sorotipo *typhi* causa febre tifóide e é encontrada apenas em humanos (26).

Dados do estudo multicêntrico SENTRY (referentes ao período 1997-2001, para América Latina) mostram que *E. coli* é o segundo germe mais isolado de hemoculturas (17,88%); infecções urinárias em pacientes hospitalizados são causadas primeiramente por *E. coli* (57,16%), seguida de *K. pneumoniae* (10,35%) e, em quarto lugar, por *Proteus* spp. (5,71%); em infecções do trato respiratório inferior *K. pneumoniae* é o terceiro germe mais prevalente (9,8%); infecções de pele e tecidos moles, *E. coli* é o segundo germe mais isolado (13,0%) (63). Dados mais atuais do Sentry (referentes a 2003, para América Latina) mostram que infecções urinárias adquiridas na comunidade são causadas primeiramente por *E. coli* (66%), seguida de *K. pneumoniae* (7%) e em terceiro lugar por *Proteus* spp. (6,4%) (3).

Dados de outro estudo multicêntrico MYSTIC (referentes a 2002, para o Brasil), para amostras de bacilos Gram-negativos obtidas de pacientes internados em UTIs, indicam que *K. pneumoniae* (12,1%) é o terceiro germe mais isolado, seguido de *E. coli* (10,55%), *E. cloacae* (7,9%), *S. marcescens* (5,6%) e *P. mirabilis* (3,2%) (42).

2. Mecanismos de Resistência:

Os problemas relacionados à resistência antimicrobiana em bacilos Gram Negativos parecem ser mais importantes no Brasil e em outros países da América Latina do que em outras regiões do mundo. Dentre os principais mecanismos de resistência nestes microrganismos pode-se citar: alteração de proteína alvo, inativação enzimática, alteração da permeabilidade da membrana externa bacteriana e mecanismo de efluxo.

A alteração de proteína alvo está relacionada com a alteração do sítio específico de ligação dos antibióticos na bactéria, sendo assim, a diminuição da afinidade da droga pelo sítio promove a perda da atividade antimicrobiana (61).

Na inativação enzimática, certas bactérias produzem enzimas que neutralizam as drogas ou seus efeitos antimicrobianos. As enzimas podem ser constitutivas ou induzíveis: as constitutivas são produzidas independentemente da presença do antibiótico; as induzíveis são produzidas pela bactéria na presença de determinados antibióticos (61).

A alteração da permeabilidade da membrana deve-se a alteração na expressão dos canais de porinas, modificando a penetração e, conseqüentemente, a ação de diferentes antibióticos (61). Esse mecanismo é mais comum em bactérias Gram-negativas do que em bactérias Gram-positivas, pois a principal barreira à entrada de antibióticos na célula bacteriana é a membrana externa, estrutura inexistente em organismos Gram-positivos (7).

O mecanismo de efluxo é a propriedade de expulsar ativamente os antibióticos para fora da célula, contribuindo para uma concentração inadequada da droga e promovendo uma ação não-efetiva do antimicrobiano (61). Este

mecanismo de ação não é específico, podendo funcionar para diferentes classes de antibióticos (75).

3. Mecanismos de Resistência Enzimáticos:

A inativação enzimática é um mecanismo de resistência que afeta vários grupos de antibióticos como os β -lactâmicos (inativados por β -lactamases), aminoglicosídeos (inativados por acetiltransferases, adeniltransferases e fosfotransferases) e o cloranfenicol (inativado por acetiltransferases denominadas enzimas CAT) (7, 59). Embora essas enzimas sejam, em muitos casos, adquiridas, muitas são intrínsecas de certos gêneros (59).

3.1 β -Lactamases:

As β -lactamases hidrolisam o anel β -lactâmico impossibilitando a atividade antimicrobiana do fármaco, sendo elas a causa mais comum de resistência bacteriana a antibióticos β -lactâmicos (38). As β -lactamases se constituem numa família relativamente complexa de enzimas as quais apresentam diversidade considerável conforme substrato de ação (antibiótico), origem genética (cromossômica ou plasmidial), bem como, sua sensibilidade a compostos inibidores destas enzimas (EDTA e ácido clavulânico). A capacidade ou não da β -lactamase conferir resistência irá depender da quantidade de enzima produzida, da habilidade desta enzima hidrolisar o antimicrobiano em questão (potência) e da velocidade com que o β -lactâmico penetra pela membrana celular externa (permeabilidade de membrana).

A nomenclatura das β -lactamases pode estar relacionada com o tipo de antibiótico sobre o qual atuam (por exemplo: OXA, cujos substratos são isoxazolilpenicilinas e metecilina) ou de acordo com a espécie bacteriana produtora da enzima (por exemplo: PSE, produzida por *Pseudomonas*

aeruginosa). A denominação também pode estar relacionada com nomes próprios, como é o caso das enzimas TEM que foi assim denominada por ter sido primeiramente isolada numa paciente de nome Temoniera (75).

A classificação das β -lactamases mais utilizada atualmente é a de Bush, Jacoby e Medeiros que distingue as enzimas conforme suas preferências pelos substratos e de acordo com seu perfil de inibição (clavulanato e EDTA). Assim, as β -lactamases podem ser divididas em 4 grandes grupos, sendo que alguns tipos específicos são mais comuns entre as Enterobactérias. Entre as mais comuns destacam-se as β -lactamases do Grupo 1 (AmpC) que são enzimas induzíveis, não inibidas por EDTA e Ácido Clavulânico. Outro grupo de enzimas importantes inclui as β -lactamases do Grupo 2be que se constituem em enzimas com um amplo espectro de ação (ditas β -lactamases de Espectro Ampliado – ESBL) contra antibióticos de últimas gerações. Essas β -lactamases não são induzíveis e são inibidas por Ácido Clavulânico (17).

Cabe mencionar a classificação de Ambler que é baseada na seqüência genética das enzimas, definindo 4 classes moleculares designadas como A, B, C e D. As enzimas A, C e D são serinas β -lactamases que atuam sobre o antibiótico por um mecanismo de hidrólise, que inativa a droga por romper o anel beta-lactâmico. As β -lactamases da classe B utilizam íons zinco para romper o anel beta-lactâmico. Existe uma boa correlação entre a classificação fenotípica (Bush, Jacoby e Medeiros) e a classificação molecular proposta por Ambler (Tabela 1) (61).

A fim de demonstrar o crescente do número de enzimas que degradam antibióticos β -lactâmicos, foi realizado um estudo entre os anos de 1995 e 2000,

sendo que 5 dos 11 (sub)grupos de β -lactamases aumentaram em torno de 50% (16). É importante salientar também que, neste período, o número estimado de enzimas ESBL triplicou (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação das β -lactamases (16, 17, 61)

Grupo Bush, Jacoby e Medeiros	Classe Molecular Ambler	Substrato preferido	Inibida por		Exemplo	Estimativa do n° de enzimas	
			AC ^a	EDTA		1995	2000
1	C	Cefalosporinas	-	-	Enzimas AmpC de bactérias Gram-Negativas; MIR-1	32	51
2a	A	Penicilinas	+	-	Penicilases de Bactérias Gram-Positivas	20	23
2b	A	Penicilinas e Cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1	16	16
2be	A	Penicilinas, Cefalosporinas espectro reduzido, Cefalosporinas de amplo-espectro e Monobactams	+	-	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6, K1 <i>K. oxytoca</i>	36	119
2br	A	Penicilinas	+/-	-	TEM-30 a TEM-36, TRC-1	9	24
2c	A	Penicilinas e Carbenicilinas	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4	15	19
2d	D	Penicilinas , Cloxacilina	+/-	-	OXA-1 a OXA-11, PSE-2 (OXA-10)	18	31
2e	A	Cefalosporinas	+	-	Cefalosporinases induzíveis de <i>Proteus vulgaris</i>	19	20
2f	A	Penicilinas, Cefalosporinas e Carbapenêmicos	+	-	NMC-A de <i>E. cloacae</i> , Sme-1 de <i>Serratia marcescens</i>	3	4
3	B	Maioria β -lactâmicos, incluindo Carbapenêmicos	-	+	L1 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , CcrA de <i>Bacterioides fragilis</i>	13	24
4	Não determinada	Penicilinas	-	?	Penicilases de <i>B. cepacia</i>	7	9

^a AC. Ácido Clavulânico

4. AmpC

Nas enterobactérias a produção de β -lactamases cromossômicas é codificada por um gene estrutural denominado *ampC* (38). Em *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Proteus* spp. e *M. morgani* a expressão da enzima AmpC é induzível por agentes β -lactâmicos. Nestes organismos, a produção da enzima é induzida pelo próprio tratamento antimicrobiano com β -lactâmicos podendo ocasionar falência terapêutica, mesmo que a bactéria tenha sido originalmente considerada sensível ao antibiótico no teste de sensibilidade laboratorial *in vitro*.

O antibiótico β -lactâmico pode tanto ser um indutor de AmpC como ser degradado pela mesma, sendo que estas características variam de acordo com os diferentes antibióticos. Ampicilina e cefalosporinas de curto-espectro são lábeis e geralmente fortes indutores de AmpC. Cefalosporinas de amplo-espectro, ureidopenicilinas e carboxipenicilinas também são lábeis à hidrólise, porém são fracos indutores. Carbapenêmicos são fortes indutores, mas são estáveis a hidrólise enzimática. Cefepima e cefpiroma são mais estáveis que outras cefalosporinas de amplo-espectro e continuam ativas contra bactérias produtoras de AmpC (38).

As principais moléculas inibidoras de β -lactamase, clavulanato, sulbactam e tazobactam geralmente não conseguem inibir as enzimas AmpC de maneira adequada para que o β -lactâmico consiga agir (61). Além disso, o clavulanato é um forte indutor dessas enzimas (38). Tzouvelekis *et al* (1997) estudaram o Ro 48-1220 (molécula derivada do ácido penicilânico), e concluíram que é um potente inibidor do grupo 1, 2b e 2be, não demonstrando poder de indução sobre as enzimas AmpC (80).

Apesar da produção de AmpC aumentar significativamente na presença de um indutor, a retirada deste pode fazer com que a produção destas enzimas volte a seus níveis basais. No entanto, hiperprodução permanente pode ocorrer e, normalmente, se deve a uma mutação no gene *ampC*, e isto é cada vez mais freqüente em isolados clínicos (38). No caso de mutação, os isolados são resistentes a todas as penicilinas e cefalosporinas (exceto de quarta geração) independentemente de um agente indutor (61). As cepas que apresentam mutação podem ser selecionadas a partir de cepas induzíveis, durante a terapia com drogas que são fracas indutoras. A probabilidade desta seleção varia de acordo com o sítio de infecção e da concentração atingida pela droga neste sítio (61).

As cepas produtoras de AmpC induzíveis podem expressar sensibilidade no antibiograma, enquanto as cepas que apresentam mutação sempre expressam resistência. A expressão de sensibilidade ou resistência, *in vitro*, depende da concentração enzimática (61).

Independentemente do mecanismo de produção de AmpC (induzível ou mutação), os isolados produtores permanecem sensíveis aos carbapenêmicos, que não sofrem a ação direta dessas enzimas. A sensibilidade aos carbapenêmicos também não é afetada pelo inóculo, porém pode ocorrer resistência decorrente da perda de porinas (61, 74).

Algumas diferenças entre as espécies a serem analisadas quanto à produção de AmpC devem ser consideradas. A cefoxitina é moderadamente ativa contra as enzimas β -lactamases de *Serratia* spp., *Providencia* spp. e *Morganella* spp., por outro lado, para *Enterobacter* spp. e *C. freundii* ela é um forte indutor, sendo inativa contra esses microrganismos. O tazobactam inibe a enzima da *M. morganii* em cepas com mutação, porém tem mínima ação contra as enzimas AmpC de outras

espécies. A ampicilina e a amoxicilina, que são fortes indutores para a maioria das espécies, são fracos indutores para *C. freundii* e *Providencia* spp. apresentando sensibilidade (61).

Eventualmente β -lactamases AmpC podem estar localizadas em plasmídeos transmissíveis em várias espécies como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. e *P. mirabilis*. Esses plasmídeos podem possuir outros genes codificadores de resistência a múltiplas classes de antibióticos (74). Detecção de AmpC mediada por plasmídeo pode ser importante para decisões no tratamento, controle de infecção e investigações epidemiológicas (74). Exceto para isolados de *Salmonella* spp. e isolados ocasionais de *K. pneumoniae*, a maioria das enzimas AmpC mediadas por plasmídeos são detectadas em microrganismos de pacientes que estão hospitalizados a vários dias (55).

No CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) não há padronização de testes para detectar isolados produtores de AmpC. Os testes fenotípicos para detecção de AmpC não são bem definidos, mas normalmente são baseados na sensibilidade as cefamicinas (cefotina) (61, 77) e resistência a todos os inibidores de beta-lactamases (61). Porém, em alguns isolados a perda de porinas pode resultar em resistência as cefamicinas sendo necessário testes específicos para detectar AmpC (74).

5. ESBL

As β -lactamases de espectro estendido (ESBL – Extended-Spectrum β -lactamase) são enzimas que hidrolisam praticamente todos os β -lactâmicos, exceto carbapenens e cefamicinas (cefotaxima). Estas enzimas são mediadas por genes plasmidiais não induzíveis e são inibidas por compostos como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (71).

As β -lactamases de espectro estendido (Grupo 2be) são derivadas das enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 (Grupo 2b) que sofreram mutações pontuais, com a substituição de um a quatro aminoácidos, que acarreta a ampliação da atividade hidrolítica das enzimas originais (38, 61).

A primeira descrição de TEM-1 foi em 1965 em um isolado de *E. coli* resistente a ampicilina, e as enzimas subsequentes descritas com essas características incorporam diferentes números. As ESBLs foram descobertas em 1983 na Alemanha (SHV-2), mas o primeiro caso clínico foi descrito na França em 1985 envolvendo cepas de um surto que produziam enzimas do tipo TEM-3 (61). Hoje em dia, há mais de 200 tipos diferentes destas enzimas (74) que se diferenciam genotipicamente e também pelo seu substrato preferencial (11).

Entre as enzimas ESBLs que não são derivadas de TEM e SHV, as enzimas CTX-M são as β -lactamases mais prevalentes (59). As enzimas CTX-M são mais ativas contra cefotaxima do que ceftazidima e aztreonam (9), e são melhores inibidas pelo tazobactam do que pelo ácido clavulânico (59). Desde o primeiro relato de CTX-M há uma década atrás, uma grande variedade destas enzimas têm sido descritas em várias áreas geográficas e em diversos isolados bacterianos de pacientes hospitalizados e de pacientes da comunidade (8). Bonet *et al* (2000) reportaram

isolados da Família *Enterobacteriaceae* produtores de CTX-M8 isolados em 1996 e 1997 no Rio de Janeiro (10). Em 2001, reportaram CTX-M9 e CTX-M16 isolados em 1996 e 1999 também no Rio de Janeiro, mostrando a disseminação, diversidade e implantação de enzimas CTX-M no Brasil (9).

Além dessas famílias de ESBL já bem estabelecidas (TEM, SHV e CTX-M), há outras enzimas que também possuem atividade de espectro-estendido sendo descritas (K1, BES-1, CME-1, GES-1, IBI-1, IBI-2, PER-1, PER-2, VEB-1, SFO-1, derivadas OXA), porém estas são encontradas com menor frequência (59, 71).

5.1 Prevalência de ESBL:

A prevalência dessas enzimas, bem como as características fenotípicas dos isolados clínicos podem variar entre áreas geográficas (61, 70, 82). As ESBLs ocorrem principalmente em *Klebsiella* spp. e *E. coli*, mas podem ser, também, produzidas por outros membros da Família *Enterobacteriaceae*, como *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Salmonella* spp., e *Serratia* spp. (11, 22, 25, 39, 44, 70, 82).

Entre membros da Família *Enterobacteriaceae* a produção de ESBLs tem emergido como um importante mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos. Inicialmente, os organismos produtores de ESBL foram isolados de pacientes hospitalizados, provavelmente devido ao uso de cefalosporinas de amplo espectro; atualmente já existem casos de ESBL encontradas em pacientes da comunidade (5, 25, 39, 44, 60). Cabe mencionar que espécies produtoras de ESBL podem sobreviver por longos períodos em hospitais, ocasionando surtos.

Dados do SENTRY mostram as variações na prevalência de isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL: América Latina 45,4%, Canadá 4,9%, Estados

Unidos 7,6%, e Europa 22,6%; para *Escherichia coli*: América Latina 8,5%, Canadá 4,2%, Estados Unidos 3,3%, e Europa 5,3% e; para *P. mirabilis*: América Latina 22,4%, Canadá 3,1%, Estados Unidos 4,9% e Europa 11,1% (87).

Dados do SENTRY para o Brasil, mostram uma alta prevalência de isolados produtores de ESBL: 9,1% para *E. coli* e 50,3% para *K. pneumoniae* (62). No Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre a prevalência de *E. coli* produtora de ESBL foi praticamente a mesma (8 a 13%, dependendo da metodologia utilizada na detecção de ESBL), ao contrário da encontrada para *Klebsiella* spp que foi mais baixa (33 a 40%, dependendo da metodologia utilizada na detecção de ESBL) que os índices encontrados no Brasil (28).

A maioria dos dados sobre prevalência de ESBL são referentes a isolados de *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *P. mirabilis*, devido ao fato de existir padronização do CLSI para pesquisar esta enzima de resistência nestes microrganismos. Porém, um estudo realizado em Curitiba encontrou 24% dos isolados da Família *Enterobacteriaceae* como produtores de ESBL (51). Este valor é relativamente alto quando comparado com a prevalência de ESBL da Família *Enterobacteriaceae* em estudos envolvendo outras áreas geográficas: na França em 1998 foi de 3,2% (18); e na Itália em 2003 foi de 7,4% (39).

5.2 Perfil de Suscetibilidade:

Os plasmídeos que possuem o gene que codifica para ESBL podem conter genes que codificam resistência a outros antimicrobianos como aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclina, quinolonas e cloranfenicol (32, 71). Num estudo realizado por Jett *et al* (1995), 65% dos isolados produtores de ESBL foram resistentes a pelo

menos um antibiótico não β -lactâmico testado (sulfametoxazol/trimetoprim, ciprofloxacina ou gentamicina) (33).

Cormican *et al* (1996), demonstrou um aumento de resistência aos aminoglicosídeos e fluorquinolonas nas amostras da Família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL quando comparadas as não produtoras de ESBL (21). Babini *et al* (2000) verificaram uma maior resistência aos amimoglicosídeos (amicacina 61% e gentamicina 72%) e ciprofloxacina (31%) para isolados produtores de ESBL quando comparados aos não produtores de ESBL (amicacina 4%, gentamicina 9,5% e ciprofloxacina 7%) (6).

Assim, a produção de ESBL é freqüentemente acompanhada por multiresistência aos antibióticos, de forma que as opções terapêuticas ficam limitadas aos carbapenêmicos (imipenem, meropenem ou ertapenem). Dados do programa SENTRY para o Brasil, mostram que apenas os carbapenêmicos possuem excelente atividade contra isolados produtores de ESBL: 100% das amostras de *E. coli* são sensíveis a imipenem e meropenem e 100% das amostras de *K. pneumoniae* são sensíveis a imipenem, enquanto que 94,6% são sensíveis a meropenem (62). No entanto, amostras de bactérias produtoras de ESBL resistentes ao imipenem já têm sido isoladas. (87)

5.3 Detecção Laboratorial de ESBL:

O laboratório de Microbiologia tem um importante papel na detecção de bactérias produtoras de ESBL, pois um rápido diagnóstico é necessário para o adequado manejo clínico desses pacientes hospitalizados, visto que há dados indicando a relação de ESBL com complicações clínicas e mortalidade (56, 71). A demora no diagnóstico leva a permanência do paciente no ambiente hospitalar por

tempo prolongado (71), possibilitando disseminação intra e inter hospitalar dessas enzimas (87), antes da implementação de medidas de controle. Além disso, o paciente pode receber terapia inadequada, levando à falha terapêutica.

As enzimas ESBLs podem conferir baixos níveis de resistência, os quais podem não ser detectados no teste de sensibilidade *in vitro* (53, 61). Sendo assim, o laboratório pode fornecer resultados de aparente sensibilidade *in vitro* o qual não correlaciona com efetividade clínica a terapia por β -lactâmicos. Isto pode ser devido a dois fatores:

- I. A degradação do β -lactâmico é dependente do tamanho do inóculo; dessa maneira, o inóculo padronizado para os testes de suscetibilidade pode não ser suficiente para a detecção de resistência (11, 61, 71).
- II. Como a produção de ESBL é mediada por plasmídeos é possível encontrar num mesmo isolado clínico uma mesma espécie contendo duas cepas: uma produtora e outra não produtora de ESBL. Sendo assim, quando o inóculo para o teste de suscetibilidade for feito de maneira inadequada, ou seja, for tomada apenas uma colônia, poderá resultar num falso negativo (22).

5.3.1 Teste de Triagem para ESBL:

Conforme preconizado pelo CLSI, quando *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Proteus mirabilis* apresentarem diminuição dos halos de inibição para determinado antibiótico (Tabelas 3 e 4) pode indicar produção de ESBL, embora conforme a interpretação convencional à bactéria ainda poderia ser considerada sensível ao antibiótico (20). Neste caso, devem ser feitos testes complementares para confirmar se a bactéria é produtora de ESBL. Após confirmação, o laboratório

deverá liberar o resultado do perfil de suscetibilidade da bactéria como resistente a todos β -lactâmicos e aztreonam independentemente do resultado obtido por disco difusão (20).

Tabela 2: Halos de inibição sugestivos de ESBL para *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* (20)

Agente Antimicrobiano	Concentração dos discos	Interpretação convencional dos halos de Inibição (mm)			Halos sugestivos de ESBL
		R	I	S	
Aztreonam	30 μ g	≤ 15	16 - 21	≥ 22	≤ 27 mm
Cefotaxima	30 μ g	≤ 14	15 - 22	≥ 23	≤ 27 mm
Cefpodoxima	10 μ g	≤ 17	18 - 20	≥ 21	≤ 17 mm
Ceftazidima	30 μ g	≤ 14	15 - 17	≥ 18	≤ 22 mm
Ceftriaxona	30 μ g	≤ 13	14 - 20	≥ 21	≤ 25 mm

Tabela 3: Halos de inibição sugestivos de ESBL para *P. mirabilis* (20)

Agente Antimicrobiano	Concentração dos discos	Interpretação convencional dos halos de Inibição (mm)			Halos sugestivos de ESBL
		R	I	S	
Cefotaxima	30 μ g	≤ 14	15 - 22	≥ 23	≤ 27 mm
Cefpodoxima	10 μ g	≤ 17	18 - 20	≥ 21	≤ 22 mm
Ceftazidima	30 μ g	≤ 14	15 - 17	≥ 18	≤ 22 mm

É importante salientar que não é recomendado usar apenas um antibiótico no teste de triagem, pois haveria uma grande diminuição na sensibilidade do teste. Isto ocorre porque as diferentes enzimas ESBL possuem substratos preferenciais. Para Nogueira *et al* (2006), a sensibilidade variou de 85,1% quando usado somente a

ceftazidima, 94,2% para aztreonam, 95,9% para cefpodoxima e 99,2% para ceftriaxona ou cefotaxima (51).

No teste de triagem podem ocorrer casos falsos-positivos, por isso é importante a realização de testes confirmatórios que se baseiam na inibição da enzima pelo ácido clavulânico (27).

Schwaber *et al* (2004) avaliou o teste de triagem para outros membros da Família *Enterobacteriaceae* (exceto *E. coli* e *Klebsiella* spp.), e apenas 2,2% dos isolados com teste de triagem positivo foram confirmados como produtores de ESBL (67). Ao contrário, no estudo de Nogueira *et al* (2006) 78% dos isolados com teste de triagem positivo foram confirmados como produtores de ESBL (51).

5.3.2 Testes Confirmatórios Fenotípicos para ESBL

Para os testes confirmatórios fenotípicos, quanto maior o número de substratos utilizados, maior será a sensibilidade do teste (29, 89), visto que a utilidade de cada substrato vai depender do tipo de ESBL (16), as quais variam conforme instituições ou regiões geográficas. Porém, nenhum destes testes é 100% sensível ou específico na detecção de ESBL entre isolados clínicos de bactérias Gram-Negativas (11).

5.3.2.1 Discos Combinados:

Como teste confirmatório o CLSI recomenda o teste da adição de clavulanato (10 µg) nos discos de ceftazidima e cefotaxima (20). Para sua realização é feita uma suspensão equivalente a 0,5 na escala de McFarland através do método de suspensão direta de colônias. A suspensão é inoculada em placa de Ágar Mueller-Hinton com o auxílio de um swab (19), e nesta são colocados os quatro discos

(cefalosporinas isoladamente e com clavulanato). Após incubação por 16 a 18 horas em atmosfera ambiente, compara-se o halo do disco com a droga isolada e do disco com a droga mais clavulanato, um aumento de 5 mm no halo de inibição no disco com clavulanato caracteriza o resultado positivo da presença de ESBL (20) (Figura 1).

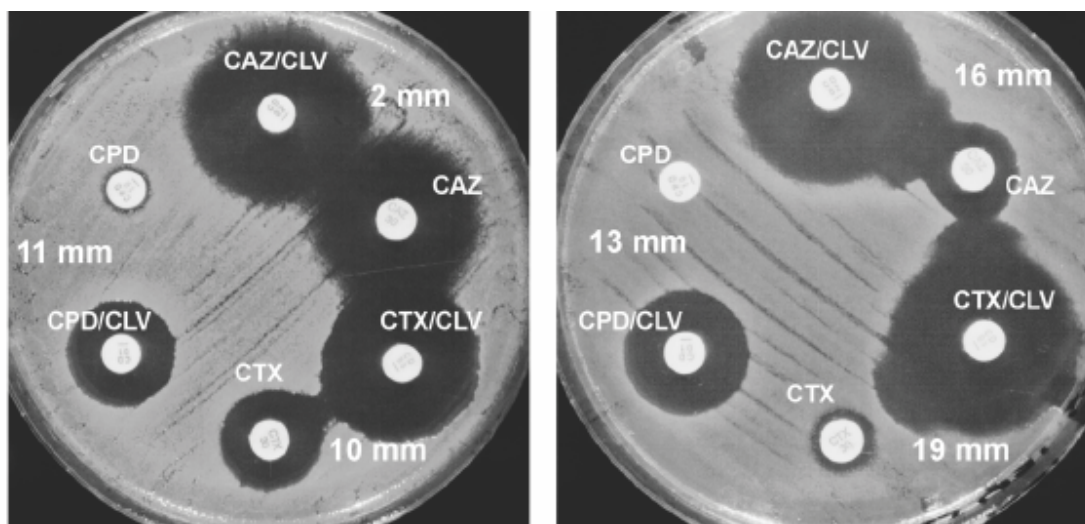


Figura 1: Detecção de ESBL usando discos combinados (71) - um aumento de 5 mm no halo de inibição no disco com ácido clavulânico comparado ao disco sem ácido clavulânico, caracteriza o resultado positivo da presença de ESBL. Os discos usados neste teste foram Cefpodoxima (CPD), Cefpoxima/Ácido Clavulânico (CPD/CLV), Cefotaxima (CTX), Cefotaxima/Ácido Clavulânico (CTX/CLV), Ceftazidima (CAZ) e Ceftazidima/Ácido Clavulânico (CAZ/CLV)

O teste de confirmação descrito acima baseia-se na inibição da hidrólise do substrato β -lactâmico na presença de inibidores de β -lactamases, assim como outros testes de detecção de ESBL (aproximação de disco e avaliação da Concentração Inibitória Mínima) (87). Venezia *et al* (2003) descreveram uma sensibilidade de 100% associando as combinações Ceftazidima/Ácido Clavulânico (CAZ/AC) e Cefotaxima/Ácido Clavulânico (CTX/AC) como teste confirmatório (82). Por outro lado, um estudo

realizado na Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, descreveu uma sensibilidade de 67% utilizando a mesma associação (23). Nos dois estudos, a combinação CTX/AC foi mais efetiva que CAZ/AC para detecção de ESBL, pois detectou 54,2% (23) e 91% (82) dos isolados como produtores de ESBL, ao contrário da combinação CAZ/AC que detectou apenas 39,3% (23) e 66% (82).

Para *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *M. morganii* e *C. freundii*, testes fenotípicos que utilizam o ácido clavulânico como inibidor podem não ser efetivos para detecção de ESBL. O Ac. Clavulânico pode ativar assim como induzir a produção de altos níveis de AmpC nos microrganismos citados, neste caso amostras que possuem simultaneamente ESBL e AmpC apresentarão no teste fenotípico para detecção de ESBL resultados falsos negativos. Como a expressão de altos níveis de AmpC tem um efeito mínimo na atividade do cefepima, esta droga pode ser usada para a detecção de ESBLs em isolados que também possuem AmpC (77). Outra opção de teste em isolados que produzem simultaneamente AmpC, é utilizar como inibidores o tazobactam ou o sulbactam (71)

A utilização de discos combinados de cefepima com ácido clavulânico (FEP/AC) não é padronizada pelo CLSI. Porém, Quinteros *et al* (2003) utilizaram FEP/AC no teste confirmatório, e obtiveram um aumento no percentual de detecção de 93% quando comparado às outras combinações: CTX/AC (60%) e CAZ/AC (53%) (58)

Algumas variações do teste confirmatório tem sido descritas, porém poucas são convenientes para o uso na rotina. Existem duas variantes do teste confirmatório que são mais utilizadas: “Teste de Aproximação de Disco” e “Concentração Inibitória Mínima (CIM)” (71).

5.3.2.2 Teste de Aproximação de Disco:

No teste de aproximação de disco o preparo da suspensão e o inóculo em placa de Ágar Mueller-Hinton é feito da mesma maneira como no teste de Adição de Clavulanato. No centro desta placa é colocado um disco contendo amoxicilina/ ácido clavulânico, e ao redor deste são colocados discos de β -lactâmicos (Aztreonam, Cefotaxima, Ceftazidima e Ceftriaxona) à uma distância de 30 mm centro a centro. Após incubação por 16 a 18 horas em atmosfera ambiente, uma deformação no halo de inibição do β -lactâmico próximo ao disco contendo clavulanato é um resultado positivo (11) – Figura 2.

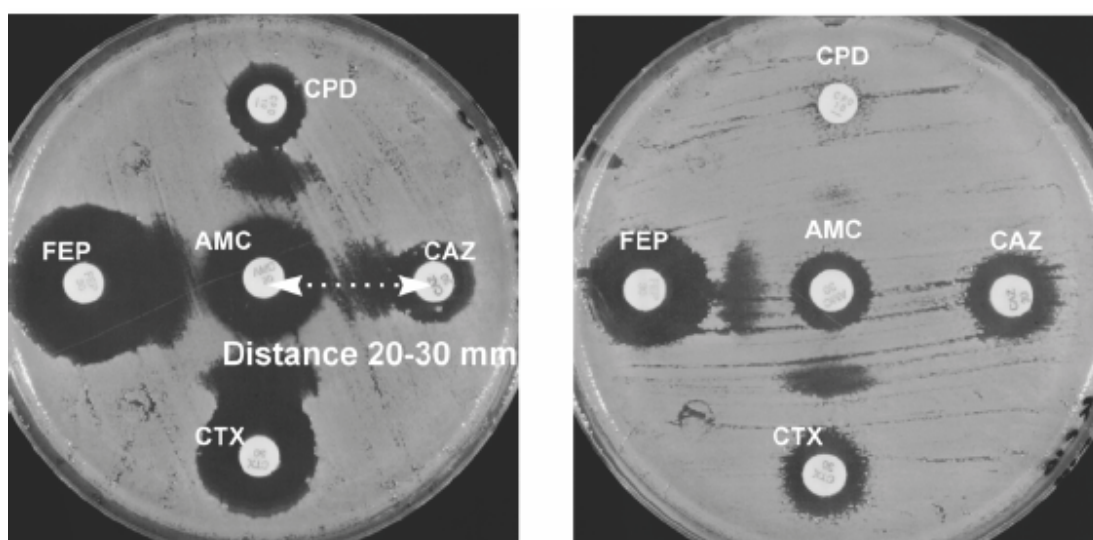


Figura 2: Detecção de ESBL usando Aproximação de Disco (71) - uma deformação no halo de inibição do β -lactâmico próximo ao disco contendo clavulanato é um resultado positivo. Os discos usados neste teste foram: Amoxicilina/Clavulanato (AMC), Ceftazidima (CAZ), Cefpodoxima (CPD), Cefotaxima (CTX) e Cefepima (FEP)

Alguns autores sugerem que diminuindo a distância entre os discos para 20mm poderia aumentar a sensibilidade do teste (22, 79). Porém, no estudo realizado por Vercauteren *et al* (1997) a mudança da distância de 30mm para 20mm

não diminuiu os casos de falsos negativos (83). A interpretação deste teste em muitos casos é subjetiva pois fica difícil determinar se houve uma deformação do halo de inibição do β -lactâmico (22, 64), sendo necessária uma grande experiência do analista (83). Além disso, a distância ideal entre os discos pode variar de forma individual para cada isolado bacteriano (38).

No estudo de Tzouveleskis *et al* (1999) o teste de aproximação de disco não foi efetivo para detectar ESBL em bactérias que portavam simultaneamente a enzima AmpC (81). Uma possível solução é adicionar ao teste um disco de cefepima (89), neste caso a sensibilidade pode aumentar de 16 a 61% quando os discos forem colocados a uma distância de 30mm do disco contendo amoxicilina/ ácido clavulânico, e para 71 a 90% quando a distância for diminuída para 20 mm (79). O uso de cefepima para detecção de ESBL em isolados de *E. coli* e *Klebsiella* spp. pode ser pouco específico ocasionando falsos positivos (83).

5.3.2.3 Testes que determinam a (CIM):

Os testes que determinam a CIM podem ser realizados por dois métodos: Microdiluição em caldo e Fita de E-test®. Nos dois casos é usado um antibiótico β -lactâmico (Ceftazidima ou Cefotaxima) com e sem clavulanato. O resultado positivo para produção de ESBL é caracterizado pela redução significativa da CIM (≥ 3 diluições) na presença do inibidor (20) ou pela deformação da elipse de inibição na fita de E-test® (Figura 4) (73).

Usando Microdiluição em Caldo, Thomson *et al* (1999) verificou que para detecção de ESBL em amostras de *E. cloacae*, *E. aerogenes* e *C. freundii* (isolados

produtores de AmpC) a melhor combinação de substrato/inibidor foi ceftriaxona/sulbactam (8 μ g/mL) (78).

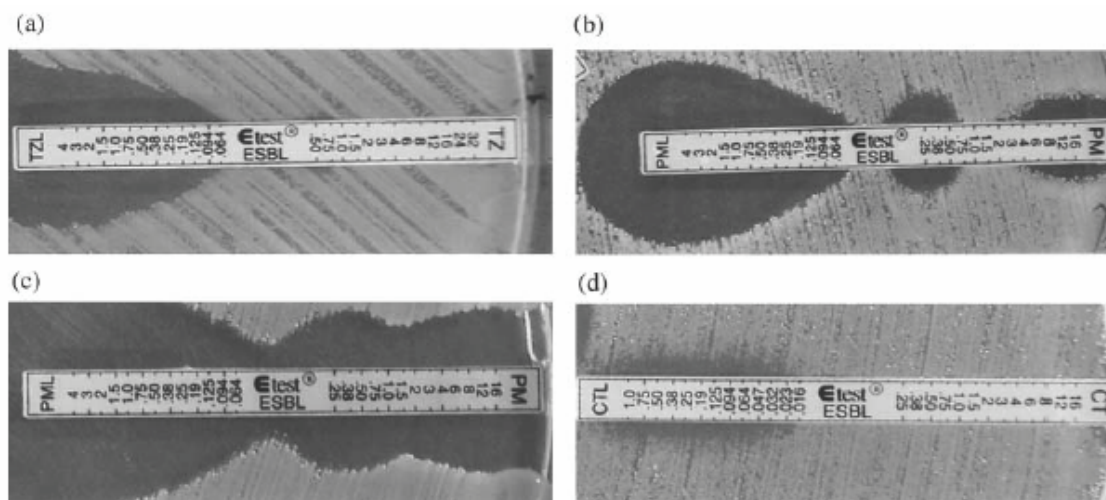


Figura 3: Uso da fita de E-test® para detecção de ESBL (73). (a) ESBL positivo: Cefotaxima (TZ) ($\geq 32 \mu\text{g/mL}$) + Cefotaxima/Ac Clavulânico (TZL) (0,064 $\mu\text{g/mL}$) – diminuição da CIM maior que 3 diluições. (b) uma zona de inibição fantasma ao redor da cefepima, indicando ESBL positiva. (c) deformação na elipse de inibição indicando ESBL positiva. (d) quando valores da CIM são acima da extensão da fita, os resultados são indeterminados.

Vercauteren *et al* (1997) encontrou uma menor sensibilidade (78,8%) na detecção de ESBL utilizando fita de E-test® de Cefotaxima-Cefotaxima/Ac Clavulânico (CAZ + CAZ/AC), além disso encontrou problemas na interpretação do resultado tendo que confirmar o teste com Fitas de E-test® com apenas Cefotaxima (83). d'Azevedo *et al* (2004) também encontrou resultados indeterminados utilizando Fitas de E-test® combinadas de CAZ + CAZ/AC (23).

Stürenburg *et al* (2004) avaliaram uma nova fita de Etest® com cefepima-cefepima/clavulanato (FEP + FEP/AC) comparando-a as fitas de CAZ + CAZ/AC e

cefotaxima-cefotaxima/clavulanato (CTX + CTX/AC) e observaram uma sensibilidade global de 98%, 83% e 74%, respectivamente. Para *Enterobacter* spp., a fita de FEP + FEP/AC apresentou uma sensibilidade de 100% na detecção de ESBL, ao contrário das fitas de CAZ + CAZ/AC e CTX + CTX/AC que apresentaram 31% de sensibilidade (73). Wiegand *et al* (2007), encontrou uma menor sensibilidade (60%) para *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Serratia* spp. utilizando a fita de Etest® com FEP + FEP/AC (86). Uma limitação no uso desta nova fita e a especificidade para amostras de *K. oxytoca* hiperprodutoras de β -lactamase cromossomal K1, que foram erroneamente classificadas como produtoras de ESBL (73).

5.3.3 Detecção de ESBL por Sistemas Automatizados:

No Brasil, existem diferentes sistemas automatizados com capacidade de detectar ESBL em isolados bacterianos, os mais utilizados são Vitek 1® (bioMérieux), Vitek 2® (bioMérieux), BD Phoenix® (Becton Dickinson) e MicroScan WalkAway-96 SI System® (Dade Behring).

O Sistema Vitek 1® possui cartões com cefalosporinas (ceftazidima e cefotaxima) isoladas e em combinação com ácido clavulânico (30, 64). O Vitek 2® possui um sistema “expert” (AES – Advanced Expert System) que é baseado num banco de dados que relaciona, para cada espécie, possíveis mecanismos de resistência com possíveis perfis de suscetibilidade (30, 65).

Para Sanders *et al* (2000), utilizando Vitek 2®, a porcentagem de acerto na identificação do mecanismo de resistência nas amostras testadas pode variar de alta (92%) para *Enterobacter* spp. a baixa (74%) para *E. coli* e *C. freundii*. Neste mesmo estudo, cinco amostras de *K. pneumoniae* (12%) que possuíam a enzima AmpC foram erroneamente classificadas como portadoras de ESBL. Além disso, duas

amostras de *E. coli* (5%) que possuíam a enzima ESBL foram identificadas de outra maneira (65). Tzelepi *et al* (2000), utilizando Vitek 1®, realizaram um estudo com *Enterobacter* spp. e o Sistema Vitek 1® mostrou-se pouco sensível para detectar ESBL nestas espécies, detectando apenas 6,4% dos isolados (79).

O Sistema BD Phoenix® usa cefpodoxima como droga de triagem para detecção de ESBL, seguida de um teste de sinergismo entre oximino-cefalosporinas (ceftazidima, ceftriaxona e cefotaxima) e ác. clavulânico (30, 72); estes resultados passam pela análise do “BDXpert System” (30). No estudo de Stefaniuk *et al* (2003), o Sistema BD Phoenix® apresentou uma sensibilidade de 95,8% e uma especificidade de 96,2% na detecção de ESBL em amostras da Família *Enterobacteriaceae*; as duas amostras de *Enterobacter cloacae* que não foram identificadas como ESBL expressavam a enzima AmpC induzível (69). Por outro lado, no estudo de Menozzi *et al* (2006), que avaliou apenas amostras de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, a sensibilidade e a especificidade foram mais altas (98,0% e 98,7%, respectivamente) (43).

Stürenburg *et al* (2003) realizaram um estudo comparando Vitek 2® e BD Phoenix®, no qual o BD Phoenix® identificou corretamente os 34 isolados produtores de ESBL enquanto o Vitek 2® identificou apenas 29 (72).

Hall *et al* (2002) compararam os sistemas Vitek 1®, Vitek 2® e BD Phoenix® para *E. coli* e *Klebsiella* spp.: quando foram avaliadas amostras controles, os sistemas apresentaram a mesma especificidade (87%) e uma sensibilidade variada (78%, 100% e 89%, respectivamente). Avaliando a detecção de ESBL em isolados clínicos, a especificidade dos três sistemas diminuiu (82% - Vitek 1®, 85% - Vitek 2® e 82% - BD Phoenix®), a sensibilidade do Vitek 2® também diminuiu (68%) ao

contrário da sensibilidade do Vitek 1® e do BD Phoenix® que aumentou (84% e 93%, respectivamente) (30).

O Sistema MicroScan® possui um sistema *Alert expert* que avalia o crescimento do microrganismo na presença de cefpodoxima (4µg/mL) e ceftazidima (1µg/mL), que são as concentrações recomendadas pelo CLSI para triagem de ESBL. O software do MicroScan® só permite identificar produtores de ESBL em *E. coli* e em *Klebsiella* spp., não permitindo nos demais membros da Família *Enterobacteriaceae* (86).

A performance dos diferentes sistemas automatizados varia de acordo com as espécies investigadas. Comparando os sistemas MicroScan®, Vitek 2® e BD Phoenix®, todos identificaram amostras de *E. coli* e *Klebsiella* spp. produtoras de ESBL com alta sensibilidade: 100% (BD Phoenix®); 98,6 % (MicroScan®) e 84,5% (Vitek 2®). A especificidade para os diferentes sistemas considerando os mesmos isolados variou de 51,5% (MicroScan® e BD Phoenix®) a 93,6% (Vitek 2®) (86).

O MicroScan® e o BD Phoenix® não foram capazes de diferenciar corretamente amostras de *K. oxytoca* produtoras de ESBL de *K. oxytoca* hiperprodutoras de β-lactamase cromossomal K1 (especificidade de 11,1% - MicroScan®; 0% - BD Phoenix®), ao contrário do sistema Vitek 2® que não identificou apenas uma amostra (especificidade de 88,9%) (86). Sanguinetti *et al* (2003), utilizando o sistema BD Phoenix®, também encontraram dificuldade de diferenciar amostras produtoras de ESBL de amostras hiperprodutoras de β-lactamase cromossomal K1 em isolados de *K. oxytoca* (66).

Para outros isolados como *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Serratia* spp. os sistemas BD Phoenix® e Vitek 2® apresentaram alta sensibilidade na detecção de

ESBL (90% e 100%, respectivamente) e uma baixa especificidade (33,3% e 38,9%, respectivamente) pois neste estudo, estes sistemas não conseguiram diferenciar corretamente isolados produtores de ESBL de isolados produtores de AmpC (86). Ao contrário, no estudo de Sanguinetti *et al* (2003) que avaliou diversas espécies da família *Enterobacteriaceae* o Sistema BD Phoenix® conseguiu discriminar adequadamente isolados produtores de ESBL de isolados não-produtores de ESBL (100% de sensibilidade e 98,9% de especificidade) (66).

5.3.4 Técnicas Moleculares para detecção de ESBL

Os testes já citados para detecção de ESBL se baseiam na detecção da presença da enzima através de suas características fenotípicas. Contudo, outros mecanismos de resistência aos β -lactâmicos, incluindo enzimas AmpC (17, 52), alteração de porinas (4, 40, 41), hiperprodução de K1 (64) podem estar presentes isoladamente ou juntamente com ESBL interferindo no resultado desses testes (23, 59). Além disso, há casos em que as enzimas conferem baixos níveis de resistência e não são detectadas por testes fenotípicos (56). Nestes casos, o ideal é utilizar técnicas que detectam especificamente as enzimas responsáveis pela resistência ou os genes responsáveis pela produção da enzima.

As técnicas moleculares também são importantes a nível epidemiológico, para saber qual enzima é mais prevalente em determinada região (18). Além disso, há casos em que um mesmo isolado clínico expressa múltiplas β -lactamases (9, 54, 66, 70, 86, 89), sendo necessárias técnicas moleculares para detectar quais enzimas estão presentes nos microrganismos. Cabe mencionar que algumas técnicas

moleculares podem ser realizadas a partir do material clínico do paciente, não sendo necessária à cultura bacteriana, o que acarreta um menor tempo no diagnóstico (56).

Os testes mais específicos para a detecção de ESBL incluem as técnicas que detectam os genes responsáveis pela produção da enzima, como o método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) bem como técnicas para detecção direta da enzima em extratos celulares através da eletroforese de ponto isoelétrico (Isoelectric Focusing - IEF) (71).

A técnica de PCR utiliza primers que são específicos para os genes da β -lactamase. Porém, a PCR não diferencia os diferentes tipos de enzimas em cada família (TEM, SHV, CTX-M...), neste caso, para a diferenciação de ESBL pode-se utilizar técnicas de sequenciamento (11). O sequenciamento é essencial para diferenciar entre as β -lactamases de curto espectro (TEM 1, TEM 2 e SHV 1) e as de amplo espectro (56).

Outros métodos moleculares, que não necessitam de um posterior sequenciamento, têm sido desenvolvidos para caracterizar ESBL e incluem PCR-RFLP, PCR-SSCP, Reação em Cadeia da Ligase, PCR em Tempo Real (99). Contudo, o crescente aumento de subtipos adicionais em cada família de ESBL, tem imposto limitações nestas técnicas com referência as suas habilidades de abranger a totalidade de variantes com diferentes pontos de mutação. Sendo assim, PCR seguida de sequenciamento permanece como padrão ouro para identificação do específico ponto de mutação de *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} (56).

Para detecção de ESBL através de Eletroforese de Ponto Isoelétrico (IEF), prepara-se uma suspensão da bactéria na qual se quer pesquisar a presença da

enzima. Após se realizar a eletroforese, é feita uma análise do perfil migratório relacionando com o ponto isoelétrico (que é característico para cada enzima).

Contudo, com o crescente aumento das variantes de ESBL, muitas com ponto isoelétrico muito próximos, torna-se difícil à identificação da ESBL específica por IEF (11). Pode-se definir a família a qual a enzima pertence, as enzimas TEM apresentam ponto isoelétrico entre 5,2 e 6,5; as SHV entre 7,0 e 8,2 e as CTX-M > 8 (65). Apesar de não ser possível definir a ESBL específica por IEF, esta técnica continua sendo útil para definir se há uma enzima prevalente numa dada instituição ou região (87).

Moland *et al* (2007) relataram um isolado de *Klebsiella pneumoniae* que produzia 10 diferentes tipos de β -lactamases (detectadas por IEF), 8 destas enzimas foram identificadas por PCR e incluíam AmpC plasmidial, enzimas do tipo ESBL e KPC. Neste isolado, utilizando as padronizações do CLSI para o teste confirmatório, não foi possível detectar a presença de ESBL o que demonstra a necessidade de testes moleculares para detecção enzimática em isolados com múltiplas β -lactamases (47).

6. KPC

As enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) são carbapenemases pertencentes à Classe A de Ambler e ao subgrupo 2f de Bush, Jacoby e Medeiros. São inibidas por ácido clavulânico e tazobactam e, possuem a habilidade de hidrolisar uma grande variedade de β -lactâmicos como cefalosporinas, penicilinas, aztreonam e, inclusive carbapenêmicos. Diferenciam-se das demais carbapenemases do grupo 2f por apresentarem a capacidade de hidrolisar cefalosporinas aminotiazoleoxima (cetotaxima) além dos demais compostos já citados e por serem de origem plasmidial (57).

O primeiro membro da família KPC, KPC-1, foi isolado de uma *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos que foi isolada nos Estados Unidos em 1996. Este isolado foi resistente a imipenem e meropenem (CIMs 16 μ g/mL), às cefalosporinas de amplo espectro e ao aztreonam. A CIM do imipenem diminuiu de 16 para 2 μ g/mL quando foi adicionado ácido clavulânico numa concentração de 4 μ g/mL. Similarmente a CIM do meropenem diminuiu de 16 μ g/mL para 1 μ g/mL na presença de ácido clavulânico (90).

A descoberta de KPC-1 foi rapidamente seguida de vários relatos nos Estados Unidos de uma variante, que possuía um aminoácido diferente (Ser(174) \rightarrow Gly), denominada KPC-2. Entre 1998 e 1999 foram isoladas 4 amostras de *K. pneumoniae* em Baltimore (46), em 1998 foi isolada em uma amostra de *Salmonella* spp. em Maryland (45), em 1998 foi isolada em uma amostra de *K. oxytoca* em Nova Iorque (91), em 2001 foi isolada uma amostra de *Enterobacter* spp. em Boston (31), entre 2001 e 2003 foram isoladas duas amostras de *Enterobacter* spp. (*E. cloacae* e *E. aerogenes*) em Nova Iorque (13). Há poucos casos de isolados produtores de KPC

fora dos Estados Unidos, o primeiro foi detectado na França em 2005 num isolado de *Klebsiella pneumoniae* (48) e o segundo na Colômbia em 2005 (85), em 2005 em Israel foram reportadas quatro amostras de *E. coli* (50), em 2006 na Colômbia foram reportados uma amostra de *C. freundii* e três amostras de *P. aeruginosa* (84).

Ao contrário do primeiro isolado de KPC-1, no estudo de Moland *et al* (2003) que reportaram 4 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2, nenhuma destas foram resistentes a imipenem ou meropenem. Porém, todos os quatro isolados foram resistentes ao ertapenem com CIM $\geq 8\mu\text{g/mL}$. No mesmo estudo, utilizando microdiluição em caldo, houve uma diminuição da CIM para ceftazidima e ceftriaxona quando testadas isoladamente e quando testadas na presença de ácido clavulânico ($2\mu\text{g/mL}$). Esses resultados poderiam indicar a presença de ESBL, porém somente um isolado apresentou teste confirmatório positivo para ESBL (46).

Cabe mencionar que a amostra de *K. oxytoca* produtora de KPC-2 reportada por Yigit *et al* (2003) foi resistente a imipenem e meropenem (CIMs $32\mu\text{g/mL}$), as cefalosporinas de amplo espectro e ao aztreonam. As CIMs de ambos, imipenem e meropenem, diminuíram de 32 para $4\mu\text{g/mL}$ quando foi adicionado ácido clavulânico numa concentração de $4\mu\text{g/mL}$ (91).

Bradford *et al* (2004) realizaram um estudo com 19 amostras de *Klebsiella* spp. produtoras de KPC-2, isoladas de 7 hospitais diferentes de Nova Iorque no período de novembro de 1997 a julho de 2002. Doze isolados, que foram obtidos de 6 hospitais diferentes, apresentaram o mesmo ribotipo, demonstrando uma disseminação intra e inter-hospital (12). O mesmo foi demonstrado por Bratu *et al* (2005), que estudaram 95 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC, destas 82% eram o mesmo ribotipo (detectadas em 9 hospitais) e 13% eram de um segundo

ribotipo (detectadas em 7 hospitais) (15). Em um estudo posterior, Bratu *et al* (2005), analisaram 257 amostras de *K. pneumoniae*, destas, 24% (62 isoladas) eram produtoras de KPC e 88% dos 62 isolados eram o mesmo ribogruppo (14).

Simultaneamente com o aumento de casos de KPC-2, uma variante desta com modificação de um aminoácido (His(272)→Tyr) denominada KPC-3 foi reportada primeiramente em *K. pneumoniae* (83) e posteriormente em *E. cloacae* (13). O primeiro relato de KPC-3, pertence a um surto ocorrido em UTIs de um Hospital de Nova Iorque; entre abril de 2000 e abril de 2001: 24 pacientes foram infectados ou colonizados por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC-3, das quais 19 provaram ter relação clonal por análise de PFGE. Nestas amostras, o sinergismo entre carbapenêmicos e ácido clavulânico foi fraco ou ausente (88).

Dados do Programa MYSTIC (1999-2005), para isolados da Família *Enterobacteriaceae* nos Estados Unidos, mostram que 0,57% desses isolados possuíam elevados CIMs para carbapenêmicos ($\geq 2\mu\text{g/mL}$) e 0,5% possuíam a enzima KPC (KPC-2 e KPC-3). A maioria (>90%) dessas amostras foi isolada em Nova Iorque, e 63,6% destas de um único centro médico. Dos 44 isolados, 28 eram *K. pneumoniae*, 7 *C. freundii*, 3 *E. cloacae*, 2 *E. coli*, 2 *K. oxytoca*, 1 *E. gergoviae* e 1 *S. marcescens* (24)

A diminuição da suscetibilidade de *K. pneumoniae* aos carbapenêmicos pode indicar a produção de KPC. Porém, Bratu *et al* (2005) analisaram as CIMs para imipenem demonstrando que estas são altamente dependentes do inóculo empregado no teste, utilizando um inóculo abaixo do padrão muitos isolados podem ser considerados suscetíveis ao imipenem. Um efeito inóculo também foi observado com meropenem, embora poucos isolados foram considerados suscetíveis. O efeito inóculo não foi observado com ertapenem, sugerindo que este antibiótico seria um

melhor marcador nos testes de detecção de KPC (14). O efeito inóculo para imipenem também foi observado para amostras de *Enterobacter* spp. (13), e em outros relatos para *K. pneumoniae* (35, 47).

Tenover *et al* (2006) testaram 15 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC a fim de avaliar a sensibilidade aos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) através de diferentes sistemas automatizados (MicroScan®, BD Phoenix®, Sensititre AutoReader®, Vitek 1® e Vitek 2®), microdiluição em caldo, E-test® e disco-difusão. Os Sistemas MicroScan® e BD Phoenix® apresentaram resultados mais compatíveis com a microdiluição em caldo, classificando apenas 6,7% (MicroScan®) e 13,3% (BD Phoenix®) dos isolados produtores de KPC como suscetíveis aos carbapenêmicos. Por outro lado, os sistemas Vitek® e Sensititre AutoReader® não foram capazes de detectar adequadamente a resistência aos carbapenêmicos nestes isolados classificando-os como suscetíveis em 66,67% e 86,67, respectivamente, dos casos. Além disso, neste estudo não foi possível detectar a CIM aos carbapenêmicos com fita de E-test® pela dificuldade de interpretação do teste devido à presença de colônias dentro da zona de inibição (Figura 4) (76).

Anderson *et al* (2007) testaram 31 isolados da Família *Enterobacteriaceae* produtores de KPC e 45 isolados não produtores desta enzima a fim de avaliar a sensibilidade aos carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem) destas amostras através de diferentes sistemas automatizados (MicroScany®, BD Phoenix®, Sensititre AutoReader®, Vitek 1® e Vitek 2®), microdiluição em caldo, E-test® e disco-difusão. A microdiluição em caldo foi o método mais sensível (acima de 90%) para identificação de resistência aos carbapenêmicos em amostras produtoras de KPC. Vitek 2®, MicroScan®, E-test® e disco-difusão obtiveram mais de 90% de sensibilidade na detecção de resistência aos carbapenêmicos quando

avaliaram ertapenem. Quando avaliada a suscetibilidade ao imipenem e meropenem pelos diversos métodos (exceto microdiluição em caldo), estes demonstraram baixa sensibilidade (29% a 84%). Porém, testes com imipenem e meropenem foram mais específicos que testes com ertapenem (3).

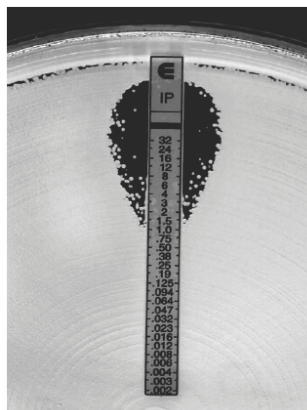


Figura 4: Detecção da CIM por E-test® Isolado de *Klebsiella pneumoniae* testado com fita de E-test® de Imipenem (IP) em Ágar Mueller-Hinton (76).

Cepas KPC podem não apresentar resistência *in vitro* aos carbapenêmicos sendo necessário a realização de um teste alternativo que indique a presença de carbapenemase. Um teste proposto é o Teste de Hogde Modificado originalmente descrito por Lee *et al* (2001). Neste teste é feita uma suspensão 0,5 McFarland de *E. coli* ATCCC 25922 que é diluída (1:10) e posteriormente inoculada em ágar Mueller-Hinton. No centro da placa é colocado um disco de imipenem (ou de meropenem) e a amostra a ser testada é estriada da borda do disco até a periferia da placa. A presença de uma distorção na zona de inibição da *E. coli* próximo à borda do inóculo da amostra testada após incubação *overnight* é interpretado como Teste de Hogde Modificado positivo (36). (Figura 5)

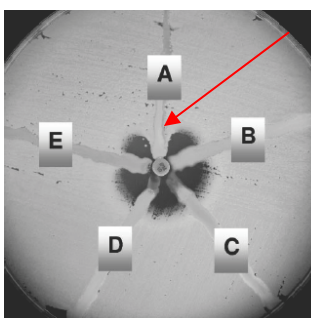


Figura 5 - Teste de Hodge Modificado com Imipenem. Isolado A é produtor de KPC com Teste de Hodge Modificado positivo. Isolados B, C, D e E não produzem carbapenemase e são Teste de Hodge Modificado negativo (3).

Anderson *et al* (2007) avaliaram o Teste de Hodge Modificado e encontraram 100% sensibilidade e 100% de especificidade para detecção de resistência mediada por KPC (3).

Para confirmar a presença da carbapenemase KPC, bem como determinar qual enzima é responsável pelo perfil de resistência, são necessárias técnicas moleculares como IEF e PCR seguidas de sequenciamento (12, 13, 31, 46, 84, 85, 91). A caracterização das enzimas por IEF revelou, na maioria dos isolados, múltiplas bandas caracterizando diferentes enzimas (12, 13, 14, 31, 45, 46, 84, 91).

Objetivos

Objetivos Gerais

Determinar a prevalência de β -lactamases (ESBL e KPC) na Família *Enterobacteriaceae*, obtidas de amostras clínicas de pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Objetivos Específicos

Determinar a prevalência de ESBL nos diferentes gêneros da Família *Enterobacteriaceae*.

Avaliar o uso do Teste de Triagem (padronizado pelo CLSI) para os membros da Família *Enterobacteriaceae*.

Avaliar o uso do Teste Confirmatório (Discos combinados) para os membros da Família *Enterobacteriaceae*, bem como analisar a sensibilidade dos diferentes substratos utilizados no Teste Confirmatório.

Analisar a distribuição dos genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} entre os membros da Família *Enterobacteriaceae* produtores de ESBL.

Comparar o perfil de suscetibilidade dos isolados produtores de ESBL com os isolados não produtores de ESBL.

Pesquisar KPC em isolados com resistência (plena ou intermediária) ao ertapenem, através do Teste Hodge Modificado e de PCR.

Referências da Revisão de Literatura

1. Abbott SI. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM Press; 2007. p. 698-715.
2. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, Carey RB, Thompson A, Stocker S, Limbago B, Patel JB. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. Journal of Clinical Microbiology. 2007. 45: 2723-2725.
3. Andrade SS, Sader HS, Jones RN, Pereira AS, Pignatari ACC, Gales AC. Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: time for local guidelines? Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2006. 101:741-748.,
4. Arduñay C, Liñares J, Dominguez MA. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1998. 42: 1636-1640.
5. Arpin C, Dubois V, Coulange L, André C, Fischer I, Noury P, Grobost F, Brochet JP, Jullin J, Dutilh B, Larribet G, Lagrange I, Quentin C. Extended-Spectrum β -Lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community and private Health Care Centers. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003. 47: 3506-3514.
6. Babini GS, Livermore DM. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. Collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2000. 45: 183-189.
7. Barth AL, Lutz L, Barros E, Machado A. Resistência Bacteriana. Em Barros E, Machado A, Bittencourt H, Caramori ML, Sprinz editores. Antimicobianos Consulta Rápida. Artmed Editora S. A. 2008. p. 71-78.
8. Bonnet R. Growing group of Extended-Spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004. 48: 1-14.
9. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JLM, 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*. 2001. 45: 2269-2275.
10. Bonnet R, Sampaio JLM, Champs C, Sirot D, Chanal C, Sirot J. A Novel CTX-M β -lactamase in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000. 44: 1936-1942.
 11. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Review*. 2001. 14: 933-951.
 12. Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, Rahaj JJ, Brooks S, Cebular S, Quale J. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the Class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. *Clinical Infectious Diseases*. 2004. 39: 55-60.
 13. Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. From Brooklyn, New York. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005. 49: 776-778.
 14. Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Gullans C, Pettinato B, Karumudi U, Tolaney P, Quale J. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005. 49: 3018-3020.
 15. Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, Landman D. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and *in vitro* activity of polymyxin B and other agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005. 56: 128-132.
 16. Bush K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clinical Infectious Diseases*. 2001. 32: 1085-1089.
 17. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A Functional Classification Scheme for β -lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995. 39: 1211-1233.

18. Champs C, Sirot D, Chanal C, Bonnet R, Sirot J and The French Study Group. A 1998 survey of Extended-Spectrum β -Lactamases in *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000. 44: 3177-3179.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2004. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 14th ed., vol. 24 no 1. Approved standard M2-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. CLSI document MS 100-S17. Wayne, Pennsylvania.
21. Cormican MG, Marshall SA, Jones RN. Detection of Extended-Spectrum β -lactamase (ESBL) – producing strains by the Etest ESBL Screen. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996. 34: 1880-1884.
22. Coudron PE, Molland ES, Sandres CC. Occurrence and Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a Veterans Medical Center: seek and you may find. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997. 35: 2593-2597.
23. d’Azevedo PA, Gonçalves ALS, Musskopf MI, Ramos CG, Dias CAG. 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*. 2004. 8(5): 372-377.
24. Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of *Enterobacteriaceae* isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999-2005). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2006. 56: 367-372.
25. Emery CL, Weymouth LA. Detection and clinical significance of Extended-Spectrum β -lactamases in a Tertiary-Care Medical Center. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997. 35: 2061-2067.
26. Farmer III JJ, Boatwright KD, Janda JM. *Enterobacteriaceae* Introduction and Identification. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM Press; 2007. p. 649-669.

27. Freitas ALP, Lutz L, Barth AL. Antibiograma: Metodologia e Interpretação Clínica. Em Barros E, Machado A, Bittencourt H, Caramori ML, Sprinz editores. Antimicrobianos Consulta Rápida. Artmed Editora S. A. 2008. p. 79-90.
28. Freitas ALP, Machado DP, Soares FSC, Barth AL. 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. 2003. 34: 344-348.
29. Gangonué-Piéboji J, Bedenic B, Koulla-Shiro S, Randegger C, Adiogo D, Ngassam P, Ndumbe P, Hächler H. Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Yaounde, Cameroon. Journal of Clinical Microbiology. 2005. 43: 3273-3277.
30. Hall MAL, Fluit AC, Paauw A, Box ATA, Brisse S, Verhoef J. Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, Vitek 1, and Vitek 2 Automated Instruments for detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in multiresistant *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. Journal of Clinical Microbiology. 2002. 40: 3703-3711.
31. Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM, Dew III RB, Moland ES, Lockhart TJ, Thomson KS, Goering RV, Hanson ND. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004. 48: 4438-4440.
32. Jacoby GA, Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of Extended-Spectrum β -Lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1991. 35: 164-169.
33. Jett BD, Ritchie DJ, Reichley R, Bailey TC, Sahm DF. In vitro activities of various β -lactam antimicrobial agents against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Resistant to oxyimino cephalosporins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1995. 39: 1187-1190.
34. Konemam EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Color Atlas e Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed., Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997.
35. Landman D, Salvani JK, Bratu S, Quale J. Evaluation of techniques for detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in stool surveillance cultures. Journal of Clinical Microbiology. 2005. 43: 5639-5641.

36. Lee K, Chong Y, Shim HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2001. 7: 88-91.
37. Livermore DM, β -lactamases in Laboratory and Clinical resistance. *Clinical Microbiology Review*. 1995. 8: 557-584.
38. Livermore DM, Brown DFJ. Detection of β -lactamase-mediated resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001. 48: S59-S64.
39. Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, Perilli M, Stefani S, Amicosante G, Rossolini GM, 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*. 2006. 44: 1659-1664.
40. Martinez-Martinez L, Hernández-alléz S, Alberti S. *In vivo* selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to ceftioxin and expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996. 40: 342-3488.
41. Martinez-Martinez L, Pascual A, Hernández-alléz S. Roles of β -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999. 43: 1669-1673.
42. Mendes C, Oplustil C, Sakagami E, Turner P, Kiffer C, and the MYSTIC Brazil Group. Antimicrobial Suscetibility in Intensive Care Units: MYSTIC Program Brazil 2002. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2005. 9: 44-51.
43. Menozzi MG, Eigner U, Covan S, Rossi S, Somenzi P, Dettori G, Chezzi C, Fahr AM. Two-center collaborative evaluation of performance of the BD Phoenix Automated Microbiology System for identification and antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006. 44: 4085-4094.
44. Minarini LAR, Gales AC, Palazzo IC, Darini ALC. Prevalence of community-occurring Extended Spectrum β -Lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. *Current Microbiology*. 2007. 54: 335-341.
45. Miriagou V, Tzouvelekis LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated

- Class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003. 47: 1297-1300.
46. Moland ES, Hanson ND, Herrera VL, Black JA, Lockhart TJ, Hossain A, Johnson JA, Goering RV, Thomson KS. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003. 51: 711-714.
 47. Moland ES, Hong SG, Thomson KS, Larone DH, Hanson ND. *Klebsiella pneumoniae* isolate producing at least eight different β -lactamases, including AmpC and KPC β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007. 51: 800-801.
 48. Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005. 49: 4423-4424.
 49. Nataro JP, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Strockbine NA. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM Press; 2007. p. 670-687.
 50. Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwaber MJ, Schwartz D, Carmeli Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006. 50: 3098-3101.
 51. Nogueira KS, Higuti IH, Nascimento AJ, Terasawa LB, Oliveira S, Matos AP, Souza HAPHM, Cogo LL, Costa LMD. Occurrence of Extended-Spectrum Beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2006. 10:390-395.
 52. Nordmann P. Trends in β -lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. *Clinical Infectious Diseases*. 1998. 27: S100-S6
 53. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tabouti NR, Sinto SI. *Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica*. Editora Sarvier. São Paulo, Brasil, 2000.
 54. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Gottberg AV, Mohapatra S, Trenholme GM, Klugman KP, McCormack JG, Yu VL. Epidemiology of ciprofloxacin and its relationship to Extended-Spectrum β -

- lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*. 2000. 30: 473-478.
55. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-Determined AmpC-Type β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002. 46: 1-11.
 56. Pitout JDD, Laupland K. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infectious Diseases*. 2008. 8: 159-166.
 57. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Review*. 2007. 20: 440-458.
 58. Quinteros M, Radice M, Gardella M, Rodriguez MM, Costa N, Korbenfeld D, Couto E, Gutkind G and The Microbiology Study Group. Extended-Spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003. 47: 2864-2867.
 59. Rice LB, Bonomo RA. Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM Press; 2007. p. 1114-1145.
 60. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, Pérez-Cano R, Pascual A. Epidemiology and clinical features of infections caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. 42: 1089-1094.
 61. Rossi F, Andreazzi DB. Resistência Bacteriana Interpretando o antibiograma. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005.
 62. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2001. 5: 200-214.
 63. Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC and The Sentry Participants Group (Latin America). SENTRY Antimicrobial Surveillance Program report: Latin America and Brazilian results for 1997 through 2001. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2004. 8: 25-79.

64. Sanders CC, Barry AL, Washington JA, Shubert C, Moland ES, Traczewski MM, Knapp C, Mulder R. Detection of Extended-Spectrum- β -lactamase-producing members of the Family *Enterobacteriaceae* with the Vitek ESBL test. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996. 34: 2997-3001.
65. Sanders CC, Peyret M, Moland ES, Shubert C, Thompson KS, Boeufgras JM, Sanders WE. Ability of the VITEK 2 Advanced Expert System To Identify β -lactam Phenotypes in isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000. 38: 570-574.
66. 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*. 2003. 41: 1463-1468.
67. Schwaber MJ, Raney PM, Rasheed JK, Biddle JW, Williams P, McGowan Jr JE, Tenover FC. Utility of NCCLS Guidelines for identifying Extended-Spectrum β -Lactamases in Non-*Escherichia coli* and Non-*Klebsiella* spp. Of *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. 42: 294-298.
68. Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, Arnicosante G, Toniolo A, Fadda G, and The Italian ESBL Study group. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: implications for resistance to β -lactams and other antimicrobial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002. 46: 196-202.
69. Stefaniuk E, Baraniak A, Gniadkowski, Hryniewicz W. Evaluation of the BD Phoenix Automated Identification and Susceptibility Testing System in clinical microbiology laboratory practice. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2003. 22:479-485.
70. Steward CD, Rasheed JK, Hubert SK, Biddle JW, Raney PM, Anderson GJ, Williams PP, Brittain KL, Oliver A, McGowan JE, Tenover FC. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Extended-Spectrum β -lactamase detection methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001. 39: 2864-2872.

71. Stürenburg E, Mack D. Extended-Spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *Journal of Infection*. 2003. 47: 273-295.
72. Stürenburg E, Sobottka I, Feucht HH, Mack D, Laufs R. Comparison of BDPhoenix and Vitek2 automated antimicrobial susceptibility test systems for extended-spectrum beta-lactamase detection in *Escherichia coli* and *Klebsiella* species clinical isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2003. 45: 29-34.
73. Stürenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum β -lactamases in an *Enterobacteriaceae* strain collection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004. 54: 134-138.
74. Swenson JM, Patel JB, Jorgensen JH. Special Phenotypic Methods for Detecting Antibacterial Resistance. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM Press; 2007. p. 1173-1192.
75. Tavares W. *Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos*. 3ª ed., São Paulo. Ed Atheneu, 2001.
76. Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP, Carey RB, Stocker S, Lonsway D, Rasheed JK, Biddle JW, McGowan Jr JE, Hanna B. Carbapenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerging Infectious Diseases*. 2006. 12: 1209-1213.
77. Thomson, KS. Controversies about Extended-Spectrum and AmpC Beta-Lactamases. *Emerging Infectious Diseases*. 2001. 7: 333-336
78. Thomson KS, Sanders CC, Moland ES. Use of microdilution panels with and without β -lactamase inhibitors as a phenotypic test for β -lactamase production among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999. 43: 1393-1400.
79. Tzelepi E, Giakkooupi P, Sofianou D, Loukova V, Kemeroglou A, Tsakris A. Detection of Extended-Spectrum β -lactamases in Clinical Isolates of

- Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. Journal of Clinical Microbiology. 2000. 38: 542-546.
80. Tzouvelekis LS, Gazouli M, Prinarakis EE, Tzelepi E, Legakis NJ. Comparative evaluation of the inhibitory activities of the novel penicillanic acid sulfone Ro 48-1220 against β -lactamases that belong to groups 1, 2b, and 2be. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1997. 41: 475-477.
 81. Tzouveleskis LS, Vatopoulos AC, Katsanis G, Tzelepi E. Rare case of failure by an automed system to detect extended-spectrum β -lactamases in a cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate. Journal of Clinical Microbiology. 1999. 37: 2388.
 82. Venezia SN, Munz OH, Schwartz D, Turner D, Kuzmenko B, Carmeli Y. Occurrence and phenotypic characteristics of extended-spectrum β -lactamases among members of the Family *Enterobacteriaceae* at the Tel-Aviv Medical Center (Israel) and evaluation of diagnostic tests. Journal of Clinical Microbiology. 2003. 41: 155-158.
 83. Vercauteren E, Descheemaeker P, Ieven M, Sanders CC, Goossens H. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum β -lactamases and their prevalence among blood isolates of *E. coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgium Teaching Hospital. Journal of Clinical Microbiology. 1997. 35: 2191-2197.
 84. Villegas MG, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Vallejo M, Quinn JP and the Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2007. 51: 1553-1555.
 85. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, Quinn JP and the Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First detection of the plasmid-mediated Class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2006. 50: 2880-2882.
 86. Wiegand I, Geiss HK, Mack D, Stürenburg E, Seifert H. Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase among *Enterobacteriaceae* by use of semiautomated

- microbiology systems and manual detection procedures. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007. 45: 1167-1174.
87. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. *Clinical Infectious Diseases*. 2001. 32 (Suppl 2): S94-103.
 88. Woodford N, Tierno Jr PM, Young K, Tysall L, Papelou MFI, Ward E, Painter RE, Suber DF, Shungu D, Silver LL, Inglima K, Kornblum J, Livermore DM. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing Class A β -Lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004. 48: 4793-4799.
 89. Yan JJ, Ko WC, Wu HM, Tsai SH, Chuang CL, Wu JJ. Complexity of *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant to both cefhamycins and Extended-Spectrum cephalosporins at a Teaching Hospital in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. 42: 5337-5340.
 90. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001. 45: 1151-1161.
 91. Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Domenech-Sanchez A, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003. 47: 3881-3889.

**Evaluation of β -lactamases (ESBL and KPC) among the *Enterobacteriaceae*
from a university hospital in southern Brazil**

Katia Ruschel Pilger de Oliveira, Afonso Luís Barth*

Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica, Hospital
de Clínicas de Porto Alegre

* Corresponding author. Mailing address:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular

Rua Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre – RS

Brasil – 90.035-903

E-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br

Abstract:

An important mechanism of resistance among the *Enterobacteriaceae* to β -lactam antibiotics is related to the production β -lactamases, in particular, "Extended Spectrum β -Lactamases" (ESBL) and, more recently, "*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase" (KPC). The aim of this study was to evaluate the methods used for ESBL detection as well as to establish the prevalence of ESBL among members of the *Enterobacteriaceae* family. Complementary, KPC was also evaluated among isolates non-susceptible to ertapenem. We analyzed 731 isolates of the *Enterobacteriaceae* family obtained from clinical samples from patients admitted to a teaching hospital in southern Brazil. The prevalence of ESBL producing isolates of the *Enterobacteriaceae* was 26.8% (196/731). *Providencia* spp. displayed the higher prevalence (91.7% - 11/12), followed by *Klebsiella pneumoniae* (56.7% - 59/104), and *Enterobacter* spp. (40.7% - 48/118). Among the antibiotics used in the Phenotypic Confirmatory Test, cefepime detected the highest number of the ESBL producing isolates (90.6% - 183/202). According to the genotypic method (PCR with specific primers for ESBL), it was possible to detect *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} in 89.6% (208/232), 59% (137/232) and 37.9% (88/232) of the isolates, respectively. ESBL isolates proved to be more resistant to antibiotics in relation to the non-ESBL producers ($p < 0.05$) with exception to the carbapenems (imipenem and meropenem) which retained full efficacy in vitro for all isolates (ESBL and non-ESBL). Other antibiotics showed only a reduced in vitro activity against to ESBL producing isolates: ampicillin (35.1%), doxycycline (29.9%) and piperacillin/tazobactam (28%). KPC was evaluated among 39 ESBL-producers with reduced susceptibility to ertapenem but none of them proved to carry the *bla*_{KPC} gene regardless any positivity result in phenotypic method (Modified Hodge Test).

Keywords: *Enterobacteriaceae*, ESBL, KPC, resistance

Introduction:

An important mechanism of resistance among members of the *Enterobacteriaceae* to β -lactam antibiotics is the production of β -lactamases, in particular, Extended Spectrum β -lactamases (ESBL). ESBL are derived from the enzymes TEM-1, TEM-2, and SHV-1 due to point mutations with the substitution of one to four amino acids which increase the hydrolytic activity of the original enzymes (20). Among the ESBL enzymes that are not derived from the TEM and SHV, the CTX-M are the most prevalent β -lactamases (32).

ESBL enzymes presented plasmidial origin and hydrolyze almost all the β -lactams, except carbapenems and cephamycins (cefoxitin); however they are not inducible enzymes. Another important characteristic of the ESBL is that they are inhibited by compounds such clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam (37). Moreover, the plasmid that includes the gene that encodes for ESBL may also contains genes that encode for resistance to other antimicrobial agents such as aminoglycosides, sulfonamides, tetracycline, quinolones, and chloramphenicol. (17, 37).

The prevalence of these enzymes, as well as their phenotypic characteristics may vary among different geographical regions (3, 20, 26). The ESBL occur mainly in *Klebsiella* spp. and *E. coli*, however they can also be produced by other members of the *Enterobacteriaceae* such as *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Salmonella* spp., and *Serratia* spp. (3, 11, 13, 15, 21, 26, 35).

The tests used in the laboratorial routine to determine susceptibility, may not be able to detect ESBL isolates, making necessary specific tests to identify these

enzymes. The Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) establishes screening and confirmatory tests for the determination of ESBL in *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, and *P. mirabilis*. However, there is no standard protocols for the other genera of the *Enterobacteriaceae* (9).

Besides ESBL, it has been reported recently another β -lactamase enzyme in *K. pneumoniae*: the KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), which hidrolise all β -lactam antibiotics, including carbapenems (30). Among the carbapenems, the ertapenem is an effective marker in the susceptibility test for KPC detection. This may be due to the fact that the resistance of this antibiotic is not affected by the bacterial inoculum used in the tests (5). The majority of the cases of the KPC producing isolates were reported in *K. pneumoniae* from the United States. However, there are reports of this enzyme in other places and/or microorganisms such as *E.coli* (12, 25), *K. oxytoca* (12, 42), *Enterobacter* spp. (4, 12, 16), *Citrobacter* spp. (12, 39), *S. marcescens* (12), *Salmonella* spp. (23), and *P. aeruginosa* (39).

The objective of this study is to determine the prevalence of ESBL in different genera of the *Enterobacteriaceae* family in a University hospital in southern Brazil. We also analyzed the screening and confirmatory tests established by CLSI as well as the PCR technique to detect ESBL in the *Enterobacteriaceae*. Furthermore, we search for the KPC enzyme in isolates non-susceptible to ertapenem.

Materials and Methods:

Isolates: a total of 731 isolates from *Enterobacteriaceae* were analyzed. The isolates were obtained from clinical samples of patients admitted to the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA), between September 2005 and August 2006. All isolates were identified in the hospital's microbiology laboratory using conventional biochemical tests and frozen at -80°C. This study included only one clinical isolated per patient, or more than one isolate when obtained after a three day period. The isolates were obtained from urine (48.3%), secretions (16.1%), sputum (11.6%), blood (9.4%) and others (14.5%).

Antimicrobial Susceptibility Test (AST): the AST was performed on Mueller Hinton Agar (bioMerieux®), according to the CLSI standards (8) using the following antibiotics (Oxoid®): Nalidixic Acid 30µg (NAL), Amikacin 30µg (AMI), Aztreonam 30µg (ATM), Ceftazidime 30µg (CAZ), Ceftriaxone 30µg (CRO), Ciprofloxacin 5µg (CIP), Doxycycline 30µg (DOX), Gentamicin 10µg (CN), Imipenem 10µg (IMP), Meropenem 10µg (MER). Nitrofurantoin 300µg (NIT), Norfloxacin 10µg (NOR), Piperacillin/Tazobactam 100/10µg (PTZ), Trimethoprim/Sulfamethoxazole 1,25/23,75µg (SXT), Ticarcilin/Clavulanic Acid 75/10µg (TIC), Tobramycin 10µg (TOB).

ESBL Screening Test (ST): the decrease in the inhibition zones to any of the following antibiotics ATM (≤ 27 mm), CAZ (≤ 22 mm) or CRO (≤ 25 mm), was considered as a positive ST (9).

ESBL Phenotypic Confirmatory Test (PCT): discs containing Aztreonam/Clavulanic acid 30/10µg (ATM/CA), Cefepime/ Clavulanic acid 30/10µg (FEP/CA), Cefotaxime/Clavulanic acid 30/10µg (CTX/CA), Ceftazidime/Clavulanic

acid 30/10 μ g (CAZ/CA) e Ceftriaxone/Clavulanic acid 30/10 μ g (CRO/CA), we prepared by the addition of 10 μ g of clavulanic acid (CA) to discs obtained commercially. These combined discs were not stored but were used within 30 minutes to 1 hour after prepared. For each bacterial isolate with a positive ST a suspension (0,5 McFarland) was prepared and inoculated onto a Mueller Hilton (bioMerieux®) agar plate. The combined discs as well as the ATM, CAZ, CRO, Cefotaxime (CTX), and Cefepime (FEP) discs were added to the plate. The plates were incubated at 36°C, at room atmosphere for 18 to 24 hours. An increase of 5mm or more in the inhibition zone of any disc containing CA in comparison to the same antibiotic without CA indicated a positive PCT test.

KPC Screening Test: all isolates with positive ST for ESBL were evaluated for ertapenem susceptibility by disc diffusion according to the CLSI standards (8). Isolates classified as “intermediate” or “resistant” to ertapenem were submitted to the detection of KPC by the Modified Hodge Test as well as by PCR for *bla*_{KPC}.

Modified Hodge Test: a suspension of 0,5 McFarland of *E.coli* ATCC 25922 was diluted (1:10) and inoculated onto a Mueller-Hilton agar (bioMerieux®) plate. An carbapenemic antibiotic (imipenem or meropenem) disc was placed in the center of the plate, and the isolated to be tested was streaked from the edge of the disc to the edge of the plate. Any growth of the *E.coli* within the inhibition zone around the streak after an overnight incubation period was interpreted as a positive Modified Hodge Test (19) – Figure.

Thermal Lyses for PCR: a bacterial suspension equivalent to 2.0 McFarland was prepared in a 500 μ L TE solution. The suspension was heated to 100°C for 10

minutes, cooled down and then centrifuged at 1000 RPM for 3 minutes. The supernatant (extrated DNA) was frozen at -20°C.

PCR for *bla*_{CTX-M}: the following primers were used: 5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3' and 5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3' (28). The PCR was performed using a volume of 25µL of the reaction buffer containing MgCl₂ 1,5mM (JMRHoldings®), 0.25mM of each dNTP (ABgene®), 1.25U *Taq* of DNA polimerase (Super-Therm, JMRHoldings®), 5µM of the primer (IDT®), and 5µL of the extrated DNA. The amplification was carried on a Technne thermal cycler (FlexiGene®) according to the following: 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 60°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute followed by a final extension of 72°C for 10 minutes.

PCR for *bla*_{SHV}: the following primers were used: 5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3' and 5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3' (7). The PCR was performed using a volume of 25µL of the reaction buffer containing MgCl₂ 1.5mM (JMRHoldings®), 0.25mM of each dNTP (ABgene®), 1.25U *Taq* of DNA polimerase (Super-Therm, JMRHoldings®), 15µM of the primer (IDT®), and 5µL of extracted DNA. The amplification was carried on a Technne thermal cycler (FlexiGene®) according to the following conditions: initial denaturation at 94°C for 1 minute, 35 cycles at 94°C for 1 minute, 62°C for 1 minute, followed by a final extension at 72°C for 10 minutes.

PCR for *bla*_{TEM}: the following primers were used: 5'-GGGGAGCTCATAAAATTCTTGAAGAC-3' and 5'-GGGGGATCCTTACCAATGCTT AATCA-3' (35). The PCR was performed using a volume of 25µL of the reaction buffer containing MgCl₂ 1.5mM (JMRHoldings®), 0.25mM of each dNTP (ABgene®), 2.5U *Taq* of DNA polimerase (Super-Therm, JMRHoldings®), 5µM of the primer

(IDT®), and 5µL of extracted DNA. The amplification was carried on a Technne thermal cycler (FlexiGene®) according to the following conditions: 30 cycles at 95°C for 30 seconds, 42°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute.

Genotypic Confirmatory Test (GCT): The GCT was considered positive whether a positive result for any of the three ESBL genes (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}) was found.

PCR para *bla*_{KPC}: the following primers were used: 5'- TGTCAC TGTATCGCCGTC – 3' e 5'- CTCAGTGCTCTACAGAAAACC – 3' (41). The PCR was performed using a volume of 25µL of the reaction buffer containing MgCl₂ 1.5mM (JMRHoldings®), 0.25mM of each dNTP (ABgene®), 1.5U *Taq* of DNA polimerase (Super-Therm, JMRHoldings®), 10µM of the primer (IDT®), and 5µL of extracted DNA. The amplification was carried on a Technne thermal cycler (FlexiGene®) according to the following conditions: initial denaturation at 95° C for 5 minutes, 30 cycles at 95° C for 1 minute, 58° C for 30 seconds, and at 72° C for 1 minute and 30 seconds, final extension at 72° C for 10 minutes.

Detection of the PCR product: the PCR amplification product (10 µL) were submitted to electrophoresis on a 2% agarose gel with 0.5µg/mL of ethidium bromide. After a run of around 1 hour the gel was visualized under ultraviolet light. The presence of fragments of 141pb, 550pb, 860pb, and 879pb were considered positive for the genes: *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{KPC}, respectively.

Statistical analysis: the chi-square test was used to compare the results of susceptibility between ESBL producers and non-producers.

Results:

Among the 731 isolates of *Enterobacteriaceae* that were evaluated, 258 showed a decrease in the susceptibility to ATM, CAZ, or CRO and were considered to be possible for ESBL by the Screening Tests (ST). Among these isolates, 202 were confirmed to be ESBL producers with the use of clavulanic acid combined discs – Phenotypic Confirmatory Test (PCT) (Table 1). Therefore, it was possible to establish a prevalence of 27.6% of ESBL producing isolates in the *Enterobacteriaceae* family when PCT was used. Whether only the PCR technique was used (Genotypic Confirmatory Test – GCT), the prevalence of ESBL producing isolates in the *Enterobacteriaceae* family was 31.7%. However, whether both confirmatory tests (PCT and GCT) were considered simultaneously, the prevalence of the ESBL producing isolates was 26.8%. We, therefore, will consider, in this study, as an definitely ESBL producer any isolate with both PCT and GCT positives.

Providencia spp. was the genus that presented the higher percentage of ESBL as from the 12 isolates evaluated, 11 were considered to be ESBL producing. Among the other genus with high ESBL frequency, *Klebsiella pneumoniae* presented a prevalence of 56.7%, followed by *Enterobacter* spp. with 40.7% (Table 1).

Cefepime, in the PCT, proved to be the antibiotic which was able to detect the highest percentage of ESBL producing isolates (90.6%) (Table 2). On the other hand, among the PCT positive isolates detected by the other antibiotics, only 19 were not detected with cefepime: five *Citrobacter* spp., five *Enterobacter* spp., two *E. coli*, four *K. pneumoniae*, one *M. morgani*, one *P. mirabilis* and one *Providencia* spp. The use of cefepime was essential for *Enterobacter* spp. because 22 of the isolates of this genus (48.9%) were only detected as ESBL when this substrate was used. However, for *Citrobacter* spp., cefepime was the substrate that detected the lowest number of

isolates (37.5%) as ESBL producing. It is of note that at least one of the three ESBL genes (SHV, TEM or CTX-M) was detected among the 97.2% positive PCT cases detected as ESBL by cefepime.

Generally, ceftazidime was the substrate which presented the majority of the negative results, detecting only 39.1% of the isolates as ESBL. In the majority of the cases (96.7%) of positive PCT which were not detected by ceftazidime it was possible to identify at least one of the three genes by PCR. On the other hand, ceftazidime was able to detect all ESBL producing isolates among *Citrobacter* spp. (Table 2).

As the cefepime with clavulanic acid (FEP/CA) was the combination that detected the highest number of ESBL by the PCT (90.6%), we evaluated which other combination could be used, concurrently to FEP/CA (association), to increase the detection of ESBL. The use of the associations of FEP/CA + CTX/CA or FEP/CA + CRO/CA displayed the high percentage of detection of ESBL in the *Enterobacteriaceae* (95%). The other associations (FEP/CA + ATM/CA and FEP/CA + CAZ/CA) detected 94.5% as ESBL producers. It has to be mentioned that the CLSI has established the use of CAZ/CA and CTX/CA association for ESBL detection and whether we had used only this association in our study we would fail to detect several isolates as ESBL producers. In fact, the association of CAZ/CA and CTX/CA was able to detect only 79.2% of the isolates as ESBL producers. This association was less effective for *Enterobacter* spp., because it detected only 50% of the isolates of this genus as ESBL producers.

The PCR technique with ESBL primers (GCT) was used to evaluate all isolates with a positive ST and mostly isolates (67.3%) presented two or three genes concomitantly in contrast to 32.7% of the isolates which presented only one gene. It was possible to detect *bla*_{TEM} in 89.6% of the isolates, *bla*_{SHV} in 59% of the isolates

and *bla*_{CTX-M} in 37.9% of the isolates. All of the *Providencia* spp. isolates presented both *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM} and mostly (98%) of the *Enterobacter* spp. presented the *bla*_{TEM} gene (Table 3).

The results of the PCT and GCT were compared and it was possible to establish an agreement of 83.7% between these methods. In fact, only for *Providencia* spp. there was a total agreement (Table 4). Considering all the other *Enterobacteriaceae* it was possible to observe that only six isolates presented a positive PCT and no PCR product with the ESBL primers (negative GCT). In an opposite way, 36 isolates which presented a positive GCT were negative for ESBL according to the PCT (Table 4). The *bla*_{CTX-M} gene was detected only in isolates with positive PCT whereas the *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} genes were equally found in isolates with negative PCT.

All 258 isolates with a positive ST were tested for ertapenem susceptibility by the disc diffusion and a total of 39 proved to be resistance (full or intermediate) to this antibiotic: 23 *Enterobacter* spp., 7 *E. coli*, 5 *K. pneumoniae* and 4 *Citrobacter* spp. These were submitted to the Hodge Modified Test but only 8 isolates displayed a result compatible with positivity (FIGURE). It has to be mentioned that 9 isolates presented inconclusive results. The *bla*_{KPC} gene was not detected in any of the 39 isolates resistant to ertapenem.

We were able to compare the susceptibility profile of all isolates which were considered ESBL positive (PCT and GCT positive) with the isolates non ESBL producers. The ESBL producers isolates proved to be statistically more resistant to all antimicrobials ($p < 0.05$). In fact, only the carbapenems (IMP and MER) presented total efficacy in vitro, as all ESBL producing *Enterobacteriaceae* were susceptible to these antimicrobials. The other antibiotics presenting considerable percentage of

susceptibility for ESBL producers included: AMI (35.1% of susceptibility), DOX (29.9% of susceptibility), and PTZ (28% of susceptibility) (Table 5).

Discussion:

In this study the prevalence of ESBL producers among *Enterobacteriaceae* was 26.8% considering both PCT and GCT methods. This percentage is similar to other studies carried out in Brazil: Mendes et al., in a multicentric study, found a prevalence of 29% (22) and Nogueira et al., in Curitiba, found a prevalence of 24% (27). The prevalence of ESBL in *Enterobacteriaceae* from Brazil is, however, very high when compared with the prevalence of ESBL in studies from other countries: in France in 1998 the prevalence was 3.2% (6) and in Italy in 2003 it was 7.4% (21).

The prevalence of ESBL among *K. pneumoniae* (56.7%) and in *E. coli* (14.4%), obtained in this study, was higher than that described for Freitas et al. (*K.pneumoniae* 40%; *E.coli* 13%) that carried out a study in the same hospital in 1998 (14). This increase may be related to the use of different techniques in the two studies. However, it is also possible that the difference of ESBL in our institution may reflect a real increase in the prevalence of these bacteria during the previous years.

Most of the data on prevalence of ESBL refers to *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* and *P. mirabilis*, most probably due to the fact that CLSI established standards only for these four species. In this study, however, the prevalence of ESBL was also evaluated for other members of the *Enterobacteriaceae* family. In fact, the prevalence of ESBL among other members of *Enterobacteriaceae* was also considerable high. *Providencia* spp. was the isolate with the highest prevalence of ESBL (91.7%), which is much higher than the prevalence observed in other studies 36.7% (21), 23% (26) and 18.2% (31) for this species. For *Enterobacter*

spp., *M. morgani* and *Citrobacter* spp. the prevalence of ESBL in this study was also high (40,7%, 29,6% and 25,0%, respectively) but is in accordance with the data of Nogueira et al. in Curitiba (27). Only one isolate of *Serratia* spp. was detected like producer of ESBL (3.0%), this predominance is lower than in other studies (14% to 33.3 %) (26, 27, 31).

Although the screening test (ST) used to detect ESBL is standardized only for *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* and *P. mirabilis*, Schwaber et al. used the screening test to detect ESBL among other members of *Enterobacteriaceae* and found 2.2 % of ESBL positive (34). On the other hand, the study of Nogueira et al. indicated a prevalence of 78% of ESBL positive among the isolates of *Enterobacteriaceae* with ST positive (27). In this study, 75.9% of isolates with ST positive were confirmed as ESBL producers (PCT and PCG). Therefore, considering that a large number of other *Enterobacteriaceae* isolates proved to be ESBL producers, we recommend that all members of the *Enterobacteriaceae* should be tested for ESBL production using a ST.

The use of the combined discs of cefepime with clavulanic acid is not standardized by CLSI. However, this drug can be used to the detection of ESBL in isolates that also harbor the AmpC enzyme (38) because the expression of high levels of AmpC has a minimum effect on the cefepime activity. The use of FEP would be more important in *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Providencia* spp., *Proteus* spp. and *M. morgani* which are microorganisms that frequently produce AmpC β -lactamases. When FEP/CA was used, in this study, we obtained a percentage of ESBL detection of 90.6% which was much higher than other combined discs CRO (77.2%), CTX (75.2%), ATM (72.7%) and CAZ (39.0%). The same results were observed by Quinteros et al. which used FEP/CA and detected an increased number

(93%) of ESBL producers when compared to the other antimicrobials (CTX/CA, 60% and CAZ/CA, 53%) (31). In our study, the FEP/CA was particularly important for ESBL detection among the isolates of the *Enterobacter* genus as 48.9% of the isolates were detected as ESBL only with cefepime.

The sensitivity of the phenotypic tests used to detect ESBL (ST or PCT) is related to the antimicrobials used in the test as the ESBL enzymes may have preferential substrates for hydrolyse. Therefore, the prevalence of ESBL enzymes may vary according to different institution and geographical areas. In the institution evaluated in this study, the association of substrates (CAZ/CA + CTX/CA), which is standardized by CLSI, detected only 79.2% of the isolates as ESBL producers. However, if the FEP/CA combination was associated with any other combination there was an increase in the percentage of detection of ESBL to 94.5% or higher. Therefore, whether we used only the association of substrates as recommended by CLSI we would have not detected around 20% of the ESBL producers.

Among the isolates with a positive GCT we were able to find a total of 76 (32.7%) isolates harboring only one gene. Luzzaro et al. performed a study in Italy which evaluated the distribution of different genes in the ESBL producing *Enterobacteriaceae* and found more than 66% of the isolates harboring only one gene (21). Nonetheless, several other studies have reported isolates harboring more than one β -lactamase (21, 24, 29, 33-36, 40) as we found in the majority (67.3%) of the isolates in this study. Likewise, it was possible to detect *bla*_{TEM} in 89.6% of the isolates, *bla*_{SHV} in 59% of the isolates, and *bla*_{CTX-M} in 37.9% of the isolates. Luzzaro et al. also found *bla*_{TEM} to be the most prevalent gene (over 56%) followed by *bla*_{SHV} (over 32%) and *bla*_{CTX-M} (19.7%) (21).

Noteworthy, there were only 6 isolates that presented a positive PCT and a negative GCT and these discrepancies most likely occurred due to the fact that only three enzymes were evaluated by PCR (CTX-M, SHV, and TEM). There are many other enzymes displaying extended-spectrum activity (BES-1, CME-1, GES-1, IBI-1, IBI-2, PER-1, PER-2, VEB-1, SFO-1, and derivatives of OXA) but they appear not be very frequent among *Enterobacteriaceae* (32, 37).

On the other hand, there were 36 isolates which presented a positive GCT and a negative PCT result. Since none of these isolates harbored *bla*_{CTX-M} gene, the results could be considered as false positive of the PCR technique for the *bla*_{SHV} and *bla*_{TEM} genes. Similarly, Minarini et al. found ESBL isolates by phenotypic methods and PCR which did not prove to present the enzyme by IEF. These authors considered that the ESBL gene (detected by PCR) may not be expressed by the bacteria (24). In fact, these false positive results can be attributed to the fact that the primers may not be specific for the extended spectrum genes but also cross react with the narrow-spectrum β -lactamases (TEM 1, TEM 2, and SVH 1). Therefore, we understand that the PCR methods using primers for *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV} should not be used for ESBL detection unless they are followed by sequencing analysis. In fact, we were able to perform sequencing in 3 amplicons from isolates GCT *bla*_{TEM} positive and PCT negative and they all proved to be compatible with the *bla*_{TEM1} gene.

Among the isolates with decreased susceptibility to ertapenem, a total of 20.5% (8/39) presented a positive Modified Hodge Test but none of them proved to harbor the *bla*_{KPC} gene by PCR. This result indicates that the Modified Hodge Test is not specific for the *bla*_{KPC} enzyme as originally proposed by Anderson et al. (1). The fact that none of the isolates presented the *bla*_{KPC} gene may indicate that the prevalence of this enzyme is low outside of the United States.

It was also shown in this study that the *Enterobacteriaceae* ESBL producers presented significantly more resistance to aminoglycosides, sulfonamides, tetracycline, quinolones, and β -lactams/ β -lactamase inhibitor in comparison to the non ESBL producers, as reported in many other studies (2, 10, 15, 18).

In conclusion, the presence of ESBL producers isolates among *Enterobacteriaceae* is considerably high in our institution and this pose as a problem for the infection control team. Therefore, it is necessary to perform screening and confirmatory ESBL detection tests in all isolates from the *Enterobacteriaceae* family in the routine microbiology laboratory.

References

01. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, Carey RB, Thompson A, Stocker S, Limbago B, Patel JB. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007. 45: 2723-2725.
02. Babini GS, Livermore DM. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. Collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000. 45: 183-189.
03. Braford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Review*. 2001. 14: 933-951
04. Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. From Brooklyn, New York. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005. 49: 776-778.
05. Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Gullans C, Pettinato B, Karumudi U, Tolaney P, Quale J. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005. 49: 3018-3020.
06. Champs C, Sirot D, Chanal C, Bonnet R, Sirot J and The French Study Group. A 1998 survey of Extended-Spectrum β -Lactamases in *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000. 44: 3177-3179.
07. Chia JH, Chu C, Su LH, Chiu CH, Kuo AJ, Sun CF, Wu TL. Development of a multiplex PCR and SHV Melting-Curve Mutation Detection System for detection of some SHV e CTX-M β -Lactamases of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005. 43: 4486-4491.
08. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2004. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 14th ed., vol. 24 no 1. Approved standard M2-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
09. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. CLSI document MS 100-S17. Wayne, Pennsylvania.

10. Cormican MG, Marshall SA, Jones RN. Detection of Extended-Spectrum β -lactamase (ESBL) – producing strains by the Etest ESBL Screen. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996. 34: 1880-1884.
11. Coudron PE, Molland ES, Sandres CC. Occurrence and Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a Veterans Medical Center: seek and you may find. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997. 35: 2593-2597.
12. Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of *Enterobacteriaceae* isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999-2005). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2006. 56: 367-372.
13. Emery CL, Weymouth LA. Detection and clinical significance of Extended-Spectrum β -lactamases in a Tertiary-Care Medical Center. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997. 35: 2061-2067.
14. Freitas ALP, Machado DP, Soares FSC, Barth AL. 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*. 2003. 34: 344-348.
15. Gangonué-Piéboji J, Bedenic B, Koulla-Shiro S, Randegger C, Adiogo D, Ngassam P, Ndumbe P, Hächler H. Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Yaounde, Cameroon. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005. 43: 3273-3277.
16. Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM, Dew III RB, Molland ES, Lockhart TJ, Thomson KS, Goering RV, Hanson ND. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004. 48: 4438-4440.
17. Jacoby GA, Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of Extended-Spectrum β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1991. 35: 164-169.
18. Jett BD, Ritchie DJ, Reichley R, Bailey TC, Sahn DF. In vitro activities of various β -lactam antimicrobial agents against clinical isolates of *Escherichia coli* and

- Klebsiella* spp. Resistant to oxyimino cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995. 39: 1187-1190.
19. Lee K, Chong Y, Shim HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2001. 7: 88-91.
 20. Livermore DM, β -lactamases in Laboratory and Clinical resistance. *Clinical Microbiology Review*. 1995. 8: 557-584.
 21. Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, Perilli M, Stefani S, Amicosante G, Rossolini GM, 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*. 2006. 44: 1659-1664.
 22. Mendes C, Hsiung A, Kiffer C, Oplustil C, Sinto S, Mimica I, Zoccoli C and Mystic Study Group. Evaluation of the in vivo activity of 9 antimicrobials against bacterial strains isolated from patients in intensive care units in Brazil: MYSTIC Antimicrobial Surveillance Program. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2000. 4:236-244.
 23. Miriagou V, Tzouvelekis LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated Class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003. 47: 1297-1300.
 24. Minarini LA, Gales AC, Palazzo IC, Darini AL. Prevalence of community-occurring Extended Spectrum β -Lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. *Current Microbiology*. 2007. 54: 335-341
 25. Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwaber MJ, Schwartz D, Carmeli Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006. 50: 3098-3101.
 26. Navon-Venezia S, Munz OH, Schwartz D, Turner D, Kuzmenko B, Carmeli Y. Occurrence and phenotypic characteristics of extended-spectrum β -lactamases among members of the Family *Enterobacteriaceae* at the Tel-Aviv Medical

- Center (Israel) and evaluation of diagnostic tests. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003. 41: 155-158.
27. Nogueira KS, Higuti IH, Nascimento AJ, Terasawa LB, Oliveira S, Matos AP, Souza HAPHM, Cogo LL, Costa LMD. Occurrence of Extended-Spectrum Beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2006. 10:390-395.
 28. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, Bonomo RA and the International Klebsiella Study Group. Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-Type β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003. 47: 3554-3560.
 29. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Gottberg AV, Mohapatra S, Trenholme GM, Klugman KP, McCormack JG, Yu VL. Epidemiology of ciprofloxacin and its relationship to Extended-Spectrum β -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*. 2000. 30: 473-478.
 30. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Review*. 2007. 20: 440-458.
 31. Quinteros M, Radice M, Gardella M, Rodriguez MM, Costa N, Korbenfeld D, Couto E, Gutkind G and The Microbiology Study Group. Extended-Spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003. 47: 2864-2867.
 32. Rice LB, Bonomo RA. Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM Press; 2007. p. 1114-1145.
 33. 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*. 2003. 41: 1463-1468.
 34. Schwaber MJ, Raney PM, Rasheed JK, Biddle JW, Williams P, McGowan Jr JE, Tenover FC. Utility of NCCLS Guidelines for identifying Extended-Spectrum β -

- Lactamases in Non-*Escherichia coli* and Non-*Klebsiella* spp. Of *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. 42: 294-298.
35. Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, Arnicosante G, Toniolo A, Fadda G, and The Italian ESBL Study group. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: implications for resistance to β -lactams and other antimicrobial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002. 46: 196-202.
36. Steward CD, Rasheed JK, Hubert SK, Biddle JW, Raney PM, Anderson GJ, Williams PP, Brittain KL, Oliver A, McGowan JE, Tenover FC. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Extended-Spectrum β -lactamase detection methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001. 39: 2864-2872.
37. Stürenburg E, Mack D. Extended-Spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *Journal of infection*. 2003. 47: 273-295.
38. Thomson, KS. Controversies about Extended-Spectrum and AmpC Beta-Lactamases. *Emerging Infectious Diseases*. 2001. 7: 333-336
39. Villegas MG, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Vallejo M, Quinn JP and the Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007. 51: 1553-1555.
40. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. *Clinical Infectious Diseases*. 2001. 32 (Suppl 2): S94-103.
41. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001. 45: 1151-1161.
42. Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Domenech-Sanchez A, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca*

. harboring carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003. 47: 3881-3889.

Table 1: Results of ESBL detection methods in *Enterobacteriaceae*

Isolates	Number of isolates	ST Positive		PCT Positive		GCT Positive		PCT and GCT Positives	
		n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Providencia</i> spp.	12	11	91,7	11	91,7	11	91,7	11	91,7
<i>K. pneumoniae</i>	104	66	63,5	59	56,7	65	62,5	59	56,7
<i>Enterobacter</i> spp.	118	64	54,2	50	42,4	55	46,6	48	40,7
<i>M. morganii</i>	27	14	51,8	8	29,6	13	48,2	8	29,6
<i>Citrobacter</i> spp.	32	18	56,2	8	25,0	15	46,8	8	25,0
<i>P. mirabilis</i>	78	15	19,2	14	17,9	15	19,2	14	17,9
<i>E. coli</i>	327	59	18,0	49	14,9	57	17,4	47	14,4
<i>Serratia</i> spp.	33	11	33,3	3	9,1	1	3,0	1	3,0
Total	731	258	35,3	202	27,6	232	31,7	196	26,8

ST = Screening Test; PCT = Phenotypic Confirmatory Test; GCT = Genotypic Confirmatory Test

Table 2: Antimicrobials used in the Phenotypic Confirmatory Test to detect ESBL producers

Isolates	PCT	Antimicrobials				
		ATM	CAZ	CTX	CRO	FEP
<i>Providencia</i> spp.	11	11	7	11	10	10
<i>K. pneumoniae</i>	59	55 (1) ^a	25	54	55	55 (1)
<i>Enterobacter</i> spp.	50	21 (1)	12	22 (1)	23 (1)	45 (22)
<i>M. morgani</i>	8	5	3	7	8	7
<i>Citrobacter</i> spp.	8	5	8 (2)	6	6	3
<i>P. mirabilis</i>	14	7	2	10	12	13 (2)
<i>E. coli</i>	49	40	21	39	39	47 (5)
<i>Serratia</i> spp.	3	3	1	3	3	3
Total	202	147 (2)	79 (2)	152 (1)	156 (1)	183 (30)

PCT = Phenotypic Confirmatory Test; ATM = Aztreonam; CAZ = Ceftazidime; CTX = Cefotaxime; CRO = Ceftriaxone; FEP = Cefepime

^a Only one isolate was detected using aztreonam alone

Table 3: ESBL-producing *Enterobacteriaceae*: distribution of TEM, SHV and CTX-M genes

Isolates	GCT Positive	Only			Only			<i>bla</i> _{CTX-M} and <i>bla</i> _{SHV}		<i>bla</i> _{SHV} and <i>bla</i> _{TEM}		<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV} and <i>bla</i> _{TEM}	
		<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}						
<i>Providencia</i> spp.	11	11	0	11	0	0	0	0	11	0	0		
<i>K. pneumoniae</i>	65	30	58	58	0	5	3	2	4	27	24		
<i>Enterobacter</i> spp.	55	9	9	54	0	1	38	0	8	7	1		
<i>M. organii</i>	13	8	12	12	0	0	0	1	1	5	6		
<i>Citrobacter</i> spp.	15	2	10	13	0	2	5	0	0	6	2		
<i>P. mirabilis</i>	15	12	5	11	4	0	2	0	4	1	4		
<i>E. coli</i>	57	16	43	48	1	5	10	3	3	26	9		
<i>Serratia</i> spp.	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1		
Total	232	88	137	208	5	13	58	6	31	72	47		

Table 4: Discrepancies between PCT and GCT

Isolates	PCT Positive	GCT Positive	PCT Positive and GCT Negative	PCT Negative and GCT Positive	Only <i>bla</i> _{SHV}	Only <i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV} and <i>bla</i> _{TEM}
<i>Providencia</i> spp.	11	11	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	59	65	0	6	4	0	2
<i>Enterobacter</i> spp.	50	55	2	7	0	6	1
<i>M. morgani</i>	8	13	0	5	0	0	5
<i>Citrobacter</i> spp.	8	15	0	7	1	5	1
<i>P. mirabilis</i>	14	15	0	1	0	1	0
<i>E. coli</i>	49	57	2	10	1	3	6
<i>Serratia</i> spp.	3	1	2	0	0	0	0
Total	202	232	6	36	6	15	15

Table 5: Susceptibility percentage of *Enterobacteriaceae* ESBL producers and non-producers

Antibiotic	ESBL	Non-ESBL
Amikacin	35,1	90,9
Dxycycline	29,9	48,5
Piperacillin/Tazobactam	28,0	88,4
Ciprofloxacin	26,7	82,5
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	24,5	56,8
Nitrofurantoin ^a	19,0	64,7
Ticarcilin/Clavulanic Acid	15,1	73,6
Tobramycin	14,6	89,3
Norfloxacin	14,4	76,5
Gentamicin	9,4	86,1
Nalidixic Acid	5,5	65,7

^a Nitrofurantoin was not evaluated for *P. mirabilis*, *M. morganii* and *Providencia* spp due to intrinsic resistance

* $p < 0,05$

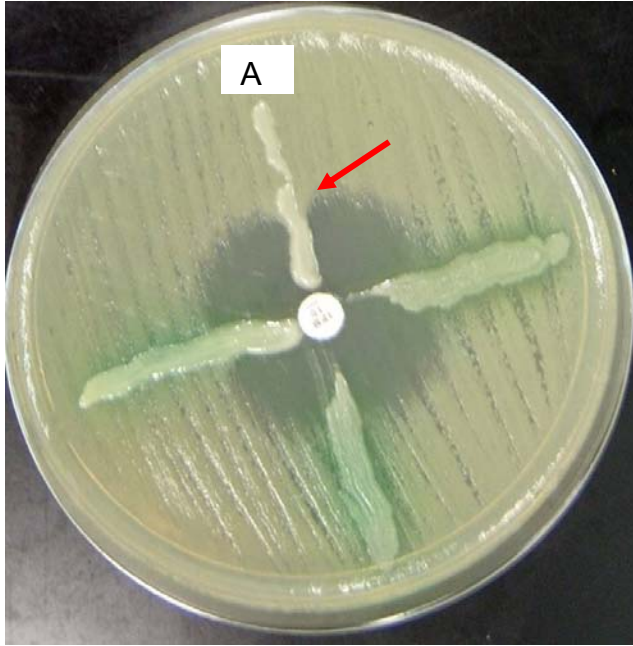


Figure : The modified Hodge Test showing a positive result for isolate “A”

Considerações Finais

Os resultados deste trabalho demonstram uma alta prevalência (26,8%) de ESBL entre os membros da Família *Enterobacteriaceae*, obtidos a partir de amostras clínicas de pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Providencia* spp. foi o gênero que apresentou o maior percentual de ESBL (91,7%), seguida de *Klebsiella pneumoniae* com uma prevalência de 56,7%, e de *Enterobacter* spp. com uma prevalência de 40,7%.

O teste de triagem utilizado para detectar ESBL é padronizado pelo CLSI apenas para *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* e *P. mirabilis*. Neste estudo, os resultados de teste de triagem positivo para Família *Enterobacteriaceae* foram confirmados em 75,9% dos isolados. Este alto percentual indica a necessidade do uso de teste de triagem na rotina laboratorial para todos os membros da Família *Enterobacteriaceae*.

Avaliando os antibióticos utilizados no Teste Confirmatório Fenotípico, a cefepima foi o substrato que detectou o maior percentual dos isolados (90,6%) como produtores de ESBL. A associação de discos combinados de Ceftazima/Ácido Clavulânico e Cefotaxima/Ácido Clavulânico é padronizada pelo CLSI como teste confirmatório para isolados produtores de ESBL, mas neste estudo a associação destas combinações detectou apenas 79,2% dos isolados que possuíam Teste Confirmatório Fenotípico positivo como ESBL. Esta associação foi menos efetiva para *Enterobacter* spp., pois detectou apenas 50% dos isolados.

De modo geral, a técnica de PCR detectou apenas um gene em 76 (32,7%) dos isolados, e dois ou três genes em 156 (67,3%) dos isolados com Teste

Confirmatório Genotípico positivo. Foi possível detectar *bla*_{TEM} em 89,65% dos isolados, *bla*_{SHV} em 59% dos isolados e *bla*_{CTX-M} em 37,9% dos isolados. Todas as amostras de *Providencia* spp. apresentaram *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM}. Em *Enterobacter* spp. a presença de *bla*_{TEM} é significativamente maior do que os outros dois genes pesquisados, estando presente em 98% dos isolados.

Comparando o perfil de suscetibilidade das amostras ESBL com as demais amostras consideradas como não produtoras de ESBL, notou-se um grande decréscimo na sensibilidade de todos antimicrobianos testados ($p < 0,05$) nas ESBL positivas. Este aumento na resistência provavelmente ocorreu pois os plasmídeos que contêm o gene que codifica para ESBL freqüentemente também possuem outros genes que codificam resistência a outros antimicrobianos como aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclina, quinolonas e cloranfenicol.

Entre as amostras que apresentaram resistência (plena ou intermediária) ao ertapenem, 8 apresentaram Teste de Hogde Modificado positivo e 9 apresentaram Teste de Hogde Modificado com resultados inconclusivos. Em nenhuma das amostras foi detectado o gene *bla*_{KPC} por técnica de PCR.

Estes dados mostram a importância do laboratório de microbiologia na detecção dos diferentes mecanismos de resistência. Além disso, o conhecimento da prevalência de ESBL nos diferentes gêneros da Família *Enterobacteriaceae* no Hospital de Clínicas de Porto Alegre assim como de seus perfis de suscetibilidade pode auxiliar nas políticas de controle de infecção e no manejo adequado dos pacientes infectados com microrganismos produtores de ESBL.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)