

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO**

AFONSO GOMES ABREU JÚNIOR

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE β -LACTAMASES DE
ESPECTRO AMPLIADO (ESBLs)**

SÃO LUÍS – MA

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

AFONSO GOMES ABREU JÚNIOR

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ENTEROBACTÉRIAS
PRODUTORAS DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO (ESBLs)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dra. Azizedite Guedes Gonçalves

Co-orientador: Mrs. Sirlei Garcia Marques

SÃO LUIS – MA

2010

Abreu Júnior, Afonso Gomes

Caracterização fenotípica e genotípica de enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs). / Afonso Gomes Abreu Júnior. – São Luís, 2010.

41 f.

Impresso por computador (Fotocópia)

Orientador: Azizedite Guedes Gonçalves

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2010.

1. Enterobactérias 2. β -lactamases de espectro ampliado. 3. Genes de resistência I. Título.

CDU 579.842.1/.2

AFONSO GOMES ABREU JÚNIOR

**CAEACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ENTEROBACTÉRIAS
PRODUTORAS DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO (ESBLs)**

A Comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Mestrado
em Ciências da Saúde, em sessão pública realizada no dia / / ,
considerou o(a) candidato(a)

() APROVADO

() REPROVADO

1) Examinador _____

2) Examinador _____

3) Examinador _____

4) Presidente (Orientador)_____

**Aos meus pais Afonso Gomes Abreu e
Conceição de Maria Santos Jacinto Abreu**

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida, conquistas, família e por todos os amigos presentes.

Aos meus queridos pais, por todo amor.

Aos meus irmãos, pelo apoio.

A José Maria, Dora, Arianne e Cibele, pelo carinho e por estarem sempre presentes.

Ao Luis e aos irmãos conquistados, Djalma e Marcus, pelo apoio, amizade, fraternidade, pelos momentos de felicidade e pela força nos momentos difíceis;

Aos amigos, Moisés, Aline e Ana Patrícia, pelo respeito, carinho e confiança;

À minha orientadora, Profa. Dra. Azizedite Guedes Gonçalves, exemplo de competência e sucesso profissional, meu profundo respeito e admiração. Muito obrigado pela confiança, conhecimento científico, e acima de tudo pela amizade construída ao longo desta jornada.

A Dra. Sirlei, pela disposição em co-orientar este trabalho, pelo apoio e amizade;

Ao Dr. Valério, pela contribuição intelectual e ajuda na realização dos experimentos;

Aos amigos do laboratório de microbiologia do Hospital Universitário Presidente Dutra, Alícia, Tânia, Patrícia, Ferreira, Karla e Joice, pelo companheirismo e por estarem sempre contribuindo com o trabalho;

A todos os funcionários do laboratório Cedro, em especial à Luciane, pela atenção e pela indispensável ajuda na realização dos experimentos;

À equipe do laboratório de pesquisa genética do UNICEUMA, em especial ao Pierre, Cristina, Hermínio e Mariana pelo contributo na parte molecular do trabalho;

À Dra. Libera Maria Dalla Costa pelo fornecimento das cepas controle.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão;

**“A adversidade leva alguns a serem
vencidos e outros a baterem recordes. ”**

William Arthur Ward

RESUMO

As β -Lactamases de espectro ampliado (ESBLs) são enzimas que degradam os antibióticos β -Lactâmicos, com exceção dos carbapenens e das cefamicinas, representando um grande problema na medicina. Esta pesquisa teve como objetivos caracterizar por métodos fenotípicos e genotípicos enterobactérias produtoras de β -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBLs) em hospitais de São Luís, MA, Brasil; correlacionar a frequência de isolamento com o espécime clínico e o setor hospitalar e avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana. Analisou-se 659 cepas de enterobactérias procedentes de diversos materiais clínicos, no período de março a agosto de 2009. A detecção fenotípica das amostras produtoras de ESBLs foi realizada através da técnica do disco aproximação. A presença dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} foi determinada através de reação em cadeia da polimerase (PCR). Entre os 659 isolados, 125 (19%) foram selecionados como possíveis produtores de ESBLs. Destes, todos foram confirmados pelo método do disco aproximação e 115 por PCR. Genes codificadores de enzimas do tipo TEM foram encontrados em 86 amostras (75%) e do tipo CTX-M em 104 (90%). Quanto à presença de mais de um tipo de ESBLs em um mesmo isolado, 75 (65%) possuíam genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}. *Klebsiella pneumoniae* foi a espécie mais prevalente dentre as produtoras de ESBLs. Com relação às amostras clínicas, houve predomínio da urina (n=45 / 36%). No teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, os carbapenens foram os antibióticos de escolha para o tratamento de infecções causadas por ESBLs e as bactérias codificadoras de CTX-M mostraram-se mais sensíveis do que as de TEM. Desta forma, estes resultados reforçam a necessidade de testes confirmatórios padronizados para todas as enterobactérias produtoras de ESBLs.

Palavras-chave: Enterobactérias. β -Lactamases de espectro ampliado. Genes de resistência.

ABSTRACT

Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) are enzymes that degrade β -lactam antibiotics except carbapenems and cephamycins, representing a major problem in medicine. This study aims to characterize Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBLs) – producing enterobacteria by phenotypic and genotypic methods in São Luís hospitals, Brazil; to correlate the frequency of isolation with clinical specimens and hospital sector and evaluates the microbial profile susceptibility. Were analyzed 659 Enterobacteriaceae strains originating from different clinical materials, from march to august 2009. The phenotypic detection of ESBLs-producing samples was performed using the disk approximation technique. *bla*_{TEM} *bla*_{CTX-M} genes was determined by polymerase chain reaction (PCR). Among the 659 isolates, 125 (19%) were selected as potential ESBLs producers. These, all were confirmed by disk approximation method and 115 for PCR. Genes encoding TEM-type enzymes were found in 86 samples (75%) and CTX-M type in 104 (90%). The presence of more than one ESBLs type in the same isolated, 75 (65%) had *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes. *Klebsiella pneumoniae* was prevalent among ESBLs-producing. With respect to clinical samples, there was predominance of urine (n=45/36%). In the susceptibility test, carbapenems were the antibiotics of choice for the treatment of infections caused by ESBLs. CTX-M coding bacteria were more sensitive than TEM. Thus, these results reinforce the need for confirmatory tests standardized for all enterobacteria producing ESBLs.

Keywords: Enterobacteria. Extended-spectrum β -lactamases. Resistance genes.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS	13
GERAL	13
ESPECÍFICOS	13
3 CAPÍTULO I.....	14
RESUMO	14
INTRODUÇÃO	15
MATERIAL E MÉTODOS	16
RESULTADOS.....	19
DISCUSSÃO	21
REFERÊNCIAS.....	25
FIGURA E TABELAS	31
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Visualização do produto amplificado em gel de agarose	33
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentual de enterobactérias produtoras de ESBLs pelo método do disco aproximação em três hospitais de São Luís, MA, Brasil, no período de março a agosto de 2009	34
Tabela 2 - Percentual de susceptibilidade antimicrobiana das amostras produtoras de ESBLs para as diferentes espécies	34
Tabela 3 - Detecção de genes codificadores de ESBLs através da PCR, de acordo com a espécie e amostra clínica.....	35
Tabela 4 - Percentual de susceptibilidade antimicrobiana das amostras produtoras de ESBLs de acordo com o tipo de gene	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMI	–	Amicacina
AMP	–	Ampicilina
ATCC	–	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	–	Concentração Inibitória Mínima
CIP	–	Ciprofloxacina
CLSI	–	<i>Clinical and laboratory Standards Institute</i>
ERT	–	Ertapenem
ESBLs	–	Extended-spectrum β -lactamases
GEN	–	Gentamicina
IMI	–	Imipenem
LEV	–	Levofloxacina
MA	–	Maranhão
MER	–	Meropenem
PBP	–	<i>Protein Binding Penicilin</i>
PCR	–	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PTZ	–	Piperacilina-tazobactam
SAM	–	Ampicilina-sulbactam
STR	–	Trimetoprim-sulfa
UTI	–	Unidade de Terapia Intensiva

1 INTRODUÇÃO

Os membros da família Enterobacteriaceae são importantes patógenos humanos, especialmente em ambientes hospitalares, onde causam os mais variados tipos de infecção tais como infecções do trato urinário, pneumonias, meningites, abscessos, feridas cirúrgicas e septicemia, entre outras. A patogenicidade e a alta incidência de isolados resistentes a vários antimicrobianos presentes nessa família são preocupantes (SADER *et al.*, 2001; PATERSON, 2006).

As enterobactérias são de grande importância no ambiente hospitalar, não apenas por seus fatores de virulência, mas porque apresentam resistência a várias classes de antimicrobianos. Constituem 80% dos isolados de bacilos Gram-negativos de importância médica e 50% das bactérias isoladas nos laboratórios de microbiologia. Estes microorganismos causam uma série de doenças humanas, incluindo 30 a 35% de todos os casos de septicemia, mais de 70% das infecções das vias urinárias e infecções intestinais (TRAUTNER, 2004).

Os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia* são considerados de maior importância médica. Essas bactérias estão dispersas na natureza e podem ser encontradas em plantas, solo, água e microbiota normal do trato intestinal dos animais e seres humanos. Podem estar associados com infecções comunitárias e hospitalares, oportunistas ou não (FARMER III, 2007).

A resistência aos antimicrobianos tem aumentado rapidamente nos últimos anos no Brasil e no mundo, gerando uma necessidade crescente do conhecimento do perfil de sensibilidade das bactérias que mais frequentemente causam infecções e do modo de disseminação da resistência (SOUZA JR, 2004). São diversos os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos, como: produção de enzimas que degradam e inativam o antibiótico, alteração da permeabilidade da membrana que impede ou dificulta a penetração do antibiótico na célula, efluxo ativo de antibiótico e alteração do sítio ativo do antibiótico (GOMES, 2008; PATERSON, 2006; TENOVER, *et al.*, 2006). Essa resistência aos antibióticos é um processo adaptativo que resulta de alguns eventos, como mutações em genes que passam a conferir resistência e transmissão vertical e horizontal de genes de resistência, eventos estes que contribuem para que bactérias resistentes sejam selecionadas quando há pressão de antibióticos (LIVERMORE 2006; SHAH 2004).

Estudos de vigilância de resistência aos antimicrobianos em ambiente hospitalar mostram que na América Latina a resistência em Gram-negativos é mais preocupante que em Gram-positivos (SADER, 2000). Dentre os vários antimicrobianos empregados na terapia antimicrobiana contra Gram-negativos, os que apresentam índices mais críticos de resistência são os β -lactâmicos, as quinolonas, o sulfametoxazol e os aminoglicosídeos. O que dificulta ainda mais a escolha da terapia adequada é o fato de muitas vezes a mesma bactéria apresentar vários mecanismos combinados, sendo resistente a quase todas as classes de antimicrobianos disponíveis (OPLUSTIL *et al.*, 2001; GALES *et al.*, 2002; SADER *et al.*, 2003).

Os β -lactâmicos representam a classe mais variada e mais amplamente utilizada de antimicrobianos. Este grupo que inclui penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos é responsável por aproximadamente 50% dos antimicrobianos utilizados de forma sistêmica, devido principalmente à sua baixa toxicidade e a grande variedade de compostos disponíveis (LIVERMORE, 1991; OZGUSMUS, 2008). Estes antibióticos têm sido o principal tratamento para infecções bacterianas e as β -lactamases continuam sendo a causa de resistência aos β -lactâmicos (MINARINI, 2007; SHAH, 2004) e o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas (BUSH, 2001; DALMARCO, 2006; MINARINI, 2007).

As bactérias podem tornar-se resistentes aos β -lactâmicos através de três mecanismos principais, que são a alteração do sítio de ação das PBP's (*Protein Binding Penicilin*), a redução da permeabilidade da membrana externa bacteriana e a produção de β -lactamases. O grau de resistência irá depender da quantidade de enzima produzida, da habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano em questão (potência) e da velocidade com que o β -lactâmico penetra na membrana externa da bactéria (permeabilidade da membrana) (TAVARES, 2001; BUSH, 2001).

As β -lactamases constituem um grupo heterogêneo de enzimas capazes de inativar as penicilinas, cefalosporinas e por vezes os monobactâmicos. Estas enzimas são frequentemente produzidas por bactérias Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias, e lisam o anel beta-lactâmico por hidroxilação irreversível da ligação amida, com inativação do antibiótico. Embora o resultado final de sua ação seja o mesmo, a atividade enzimática é variável de acordo com o tipo de betalactamase produzida e os diversos substratos existentes. Existe uma variação em especificidade de substrato entre as betalactamases: algumas hidroxilam preferencialmente as penicilinas, outras têm atração pelas cefalosporinas e algumas enzimas inativam ambas as classes de antibióticos. Em alguns patógenos, verifica-se a produção de diferentes tipos de

betalactamases, onde diversas cepas podem produzir enzimas distintas, ou uma única cepa pode produzir mais de um tipo de enzima (MENDELSON *et al.*, 2005; MINARINI, 2007; PITOUT, 2008; KHANFAR, 2009). Estudos já revelaram a existência de mais de 340 tipos de enzimas bacterianas, capazes de interagir com variados compostos contendo anel β -lactâmico (BUSH, 2001; SHAH, 2004).

A disseminação de genes conferindo resistência aos antibióticos pode ocorrer por transmissão vertical, ou seja, quando uma bactéria se divide e todo o seu genoma é duplicado originando uma nova célula idêntica, ou por resistência horizontal, na qual bactérias de uma mesma espécie ou de espécies diferentes trocam genes de resistência por transferência de DNA através de processos como conjugação, transdução, transformação e transposição (SOUZA JR, 2004).

A transferência de fragmentos de DNA cromossômico e de plasmídios é altamente disseminada nos procariotos, sendo uma das causas da notável diversidade genética observada nas bactérias. Ao contrário do que ocorre com as β -lactamases cromossômicas, as β -lactamases mediadas por plasmídio podem ser transferidas horizontalmente entre bactérias de uma mesma espécie ou mesmo entre bactérias de espécies diferentes. Desta forma, essas β -lactamases representam um problema clínico muito maior, uma vez que a disseminação ocorre com maior facilidade (TAVARES, 2001; OZGUMUS, 2008).

Os plasmídios replicam-se independentes do cromossomo, carregam genes que não são essenciais para a vida das bactérias e muitas vezes carregam genes que conferem à bactéria resistência aos antibióticos (OZGUSMUS, 2008).

Novos antimicrobianos β -lactâmicos foram desenvolvidos, e especificamente designados como resistentes à ação hidrolítica das β -lactamases. No entanto, com o uso abusivo desses antimicrobianos, novas β -lactamases emergiram. Presumivelmente, o uso dessas novas drogas selecionou mutantes portando novas β -lactamases. Uma dessas novas classes de antimicrobianos, chamada oximino-cefalosporinas (cefalosporinas de terceira geração) foi instruída como alternativa terapêutica para infecções graves provocadas principalmente por bactérias Gram-negativas produtoras de β -lactamases de espectro restrito como TEM, TEM-1 e SHV-1. Estáveis à hidrólise pelas β -lactamases de espectro restrito, as cefalosporinas de 3ª geração ainda possuíam um amplo espectro de atividade antibacteriana e eram menos nefrotóxicas comparadas com os aminoglicosídeos e polimixinas (BRADFORD, 2001; PATERSON, 2005). Não surpreendentemente, a resistência mediada por β -lactamases emergiu rapidamente. Mutações nos genes bla_{TEM} , bla_{TEM-1} e bla_{SHV} , que codificam as β -lactamases de espectro restrito TEM, TEM-1 e SHV, conferiram um espectro de hidrólise

estendido, codificando novas enzimas denominadas β -lactamases de espectro estendido (ESBLs, do inglês, *Extended Spectrum Beta-Lactamase*), devido ao seu amplo espectro de atividade, especialmente contra as oximino-cefalosporinas (BRADFORD, 2001; PATERSON, 2005).

O primeiro isolado clínico expressando ESBLs foi identificado na Alemanha em 1983 (MINARINI, 2007; HARADA, 2008; ALKAPA, 2008; KHANFAR, 2009). Em 1985, o primeiro surto hospitalar causado por bactérias produtoras de ESBLs ocorreu na França e depois nos EUA, no fim da década de 1980 e início da década de 1990. O número de variantes de ESBLs identificados tem crescido muito desde então, demonstrando a rápida evolução dessas enzimas (SHAH, 2004).

As ESBLs “clássicas” são enzimas transmitidas/codificadas por plasmídios, como as famílias: Temoniera (TEM), Sulfidril variável (SHV) e oxacilina (OXA). Dentro destas maiores “famílias” estão incluídas as duas primeiras variantes de β -lactamases identificadas. Embora estas variantes ainda se mantenham como as mais isoladas, nos últimos anos houve uma explosão no desenvolvimento/aparecimento de outras ESBLs (famílias CTX-M, PER, VEB, GES, TLA e BES). Muitas destas ESBLs são mutantes das β -lactamases clássicas (CARTER *et al.*, 2000), com um a quatro aminoácidos substituídos. Essas trocas correspondem a menos de 2% da sequência da enzima, e são suficientes para remodelar o sítio ativo e torná-lo capaz de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro (SILVA, 2000; BRADFORD, 2001). Como resultado disso, mais de 300 variantes naturais de ESBLs diferentes são conhecidas atualmente, a maioria derivada dos grupos TEM, SHV e CTX-M, com 150, 88 e 69 variantes, respectivamente (BRADFORD, 2001; STURENBURG, 2003; SOUSA JR, 2004; MENDELSON *et al.*, 2005; DALMARCO, 2006; SANCHEZ, 2008; DROPA *et al.*, 2009).

Dentre os microorganismos com maior produção de ESBLs em todo o mundo destacam-se a *K. pneumoniae* e *E. coli*, mas estas enzimas também têm sido identificadas em outros membros da família Enterobacteriaceae, tais como: *K. oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Serratia* spp., *Salmonella* spp. e em bactérias Gram-negativas não-fermentadoras de glicose, como *Pseudomonas aeruginosa* (ESMERINO, 2003; TURNER, 2005; PATERSON, 2005; KHANFAR, 2009).

β -lactamases são comumente classificadas de acordo com dois esquemas gerais: a classificação molecular de Ambler e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (HARADA, 2008). Ambler (1980) propôs, primeiramente, uma classificação para essas enzimas e designou quatro classes de β -lactamases que tinham sua sequência de aminoácidos

conhecidas: A (serina beta-lactamase), B (metalo-beta-lactamase), C a qual foi descrita posteriormente e a classe D, que hidrolisa preferencialmente a oxacilina. As classes A, C e D agem através sítios ativos com “serinas”, enquanto a classe B ou metalo-beta-lactamase, possui zinco no sítio enzimático (PATERSON, 2005; DALMARCO, 2006). Por outro lado, o esquema de Bush classifica essas β -lactamases de acordo com suas funções e características estruturais e bioquímicas, dividindo-as em quatro grupos definidos pelos substratos e sensibilidade por seus inibidores. Essa classificação é dada por algarismos arábicos, sendo divididos em subgrupos designados por letras (a-f). As ESBLs encontram-se no grupo 2 de Bush e A de Ambler, onde estão presentes as primeiras β -lactamases isoladas (TEM-1 e SHV-1), mais especificamente no subgrupo 2be que é o grupo capaz de inativar as cefalosporinas de terceira geração e os monobactâmicos. O subgrupo 2br denota a reduzida ligação aos inibidores de β -lactamases (ácido clavulânico e sulbactam); são também conhecidas como ESBLs resistentes aos inibidores de betalactamases (derivadas da TEM). Algumas ainda mantêm-se susceptíveis ao tazobactam (BRADFORD, 2001; SHAH, 2004; RIVA, 2008; DALMARCO, 2006).

No universo das enzimas, a produção de ESBLs por enterobactérias representa um grande problema na medicina (BRADFORD, 2001; PATERSON, 2005; DALMARCO, 2006). Tal problemática está relacionada à capacidade dessas enzimas hidrolisarem a ligação C-N de antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, com exceção dos carbapenens (imipenem, ertapenem e meropenem) e cefamicinas (ROSSI *et al.*, 2005). Assim, as ESBLs conferem resistência às penicilinas, todas as cefalosporinas e aos monobactâmicos (aztreonam) (BRADFORD, 2001; BUSH, 2001; PATERSON, 2005; RIVA, 2008; SUPERTI, 2009; KHANFAR, 2009).

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

substratos hidrolisados e variação na susceptibilidade aos inibidores (GNIADKOWSKI, 2001).

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

A enzima TEM-1 descrita no início dos anos 60, foi originalmente encontrada em uma cepa de *E. coli* isolada de uma hemocultura em um paciente na Grécia de nome Temoniera, daí sua designação TEM. A facilidade de transmissão mediada por plasmídios e transposons facilitou a disseminação de TEM-1 para outras espécies de bactérias (PATERSON, 2005).

Mutações ocorridas na sequência de aminoácidos da enzima TEM-1 levaram ao surgimento de muitas variantes, sendo que a maioria delas apresenta o fenótipo de ESBLs. Outras, no entanto, apresentam-se como β -lactamases resistentes a ação de inibidores. As substituições de aminoácidos são variadas, mas ocorrem em número limitado de posições. As combinações dessas trocas de aminoácidos resultam em várias alterações sutis nos fenótipos das ESBLs, como a habilidade de hidrolisar oximino-cefalosporinas específicas, como cefotaxima e ceftazidima (BRADFORD, 2001).

Apesar de β -lactamases do tipo TEM serem encontradas com maior frequência em *E. coli* e *K. pneumoniae*, também já foram descritas em várias espécies de enterobactérias, como em *Enterobacter aerogenes*, *M. morganii*, *P. mirabilis*, *Providencia rettgeri* e *Salmonella* spp. Além disso, depois de alguns anos do isolamento da β -lactamase TEM-1, ela já havia sido encontrada não só na família Enterobacteriaceae, mas em várias espécies de diferentes bactérias, tais como: *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (BRADFORD, 2001).

A SHV é mediada por plasmídio e presente em grande número nas cepas de *K. pneumoniae*, mas podem ser encontradas em *Citrobacter diversus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter cloacae*. Esta enzima é responsável por 20% das transmissões plasmidiais que conferem resistência aos beta-lactâmicos de espectro estendido (BRADFORD, 2001).

A primeira mutação observada na produção de ESBLs foi a enzima denominada SHV-2, a qual foi encontrada em uma cepa de *Klebsiella ozaenae*, isolada na República Federal da Alemanha, em 1983 (LIVERMORE, 1995). A primeira ESBL “mutante” identificada em um

hospital universitário foi isolada em Julho de 1984, na França, a qual foi posteriormente caracterizada molecularmente como TEM/CTX-1 (DALMARCO, 2006).

O tipo SHV possui menos variantes que o tipo TEM e as mutações ocorrem em poucas posições nos genes estruturais. Algumas substituições são essenciais para a hidrólise de ceftazidima e outras para a hidrólise de cefotaxima. Até hoje, a maioria dos derivados SHV descritos, possui o fenótipo de ESBLs. Apenas uma variante é relatada como resistente aos inibidores de β -lactamases (BRADFORD, 2001).

No final da década de 80, na Alemanha, foi reportado um isolado clínico de *E. coli* resistente a cefotaxima não produtores de TEM e SHV, em uma nova enzima designada de CTX-M-1, em referência a atividade hidrolítica contra a cefotaxima (PATERSON, 2005).

Até o momento mais de 60 diferentes β -lactamases do tipo CTX-M já foram descritas e divididas em cinco diferentes grupos de acordo com a sequência de aminoácidos, ou seja, *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-2, *bla*CTX-M-8, *bla*CTX-M-9, *bla*CTX-M-25. Mais recentemente, tem sido sugerido que *bla*CTX-M-45 constitui um novo grupo (MONSTEIN *et al.*, 2009). Hidrolisam cefalosporinas de amplo espectro como característica intrínseca da enzima e tem origem em genes cromossômicos de espécies de *Kluyvera* spp. Ao contrário das famílias TEM e SHV, as enzimas CTX-M hidrolisam mais cefotaxima à ceftazidima. Além disso, essas enzimas são inibidas, “in vitro”, quase dez vezes mais pelo inibidor de beta-lactamase tazobactam do que pelo ácido clavulânico (BRADFORD, 2001). É relatada como tipo predominante na América do Sul (LIVERMORE, 2001), inclusive no Brasil (BONNET *et al.*, 2000).

Embora ESBLs do tipo TEM e SHV sejam identificados principalmente a partir de pacientes internados, um número crescente de infecções causadas por CTX-M tem sido recentemente relatadas na comunidade principalmente em *E. coli*, a partir de pacientes que sofrem de infecções do trato urinário (HARADA, 2008).

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

Além da OXA, outras enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas de espectro ampliado têm sido descritas como: GES, VEB, PER, BEL, BES, TLA, SFO e IBC (BRADFORD, 2001; SHAH, 2004; PETERSON, 2005; HARADA, 2008).

Os principais fatores de risco para a colonização ou infecção por bacilos produtores dessa enzima são uso prévio de antimicrobianos (MENDELSON *et al.*, 2005; PATERSON, 2005; RIVA, 2008), presença de dispositivos invasivos como cateter (PFALLER, 2006; SILVA, 2006; DALMARCO, 2006; RIVA, 2008), estadia prolongada em hospitais (DENTON, 2007; RIVA, 2008; MACGOWAN, 2008), unidade de terapia intensiva (UTI) (MENASHE *et al.*, 2001; MENDELSON *et al.*, 2005; DALMARCO, 2006; RIVA, 2008; DROPA *et al.*, 2009), hospitalização prévia (MENASHE *et al.*, 2001; DALMARCO, 2006) atraso no tratamento apropriado e presença de úlceras (PATERSON, 2005; PFALLER, 2006; DALMARCO, 2006; RIVA, 2008; PITUOT, 2008).

A prevalência de ESBLs varia de país para país, e os dados do SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program* foram fundamentais para a detecção de variações na prevalência de ESBLs nos países participantes (FREITAS, 2003). No entanto, mesmo dentro de um país, a prevalência de ESBLs entre isolados clínicos pode variar de instituição para instituição, dependendo de uma variedade de fatores, tais como práticas no controle da infecção. Organismos expressando ESBLs são distribuídos em todo o mundo, embora as taxas de prevalência sejam significativamente mais elevadas em certas áreas geográficas. Por exemplo, a percentagem mais elevada do fenótipo ESBL foi detectada entre as cepas *K. pneumoniae* na América Latina (45%) e a menor percentagem no Canadá (5%). Embora hospitais, principalmente nas UTIs, sejam as fontes primárias de ESBLs, lares e outras estruturas de cuidados a longo prazo constituem um importante potencial de bactérias resistentes (MENDELSON *et al.*, 2005).

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

As bactérias produtoras de ESBLs encontram-se espalhadas pelo mundo, todas com alta incidência na Europa, sendo que 32,8% das amostras de *Klebsiella* spp. e 14,4 % das amostras de *E. coli* isoladas nessa região produzem ESBLs (JONES *et al.*, 2003). Um estudo realizado na Espanha detectou cepas produtoras de ESBLs em 90% dos hospitais participantes de um programa de vigilância (HERNANDEZ *et al.*, 2003).

Segundo Blatt (2000), a prevalência de cepas produtoras de ESBLs em alguns hospitais brasileiros é em torno de 39%.

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

O aumento da prevalência de enterobactérias produtoras de ESBLs criou uma necessidade urgente de métodos laboratoriais para identificar com precisão a presença dessas enzimas em isolados clínicos (SHAH, 2004). A principal dificuldade encontrada para esse propósito é a falta de um método padronizado e as interferências de outros mecanismos de resistência, como enzimas do tipo AmpC e mutações em porinas de membrana (BRADFORD, 2001).

Desde a década de 1980, vários testes fenotípicos para a detecção de organismos produtores de ESBLs têm sido desenvolvidos. Todos os métodos são baseados na característica das ESBLs conferirem uma susceptibilidade reduzida às cefalosporinas de espectro ampliado e inibição por clavulanato (HARADA, 2008).

O CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) publicou métodos para triagem e confirmação da presença de ESBLs em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* e mais recentemente incluiu também *Proteus mirabilis*, devido ao aumento da incidência nessa espécie (NAVON-VENEZIA, 2003).

Os testes de triagem baseiam-se no padrão de sensibilidade das cepas às oximino-cefalosporinas, em especial ceftazidima e cefotaxima. São consideradas positivas as enterobactérias que apresentam halo de inibição reduzido para pelo menos um dos antimicrobianos utilizados, sendo os pontos de corte: ≤ 17 mm para cefpodoxima, ≤ 22 mm para ceftazidima, ≤ 25 mm para ceftriaxona, ≤ 27 mm para cefotaxima, ≤ 27 mm para aztreonam, no caso de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*, e ≤ 22 mm para cefpodoxima e ceftazidima ou ≤ 27 mm para cefotaxima em casos de *Proteus mirabilis* (CLSI, 2008).

Os testes confirmatórios baseiam-se na comparação de sensibilidade da bactéria na presença de β -lactâmicos, com e sem adição de um inibidor de β -lactamase, como ácido clavulânico. O aumento da sensibilidade com adição do inibidor indica a produção de β -lactamases (CLSI, 2008).

O CLSI recomenda que os produtores de ESBLs sejam reportados como resistentes a todas as penicilinas, cefalosporinas e aztreonam, mesmo que se mostrem sensíveis a esses antimicrobianos nos testes convencionais (CLSI, 2008).

Dentre os principais métodos de identificação das ESBLs tem-se: o método da dupla difusão, o método da adição do ácido clavulânico, o E-test, além de métodos automatizados e moleculares. O método da dupla difusão ou Método da aproximação de disco foi o primeiro teste proposto para a detecção fenotípica de microorganismos produtores de ESBLs (HARADA 2008). A identificação das amostras produtoras de ESBLs é feita mediante a sinergia de disco duplo. Para cada amostra é preparada uma suspensão bacteriana com caldo Mueller-Hinton com turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland, utilizando o nefelômetro. Após homogeneização desta suspensão é realizada a semeadura em uma placa de ágar Mueller-Hinton sendo os discos distribuídos nas placas até 15 minutos após semeadura, seguindo normas preconizadas pelo CLSI. Logo após colocados discos com carga padronizada de aztreonam, cefotaxima, ceftazidima e cefepime, dispostos a uma distância e 20 a 30 mm de disco de amoxicilina / ácido clavulânico. Quando há um sinergismo positivo observa-se uma ampliação do halo de inibição de algumas cefalosporinas ou do aztreonam, ou o aparecimento de uma terceira zona irregular de inibição (ghost-zone) entre o disco composto e o disco de uma das drogas betalactâmicas. Este método é o mais utilizado na rotina laboratorial pelo baixo custo, fácil acesso à metodologia e pelo tempo de obtenção dos resultados (CLSI, 2008; SHAH, 2004; HARADA, 2008; RIVA, 2008).

O método da adição do ácido clavulânico é um teste realizado utilizando-se discos de cefotaxima / ácido clavulânico (30 µg / 10 µg) e ceftazidima / ácido clavulânico (30 µg / 10 µg). É considerado positivo quando pelo menos um dos diâmetros dos halos dos antimicrobianos associados ao ácido clavulânico for pelo menos 5 mm maior que os diâmetros dos antimicrobianos sem o inibidor de β -lactamases (ácido clavulânico) (CLSI, 2008).

O E-test é um método que utiliza fitas plásticas disponíveis comercialmente para detecção de ESBLs que contém concentrações crescentes do agente em estudo numa placa de Mueller-Hinton semeada com inóculo bacteriano padronizado com a escala 0,5 de McFarland. Uma das fitas contém concentrações crescentes de ceftazidima (0,5 - 32 µg/ml) em uma extremidade e na outra extremidade concentrações crescentes de ceftazidima (0,064 - 4 µg/ml) associadas com uma concentração fixa de ácido clavulânico (4µg/ml). Fitas similares impregnadas com cefotaxima/ácido clavulânico ou cefepime/ácido clavulânico são também utilizadas na detecção (HARADA, 2008). A bactéria é considerada positiva para ESBL quando apresentar diminuição de pelo menos três diluições logarítmicas da droga testada com o ácido clavulânico em relação à concentração mínima (MIC) da droga sozinha, ou seja,

quando a razão entre a CIM do antimicrobiano testado e a CIM do antimicrobiano associado ao ácido clavulânico for ≥ 8 (HARADA, 2008).

A presença de ESBLs também é identificada com a verificação de uma zona fantasma ou alguma deformação do halo entre os antimicrobianos na fita (RIVA, 2008; HARADA, 2008).

O Vitek (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) e o Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, MD, E.U.A.) são sistemas automatizados que incluem testes para detecção de ESBLs. Em ambos os sistemas, painéis específicos para confirmação de ESBLs estão disponíveis e se a produção de ESBLs é inferida pelo sistema, todas as penicilinas, cefalosporinas e aztreonam são exibidos como resistentes, independentemente da MIC valores obtidos para estas drogas (HARADA, 2008). A análise fenotípica da bactéria por este método proporciona uma padronização e rapidez, o que garante boa consistência nos resultados em detrimento aos testes em discos, com resultados após 18-24 horas. Entretanto, o método automatizado tem algumas desvantagens quando comparado com a difusão em ágar, porque certas bactérias não crescem ou o fazem pobremente após 4-5 horas de incubação. Outro ponto seria a dificuldade em detectar o baixo nível de expressão deste mecanismo de resistência. Alguns complexos fenotípicos resultantes de combinações destes mecanismos são pobremente diferenciados pelo método automatizado (SOUZA JR, 2004).

A detecção de ESBLs também pode ser feita utilizando métodos moleculares como a reação da polimerase em cadeia (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) baseada na amplificação do DNA. O fragmento de DNA a ser amplificado é determinado por sequências iniciadoras (*primers*), cadeias curtas de DNA que se ligam especificamente em regiões complementares à sua sequência. Podem ser utilizados *primers* específicos para cada gene (*bla*_{TEM-3}, *bla*_{SHV-2}, *bla*_{CTX-M-2}, etc) que codificam as diversas enzimas descritas (TEM-1, SHV-2, CTX-M-2, etc) ou, também pode ser realizada uma triagem inicial com *primers* específicos para cada família de genes para posterior purificação e sequenciamento do DNA (PITOUT, 2008).

Estudos de caracterização molecular são altamente recomendáveis para a elucidação da epidemiologia e da origem genérica destas enzimas. Esses dados são extremamente valiosos para o entendimento da mobilidade genética desses genes e para o controle da disseminação desse tipo de resistência (LIVERMORE, 2006).

Tendo em vista a escassez de registros científicos a respeito das enterobactérias produtoras de ESBLs no Maranhão, a falta de conhecimento dos mecanismos de resistência desenvolvidos por estes patógenos e alta prevalência em ambientes hospitalares, este estudo

apresentou com objetivo a detecção desses microorganismos em hospitais de São Luís, MA, Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar por métodos fenotípicos e genotípicos enterobactérias produtoras de β -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBLs) em hospitais de São Luís, MA, Brasil.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência da produção de ESBLs nos hospitais;
- Correlacionar a frequência de isolamento das amostras produtoras de ESBLs com o espécime clínico e os setores hospitalares;
- Determinar a prevalência da produção de ESBLs nas diferentes espécies de enterobactérias;
- Avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas produtoras de ESBLs;
- Analisar a distribuição dos genes *bla_{CTX-M}* e *bla_{TEM}* entre os membros da família Enterobacteriaceae produtores de ESBLs.

3 CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO (ESBLs)

Afonso Gomes Abreu Júnior,¹ Sirlei Garcia Marques,^{2,3} Azizedite Guedes Gonçalves⁴

Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil¹; Hospital Universitário Materno Infantil, São Luís, Brasil²; Laboratório Cedro, São Luís, Brasil³; Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil⁴.

Resumo

As β -Lactamases de espectro ampliado (ESBLs) são enzimas que degradam os antibióticos β -Lactâmicos, com exceção dos carbapenens e das cefamicinas, representando um grande problema na medicina. O objetivo do estudo foi caracterizar por métodos fenotípicos e genotípicos enterobactérias produtoras de β -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBLs) em hospitais de São Luís, MA, Brasil, correlacionando a frequência de isolamento com o setor hospitalar, bem como avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana. Foram analisadas 659 cepas de enterobactérias procedentes de diversos materiais clínicos, no período de março a agosto de 2009. A detecção fenotípica das amostras produtoras de ESBLs foi realizada através da técnica do disco aproximação e a determinação de genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} pela PCR. Dentre os isolados, 125 (19%) foram selecionados como possíveis produtores de ESBLs. Destes, todos foram confirmados pelo método do disco aproximação e 115 por PCR. O gene *bla*_{TEM} esteve presente em 86 amostras (75%) e *bla*_{CTX-M} em 104 (90,4%). Os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}, em um mesmo isolado, foram encontrados em 75 amostras (65,2%). *Klebsiella pneumoniae* foi a espécie prevalente. Com relação às amostras clínicas, houve predomínio da urina (n=45 / 36%). Os carbapenens foram os antibióticos de escolha para o

tratamento de infecções causadas por ESBLs e as bactérias com presença do gene *bla*_{CTX-M} mostraram-se mais sensíveis do que aquelas com *bla*_{TEM}. Desta forma, os resultados reforçam a necessidade de testes confirmatórios padronizados para todas as enterobactérias produtoras de ESBLs.

Introdução

As β -lactamases constituem um grupo heterogêneo de enzimas capazes de inativar as penicilinas, cefalosporinas e por vezes os monobactâmicos. Estas enzimas são frequentemente produzidas por bactérias Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias, e lisam o anel beta-lactâmico por hidroxilação irreversível da ligação amida, com inativação do antibiótico.¹⁻⁵

Novos antimicrobianos β -lactâmicos foram desenvolvidos, e especificamente designados como resistentes à ação hidrolítica das β -lactamases. No entanto, com o uso abusivo desses antimicrobianos, novas β -lactamases emergiram. Uma nova classe de antimicrobianos, chamada oximino-cefalosporinas (cefalosporinas de terceira geração) foi empregada como alternativa terapêutica para infecções graves provocadas principalmente por bactérias Gram-negativas produtoras de β -lactamases de espectro restrito como TEM, TEM-1 e SHV-1. Estáveis a hidrólise pelas β -lactamases de espectro restrito, as cefalosporinas de 3ª geração ainda possuíam um amplo espectro de atividade antibacteriana e eram menos nefrotóxicas comparadas com os aminoglicosídeos e polimixinas.^{6,7}

A resistência mediada por β -lactamases emergiu rapidamente e mutações nos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{TEM-1} e *bla*_{SHV}, que codificam as β -lactamases de espectro restrito TEM, TEM-1 e SHV, conferiram um espectro de hidrólise estendido, codificando novas enzimas denominadas β -lactamases de espectro estendido (ESBLs, do inglês, *Extended-Spectrum Beta-Lactamase*), devido ao seu amplo espectro de atividade, especialmente contra as oximino-cefalosporinas.^{6,7}

A produção de ESBLs por enterobactérias é o mecanismo de resistência mais comum aos β -lactâmicos, representando um grande problema na medicina. A disseminação dessas enzimas ocorreu rapidamente por todo o mundo e, quando estabelecidas em uma região, freqüentemente passam a ser o mecanismo de resistência prevalente.^{6,7}

A prevalência de cepas produtoras de ESBLs em países da América Latina é de 45%, sendo que alguns hospitais brasileiros essa prevalência chega em torno de 39%. Dados do SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program* para o Brasil mostram uma alta incidência de isolados produtores de ESBLs: 50,3% para *Klebsiella pneumoniae* e 9,1% para *Escherichia coli*.⁸ Uma alta incidência também é observada na Europa, sendo 32,8% das amostras de *Klebsiella* spp. e 14,4 % das amostras de *E. coli*. Um estudo realizado na Espanha detectou cepas produtoras de ESBLs em 90% dos hospitais participantes de um programa de vigilância, mostrando que a prevalência de ESBLs varia de país para país.^{3,9,10}

Considerando que houve um aumento na incidência de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBLs no ambiente hospitalar e extra-hospitalar, possivelmente relacionado à maior utilização das cefalosporinas de terceira e quarta gerações, esta pesquisa apresentou como objetivos detectar a prevalência de enterobactérias produtoras de ESBLs em três hospitais de São Luís, Brasil, correlacionar a freqüência de isolamento com o espécime clínico e os setores hospitalares e avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana.

Materiais e Métodos

Área de estudo

As amostras bacterianas foram provenientes de dois hospitais privados (H1 e H2) e um público (H3) em São Luis, MA, Brasil. Os hospitais apresentam nível de atenção ambulatorial e de internação com urgência/emergência, sendo o H1 (55 leitos) e H2 (83 leitos) de média

complexidade e H3 (148 leitos) com procedimentos de média e alta complexidade. Todos apresentam especialidades cirúrgicas, clínicas e Unidade de Terapia Intensiva (UTI).

Seleção das amostras bacterianas

Foram analisadas 659 cepas de enterobactérias procedentes de diversos materiais clínicos, no período de março a agosto de 2009. Todos os isolados foram submetidos ao teste de triagem para detecção de ESBLs realizado por disco difusão (DD) de acordo com os critérios de interpretação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI.¹¹ Considerou-se positivas as enterobactérias que apresentaram halo de inibição reduzido para pelo menos um dos antimicrobianos utilizados, sendo os pontos de corte: ≤ 22 mm para ceftazidima, ≤ 25 mm para ceftriaxona, ≤ 27 mm para cefotaxima, ≤ 27 mm para aztreonam, no caso de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, e ≤ 22 mm para ceftazidima ou ≤ 27 mm para cefotaxima em casos de *P. mirabilis*.

Teste de Susceptibilidade antimicrobiana

Para o teste de susceptibilidade antimicrobiana empregou-se o método de disco-difusão (Kirby-Bauer), sendo utilizadas como controle as cepas de *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922 e ATCC 35218.¹¹

Detecção fenotípica das amostras produtoras de ESBLs por disco aproximação

As amostras bacterianas consideradas positivas no teste de triagem foram submetidas ao método da dupla difusão ou método da aproximação de disco.¹¹ Para cada amostra foi preparada uma suspensão bacteriana com soro fisiológico 0,85% com turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Após homogeneização desta suspensão realizou-se a semeadura em uma placa de ágar Mueller-Hinton sendo os discos distribuídos nas placas até 15 minutos

após semeadura. Em seguida, foram colocados discos de aztreonam (30µg), cefotaxima (30µg), ceftazidima (30µg) e cefepime (30µg), dispostos a uma distância de 20 mm do disco de amoxicilina / ácido clavulânico.^{12,13} As amostras foram consideradas produtoras de ESBLs quando houve uma ampliação do halo de inibição para as cefalosporinas ou do aztreonam, ou o aparecimento de uma terceira zona irregular de inibição (“ghost-zone”) entre o disco composto e o disco de uma das drogas betalactâmicas. Foram utilizadas como controle negativo *E. coli* ATCC 25922 e como controle positivo *K. pneumoniae* ATCC 700603. Os isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* foram confirmados pelo sistema de automação VITEK (Biomérieux)®.

Deteção fenotípica das amostras produtoras de ESBL por disco combinado

O método confirmatório da adição do ácido clavulânico ou do disco combinado foi realizado utilizando-se discos de cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefotaxima / ácido clavulânico (30 µg / 10 µg) e ceftazidima / ácido clavulânico (30 µg / 10 µg). O teste foi considerado positivo quando pelo menos um dos diâmetros dos halos dos antimicrobianos associados ao ácido clavulânico foi pelo menos 5 mm maior que os diâmetros dos antimicrobianos sem o inibidor de β-lactamases.¹¹

Deteção genotípica das amostras produtoras de ESBLs pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction)

Foi utilizado o par de primers TEM-164.SE (5'-ATGCGT TATATTCGCCTGTG-3') e TEM-165.AS (5'-TGCTTTGTTATTCGGGCCAA-3') para amplificação de uma sequência de 445 pares de bases da família TEM e para a família CTX-M o par de primers CTX-M-U1 (5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC-3') e CTX-M-U2 (5'-TGGGTRAARTAR GTSACCAGAAYCAGCGG-3') para amplificação de 593 pares de base. Os primers foram

adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA) e todas as reações foram realizadas com 2,5 µl de DNA de cada microorganismo, 10 pmol de primers específicos, 5U/µl de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, EUA), tampão MgCl₂ (Promega, Madison, EUA), DNTPs (Amresco, Ohio) e água miliQ em um volume total de 25 µl. As condições para a amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. As amplificações foram realizadas no termociclador MyCicler (Bio Rad) e o produto amplificado de cada reação foi submetido à eletroforese em gel agarose 1% durante 1 hora (100 volts), corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta com auxílio do Transluminador.¹⁴

Resultados

Das 659 enterobactérias isoladas nos três hospitais, 125 (19%) foram selecionadas como possíveis produtoras de ESBLs. Destas, 100% foram confirmadas pelo método de aproximação do disco. A tabela 1 apresenta o número de espécies isoladas distribuídas por hospital.

Entre as espécies confirmadas pelo método do disco aproximação, *K. pneumoniae* destacou-se com 63 amostras (50,4%), seguido de *E. coli* (n=20, 16%) (Tabela 1).

O hospital H2 apresentou o maior número de isolados (n=64, 51,2%). Nesta unidade, observou-se que *Enterobacter aerogenes* foi mais freqüente (n=14, 21,9%) com relação aos hospitais H1 e H3 (Tabela 1).

Das 125 amostras produtoras de ESBLs, 83 (66,0%) foram procedentes da Unidade de Terapia Intensiva (UTI), 27 (22,0%) da clínica médica, 8 (6,4%) da clínica cirúrgica e 7 (5,6%) do ambulatório. Na UTI, *K. pneumoniae* foi responsável por 56,6% das infecções, seguido por *P. mirabilis* e *E. aerogenes*, ambos com 13,3%.

Considerando os espécimes clínicos, houve predomínio da urina (n=45, 36%), seguido da secreção traqueal (n=25, 20%) e sangue (n=15, 12%) nos três hospitais. Correlacionando-se o microorganismo isolado com a amostra clínica, *K. pneumoniae* foi prevalente em todas, com exceção da secreção de ferida operatória.

Quanto ao perfil de susceptibilidade antimicrobiana das enterobactérias produtoras de ESBLs verificou-se que 100% das amostras analisadas em todas as espécies apresentaram resistência para ampicilina e ampicilina-sulbactam. A maioria dos microorganismos mostrou um perfil de susceptibilidade baixo para ciprofloxacina, gentamicina, levofloxacina e trimetoprim-sulfa ao passo que para amicacina e piperacilina-tazobactam, os mesmos demonstraram uma maior sensibilidade. Os carbapenems foram os antibióticos com maior eficácia frente às cepas produtoras de ESBLs (Tabela 2).

A presença de genes codificadores de ESBLs foi detectada pela PCR (Figura 1) em 92% (115/125) nas duas famílias analisadas. Genes *bla*_{TEM} foram encontrados em 75% das amostras (n=86) e *bla*_{CTX-M} em 90,4% (n=104). Quanto à presença de mais de um tipo de ESBLs em uma mesma amostra, 65,2% dos isolados (n=75) possuíam genes codificadores de enzimas do tipo TEM e CTX-M (Tabela 4).

Entre as espécies de Enterobacteriaceae estudadas, *K. pneumoniae* foi a que mais evidenciou a presença dos genes codificadores das enzimas do tipo TEM (40/59, 67,8%) e CTX-M (57/59, 96,6%). Com relação às demais espécies, a frequência de TEM para *E. coli* foi de 70% (14/20), *P. mirabilis* 93,3% (14/15) e *E. aerogenes* 86,7% (13/15), ao passo que para CTX-M a frequência foi de 85% para *E. coli* (17/20), 77,3% para *P. mirabilis* (11/15) e 93,3% para *E. aerogenes* (14/15) (Tabela 3).

Quando os isolados foram agrupados de acordo com o gene, observou-se que embora o padrão de sensibilidade tenha variado pouco entre os tipos *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}, bactérias codificadoras de *bla*_{CTX-M} apresentaram maior sensibilidade aos antimicrobianos (Tabela 5).

Discussão

A disseminação de bactérias produtoras de ESBLs foi rápida em todo o mundo, indicando que os sistemas de monitoramento contínuo e medidas eficazes de controle de infecção são necessários. As opções terapêuticas para infecções devido aos microorganismos produtores de ESBLs também se tornaram cada vez mais limitadas. Interações de cuidados de saúde, incluindo o uso de antibióticos, particularmente oximino-cefalosporinas e transferência hospitalar estão entre os fatores de risco bem definidos para a aquisição de bactérias produtoras de ESBLs.¹⁵

A taxa de microorganismos produtores de ESBLs dentro da família Enterobacteriaceae na Arábia Saudita é de 6%,² na Itália 7,4%,¹⁶ França 1,7%,¹⁷ Polônia 11,1%,¹⁸ Canadá 5%³ e na América Latina varia de 30 a 60%.¹⁹ Em nosso estudo, a frequência foi de 19% (125/659) por métodos fenotípicos, ao passo que outros estudos brasileiros encontraram 29 e 24%,^{20,21} mostrando que a prevalência de bactérias expressando o fenótipo ESBLs pode variar significativamente de região para região e de hospital para hospital em uma mesma região geográfica.

K. pneumoniae tem sido a espécie com o maior número de isolados produzindo ESBLs, especialmente na América Latina. No Brasil, a prevalência gira em torno de 50%, enquanto nos Estados Unidos e Japão é de 5%, na Europa varia de 15 a 20% e países da Ásia 20 a 50%.^{8,21-23} Nesta pesquisa, 37,5% (63/168) de *K. pneumoniae* eram produtoras de ESBLs em concordância com estudos similares.²⁴

Dentre as cepas produtoras de ESBLs, *K. pneumoniae* foi mais frequente com 50,4% das amostras, seguido de *E. coli* (16%). Trabalhos com β -lactamases na família Enterobacteriaceae demonstraram dados semelhantes,^{9,21,23,24} assim como um estudo multicêntrico que investigou a resistência bacteriana em hospitais brasileiros.⁸ Entretanto, os

trabalhos realizados na Arábia Saudita,² França,¹⁷ e Itália¹⁶ mostram que *E. coli* é o microorganismo mais prevalente nestas regiões.

E. aerogenes, com 16 amostras, apresentou frequência similar à de outros produtores, como *E. coli* e *P. mirabilis*. Além disto, em um dos hospitais estudados (H2), essa taxa foi maior que as demais bactérias, ficando atrás apenas da *K. pneumoniae*. A prevalência de *E. aerogenes* (13,6%) com relação às demais espécies produtoras de ESBLs superou resultados encontrados no sudeste do Brasil e na Itália.^{1,16} Diferente dos nossos achados, outros estudos brasileiros encontraram uma maior prevalência de *E. cloacae*.²¹

Pesquisas realizadas nos Estados Unidos indicam que ainda não é necessário uma padronização para pesquisa de ESBLs em espécies não-*E. coli* e não-*Klebsiella* spp. devido à pequena incidência deste fenótipo.²⁵ Entretanto, nosso estudo demonstrou que a incidência das espécies não-*E. coli*, não-*Klebsiella* spp. e não-*Proteus* spp. foi alta nos hospitais estudados (21%). A ocorrência de ESBLs em outras espécies de enterobactérias já tem sido descrita por outros autores,^{4,21,25} indicando que há necessidade de se padronizar técnicas para detecção das mesmas nos diferentes patógenos da família Enterobacteriaceae.

Com relação à origem dos espécimes clínicos, verificou-se que a urina destacou-se com 36% das amostras, seguido da Secreção Traqueal (20% dos isolados). Outros resultados estão de acordo com nosso trabalho, onde a frequência de microorganismos isolados de urina correspondeu a 67% e 46%.^{2,26} Entretanto, um estudo realizado com várias regiões do Brasil obteve sangue e trato respiratório como principais amostras clínicas com bactérias produtoras de ESBLs.⁸

Os principais fatores de risco para a colonização ou infecção por bacilos produtores dessa enzima são uso prévio de antimicrobianos,^{3,7} presença de dispositivos invasivos como cateter,^{27,28} estadia prolongada em hospitais,^{29,30} hospitalização prévia,¹⁹ atraso no tratamento apropriado, presença de úlceras^{5,7,27} e internação em UTI.^{1,3,19}

O maior índice de bactérias produtoras de ESBLs foi encontrado na UTI (66%) por ser considerada um núcleo de emergência e disseminação de bactérias multiresistentes devido algumas características peculiares, tais como: unidade restrita, alta frequência de contato profissional-paciente, maior possibilidade de transmissão cruzada do patógeno, alta pressão seletiva por antimicrobianos de largo espectro, maior possibilidade de contaminação do meio ambiente incluindo cirurgias, utilização de medicamentos que debilitam a barreira química natural do indivíduo, como antiácidos ou alteram a resposta imune como os corticóides e ainda a inserção de tubos e cateteres, impedindo a eliminação de microorganismo pelos mecanismos fisiológicos.³¹

Em geral, os isolados apresentaram elevados índices de resistência às diferentes classes de antimicrobianos, incluindo a resistência cruzada a outras classes de drogas. Alguns estudos brasileiros têm mostrado que fluoroquinolonas são medicamentos alternativos para o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBLs.⁸ Entretanto, o que se observou foi que houve uma alta resistência das bactérias produtoras de ESBLs a estes medicamentos. Os carbapenens foram as drogas mais ativas contra as amostras positivas para ESBLs. Estes antimicrobianos podem facilmente entrar na célula bacteriana e são mais estáveis à hidrólise provocada por ESBLs.⁹ Entretanto, seu uso deve ser baseado nos resultados do teste de susceptibilidade antimicrobiana, tendo em vista que, em neste estudo, foram isoladas duas cepas (*K. pneumoniae* e *E. cloacae*) resistentes ao ertapenem e uma cepa de *K. pneumoniae* resistente ao imipenem, o que passa a ser um dado preocupante, tendo em vista que a resistência a carbapenens difundida entre as enterobactérias teria consequências catastróficas. Convém ressaltar que tais resultados foram confirmados pelo método do E-test.

A maior parte das ESBLs evoluiu a partir de mutações genéticas em β -lactamases clássicas (TEM-1, TEM-2 e SHV-1), originando, principalmente, variedades de ESBLs dos tipos TEM e SHV.⁷ Nos últimos anos, emergiu uma nova família de ESBLs, a CTX-M,

principalmente em *E. coli*, e tem se tornado uma das mais importantes famílias dessas enzimas em muitos países.³²⁻³⁴ Estudos têm mostrado que CTX-M β -lactamases têm sido o tipo prevalente de ESBLs em países da Europa e América do Sul,^{33,35} inclusive no Brasil.^{34,36}

A alta prevalência de ESBLs do tipo CTX-M em *E. coli* (85%) observada em nossos estudos também encontra-se relatada em trabalhos recentes.^{17,34,37,38} Entretanto, com relação à *K. pneumoniae* não houve tal correlação, uma vez que nosso trabalho mostrou uma prevalência de 96,6% (57/59) ao passo que trabalhos realizados na França¹⁷ e Noruega³⁸ obtiveram 14,8 e 15,8%, respectivamente. Verificou-se que a alta prevalência de genes codificadores de ESBLs do tipo CTX-M não está restrita apenas à *E. coli*, mas a outras espécies como: *K. pneumoniae*, *E. aerogenes* e *P. mirabilis*.

Dez isolados (*K. pneumoniae* - 4; *P. mirabilis* - 3; *S. marcescens* - 2 e *E. aerogenes* - 1) detectados pelo método do disco aproximação como produtores de ESBLs não apresentaram as enzimas CTX-M e TEM (Tabela 4). É provável que os mesmos produzam outros tipos de enzimas que não foram investigados nesta pesquisa.

A epidemiologia molecular de espécies da família Enterobacteriaceae carreadoras dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} tem sido descrita em todo o mundo. Neste estudo, a frequência de *bla*_{CTX-M} foi de 90,4% (104/115). Outros trabalhos também mostraram uma frequência elevada de 92%,³⁷ 82%,¹⁸ 72%³⁹ e 70%.¹⁴ Entretanto, os dados diferem quando comparamos com outros relatos.^{16,40} Para os genes do tipo *bla*_{TEM}, encontramos uma frequência de 75% (86/115) em concordância com resultados da Suécia e Brasil.^{14,37}

O percentual de isolados produtores de ESBLs detectados nos três hospitais estudados reforça a necessidade de teste confirmatório com o objetivo de diferenciar ESBLs de outros mecanismos de resistência para os β -Lactâmicos. Desta forma, considerando que os métodos fenotípicos para detecção de ESBLs não estão padronizados para todos os microorganismos,

os métodos moleculares, embora com custos financeiros elevados, representam a melhor alternativa para a pesquisa de enterobactérias produtoras de ESBLs.

Referências

1. Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, et al. Extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae isolated in a public hospital in Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2009;51:203-209.
2. Khanfar HS, Bindayna KM, Senok AC, Botta GA. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: trends in the hospital and community settings. *J Infect Dev Ctries* 2009;3:295-299.
3. Mendelson G, Hait V, Ben-Israel J, Gronish D, Granot E, Raz R. Prevalence and risk factors of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in an Israeli long-term care facility. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:17-22.
4. Minarini LAR, Gales AC, Palazzo ICV, Darini ALC. Prevalence of Community-Occurring Extended Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Brazil. *Current Microbiology* 2007;54:335-341.
5. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008;8:159-166.
6. Bradford PA. Extended-spectrum- β -lactamases in the 21st century: caracterização, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-951.
7. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:657–686.

8. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Brazilian Journal of Infection and Diseases* 2001;5:200-214.
9. Freitas ALP, Machado DP, Soares FS, Barth AL. Extended-Spectrum β -lactamases in *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* obtained in a Brazilian teaching Hospital: detection, prevalence and molecular typing. *Braz J Microbiol* 2003;34:344-348.
10. Jones RN, Pfaller MA. Antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. with resistance phenotypes consistent with extended-spectrum β -lactamases in Europe. *Clinical Microbiology and Infectious* 2003;9:708-712.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 18th informational supplement. 2008 CLSI document M100-D18. CLSI, Wayne, PA.
12. Harada S, Ishii Y, Yamaguchi K. Extended-spectrum β -Lactamases: Implications for the Clinical Laboratory and Therapy. *Korean J Lab Med* 2008;28:401-412.
13. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Res Microbiol* 2004;155:409-421.
14. Monstein HJ, Östholm-Balkhed A, Nilsson NV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for rapid detection of bla^{SHV} , bla^{TEM} and bla^{CTX-M} genes in Enterobacteriaceae. *APMIS* 2007;115:1400-1408.
15. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Laesripa C, Saifon P. Molecular Characterization and Epidemiology of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates Causing Health Care-Associated Infection in Thailand,

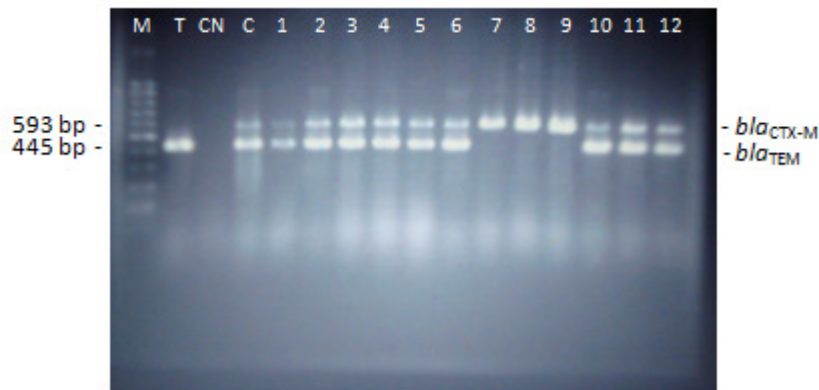
- Where the CTX-M Family Is Endemic. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2818-2824.
16. Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, et al. Trends in Production of Extended-Spectrum β -Lactamases among Enterobacteria of Medical Interest: Report of the Second Italian Nationwide Survey. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44:1659-1664.
 17. Galas M, Decousser J, Breton N, Godard T, Allouch PY, Pina P. Nationwide Study of the Prevalence, Characteristics, and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:786-789.
 18. Empel J, Baraniak A, Literacka E, et al. Molecular Survey of β -Lactamases Conferring Resistance to Newer β -Lactams in Enterobacteriaceae Isolates from Polish Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2449-2454.
 19. Menashe G, Borer A, Yagupsky P, et al. Clinical significance and impact on mortality of extended-spectrum beta lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in nosocomial bloodstream infections. *Scand J Infect Dis* 2001;33:188-193.
 20. Mendes C, Hsiung A, Kiffer C. Evaluation of the in vivo Activity of 9 Antimicrobials Against Bacterial Strains Isolated from Patients in Intensive Care Units in Brazil: MYSTIC Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis* 2000;4:236-244.
 21. Nogueira KS, Higuti IH, Nascimento AJ, et al. Occurrence of Extended-Spectrum Beta-lactamases in Enterobacteriaceae Isolated from Hospitalized Patients in Curitiba, southern Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2006;10: 390-395.
 22. Gales AC, Sader HS, Jones RN. Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin American: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results from the SENTRY Antimicrobial

- Surveillance Program (1997-2000). *Diagnostics Microbiology and Infectious Diseases* 2002;44:301-311.
23. Turner PJ. Extended-spectrum β -lactamase. *Clin Infect Dis* 2005; 41:273-275.
 24. Superti SV, Augusti G, Zavascki AP. Risk factors for and mortality of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* nosocomial bloodstream infections. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2009;51:211-216.
 25. Schwaber MJ, Raney PM, Rasheed JK, et al. 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.
 26. Akpaka PE, Swanston WH. Phenotypic detection and occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* at a tertiary hospital in Trinidad & Tobago. *The Journal of Infectious Diseases* 2008;12:516-520.
 27. Pfaller MA, Segreti J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis* 2006;42:S153–S163.
 28. Silva N, Oliveira M, Bandeira AC, Brites C. Risk factors for infection by extended-spectrum beta-lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* in Salvador, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2006;10:191-193.
 29. Denton M. Enterobacteriaceae. *International Journal of Antimicrobial agents* 2007;3:S9-S22.
 30. MacGowan AP. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 2008;62:ii105-ii114.
 31. Murthy R. Implementation of strategies to control antimicrobial resistance. *Chest* 2003;119:405-411.

32. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JLM, Chanal C, et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-2403Gly. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2269–2275.
33. Livermore DM., Brown DFJ. Detection of β -lactamases-mediated resistance. *Journal of Antimicrobial chemotherapy* 2001;48:S59-S64.
34. Pitout JDD, Church DL, Gregson DB, et al. Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the Calgary Health Region: emergence of CTX-M-15-producing isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1281-86.
35. Canton R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:466–475.
36. Bonnet R, Sampaio JLM, Labia R, et al. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1936–1942.
37. Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *J Clin Microbiol* 2008;46:707-712.
38. Tofteland S, Haldorsen B, Dahl KH, et al. Effects of Phenotype and Genotype on Methods for Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. *Journal of Clinical Microbiology* 2007;45:199-205.
39. Lewis JS, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Jorgensen JH. First Report of the Emergence of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBLs) as the Predominant ESBL Isolated in a U.S. Health Care System. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:4015-4021.

40. Machado E, Coque TM, Cantón R, et al. High diversity of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal. *Journal of Antimicrob Chemother* 2007;60:1370-1374.

Figuras e Tabelas



M: marcador de tamanho molecular de DNA em pares de base (bp), T: controle positivo para ESBLs do tipo TEM, CN: controle negativo (*E. coli* ATCC 25922), C: controle positivo para ESBLs do tipo CTX-M, 1 a 12: amostras de enterobactérias.

Figura 1. Visualização do produto amplificado em gel de agarose.

Tabela 1. Percentual de enterobactérias produtoras de ESBLs pelo método do disco aproximação em três hospitais de São Luís, MA, Brasil, no período de março a agosto de 2009.

Espécies	H1		H2		H3		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17	68,0	31	48,4	15	41,6	63	50,4
<i>Escherichia coli</i>	4	16,0	9	14,1	7	19,4	20	16
<i>Proteus mirabilis</i>	2	8,0	6	9,3	10	27,8	18	14,4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	8,0	14	21,9	0	0,0	16	12,8
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0,0	3	4,7	1	2,8	4	3,2
<i>Serratia marcescens</i>	0	0,0	1	1,6	1	2,8	2	1,6
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0,0	0	0,0	1	2,8	1	0,8
<i>Providencia stuartii</i>	0	0,0	0	0,0	1	2,8	1	0,8
TOTAL	25	100,0	64	100,0	36	100,0	125	100

H1 e H2 (Hospitais privados); H3 (hospital público); n= número de isolados produtores de ESBLs.

Tabela 2. Perfil de resistência antimicrobiana das amostras produtoras de ESBLs para as diferentes espécies.

Espécies	n° de Isolados	% resistência										
		AMP	SAM	AMK	GEN	CIP	LVX	TZP	SXT	IPM	MEM	ERT
<i>K. pneumoniae</i>	63	100.0	100.0	27.0	85.7	84.1	73.0	76.2	95.2	1.6	0.0	1.6
<i>E. coli</i>	20	100.0	100.0	20.0	60.0	70.0	50.0	30.0	90.0	0.0	0.0	0.0
<i>P. mirabilis</i>	18	100.0	100.0	33.3	94.5	88.9	66.7	0.0	83.4	0.0	0.0	0.0
<i>E. aerogenes</i>	16	100.0	100.0	81.3	87.5	93.8	81.3	50.0	93.8	0.0	0.0	0.0
<i>E. cloacae</i>	4	100.0	100.0	75.0	100.0	75.0	75.0	75.0	75.0	0.0	0.0	25.0
<i>S. marcescens</i>	2	100.0	100.0	0.0	0.0	0.0	50.0	0.0	50.0	0.0	0.0	0.0
<i>P. vulgaris</i>	1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
<i>P. stuartii</i>	1	100.0	100.0	0.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

AMP: ampicillin; SAM: ampicillin-sulbactam; AMK: amikacin; GEN: gentamicin; CIP: ciprofloxacin; LVX: levofloxacin; TZP: piperacillin-tazobactam; SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole; IPM: imipenem; MEM: meropenem; ERT: ertapenem.

Tabela 3. Detecção de genes codificadores de ESBLs através da PCR, de acordo com a espécie e amostra clínica.

ESPÉCIE	ORIGEM	N° AMOSTRAS	MULTIPLEX PCR	
			<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}
<i>K. pneumoniae</i>	Bile	2	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	Bile	1		+
<i>K. pneumoniae</i>	Escala	4	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	Ferida operatória	1	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	Ferida operatória	1		+
<i>K. pneumoniae</i>	Fezes	1	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	Líquido pleural	1	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	Ponta de cateter	1	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	Ponta de cateter	3		+
<i>K. pneumoniae</i>	Ponta de cateter	1		
<i>K. pneumoniae</i>	Sangue	6	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	Sangue	3		+
<i>K. pneumoniae</i>	Sangue	1		
<i>K. pneumoniae</i>	Secreção traqueal	7	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	Secreção traqueal	1	+	
<i>K. pneumoniae</i>	Secreção traqueal	5		+
<i>K. pneumoniae</i>	Secreção vaginal	1	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	Swab anal	1	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	Swab anal	1		+

<i>K. pneumoniae</i>	Urina	13	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	Urina	1	+	
<i>K. pneumoniae</i>	Urina	5		+
<i>K. pneumoniae</i>	Urina	2		
<i>E. coli</i>	Escara	1		+
<i>E. coli</i>	Ferida operatória	2	+	+
<i>E. coli</i>	Ferida operatória	1	+	
<i>E. coli</i>	Ferida operatória	1		+
<i>E. coli</i>	Fragmento de lesão	1	+	+
<i>E. coli</i>	Sangue	1	+	+
<i>E. coli</i>	Sangue	1		+
<i>E. coli</i>	Secreção vaginal	1	+	+
<i>E. coli</i>	Urina	6	+	+
<i>E. coli</i>	Urina	2	+	
<i>E. coli</i>	Urina	3		+
<i>P. mirabilis</i>	Escara	1	+	+
<i>P. mirabilis</i>	Ferida operatória	1		
<i>P. mirabilis</i>	Fragmento de lesão	1	+	+
<i>P. mirabilis</i>	Fragmento ósseo	1		+
<i>P. mirabilis</i>	Ponta de cateter	2	+	+
<i>P. mirabilis</i>	Ponta de cateter	1	+	
<i>P. mirabilis</i>	Ponta de cateter	1		
<i>P. mirabilis</i>	Sangue	1	+	
<i>P. mirabilis</i>	Secreção traqueal	3	+	+
<i>P. mirabilis</i>	Swab anal	1	+	
<i>P. mirabilis</i>	Urina	3	+	+
<i>P. mirabilis</i>	Urina	1	+	
<i>P. mirabilis</i>	Urina	1		
<i>P. vulgaris</i>	Fragmento de lesão	1	+	+
<i>E. aerogenes</i>	Urina	5	+	+
<i>E. aerogenes</i>	Urina	1	+	
<i>E. aerogenes</i>	Urina	1		
<i>E. aerogenes</i>	Secreção traqueal	5	+	+
<i>E. aerogenes</i>	Secreção traqueal	2		+
<i>E. aerogenes</i>	Sangue	1	+	+
<i>E. aerogenes</i>	Ponta de cateter	1	+	+
<i>E. cloacae</i>	Ferida operatória	1	+	
<i>E. cloacae</i>	Secreção traqueal	1		+
<i>E. cloacae</i>	swab anal	1	+	+
<i>E. cloacae</i>	Urina	1	+	+
<i>S. marcescens</i>	Sangue	1		
<i>S. marcescens</i>	Secreção traqueal	1		
<i>P. stuartii</i>	Ferida operatória	1	+	+

Tabela 4. Distribuição dos genes codificadores das enzimas TEM e CTX-M entre as espécies de enterobactérias.

Espécies	n° de isolados	Somente TEM		Somente CTX-M		TEM e CTX-M		Total TEM		Total CTX-M	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>K. pneumoniae</i>	59	2	3.4	19	32.2	38	64.4	40	67.8	57	96.6
<i>E. coli</i>	20	3	15.0	6	30.0	11	55.0	14	70.0	17	85.0
<i>P. mirabilis</i>	15	4	26.7	1	26.7	10	66.7	14	93.3	11	77.3
<i>E. aerogenes</i>	15	1	6.7	2	13.3	12	80.0	13	86.7	14	93.3
<i>E. cloacae</i>	4	1	25.0	1	25.0	2	50.0	3	75.0	3	75.0
<i>S. marcescens</i>	0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>P. vulgaris</i>	1	0	0.0	0	0.0	1	100.0	1	100.0	1	100.0
<i>P. stuartii</i>	1	0	0.0	0	0.0	1	100.0	1	100.0	1	100.0
TOTAL	115	11	9.6	29	25.2	75	65.2	86	75.0	104	90.4

Tabela 5. Percentual de resistência antimicrobiana das amostras produtoras de ESBLs de acordo com o tipo de gene.

Gene	n° de Isolados	% resistência										
		AMP	SAM	AMK	GEN	CIP	LVX	TZP	SXT	IPM	MEM	ERT
<i>bla</i> _{TEM}	11	100.0	100.0	27.3	72.7	90.9	63.6	18.2	72.7	0.0	0.0	9.1
<i>bla</i> _{CTX-M}	29	100.0	100.0	10.3	62.1	65.5	55.2	48.3	93.1	0.0	0.0	0.0
<i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{CTX-M}	75	100.0	100.0	50.7	93.3	88.0	76.0	58.7	93.3	1.3	0.0	1.3

AMP: ampicillin; SAM: ampicillin-sulbactam; AMK: amikacin; GEN: gentamicin; CIP: ciprofloxacin; LVX: levofloxacin; TZP: piperacillin-tazobactam; SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole; IPM: imipenem; MEM: meropenem; ERT: ertapenem.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O percentual de isolados produtores de ESBLs detectados nos três hospitais estudados reforça a necessidade de teste confirmatório com o objetivo de diferenciar ESBLs de outros mecanismos de resistência para os β -Lactâmicos;
- O monitoramento da prevalência e dos tipos de ESBLs nos ambientes hospitalares é de fundamental importância para a definição de medidas terapêuticas adequadas. Falhas na detecção dessas enzimas têm contribuído para a falha terapêutica nos pacientes que recebem antibioticoterapia inadequada;
- Considerando que os métodos fenotípicos para detecção de ESBLs não estão padronizados para todos os microorganismos, os métodos moleculares de detecção representam a melhor alternativa, porém o seu custo financeiro os tornam inviáveis para a rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS

- ALKAPA, P. E.; SWANSTON, W. H. Phenotypic detection and occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* at a tertiary hospital in Trinidad & Tobago. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 516-520, 2008.
- BLATT, J. M. Mecanismo de resistência e detecção das betalactamases de espectro ampliado. **NewsLab**, v. 40, p. 86-96, 2000.
- BONNET, R. *et al.* A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 1936-1942, 2000.
- BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.
- BUSH, K. New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 1085-1089, 2001.
- CARTER, M. W.; OAKTON, K.J.; WARNER, M.; LIVERMORE, D. M. Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* with the oxoid combination disk method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 4228-4232, 2000.
- CLINICAL LABORATORIES STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. CLSI. Wayne. PA. 2008
- DALMARCO, E. M.; BLATT, S. L.; CORDOVA, C. M. M. Identificação laboratorial de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) – Revisão. **RBAC**, v. 38, p. 171-177, 2006.
- DENTON, M. Enterobacteriaceae. **International Journal of Antimicrobial agents**, v. 3, p. S9-S22, 2007.
- DROPA, M. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae isolated in a public hospital in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 51, p. 203-209, 2009.
- ESMERINO, L. A.; GONÇALVES, L. G.; SCHELESKY, M. E. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de infecções urinárias comunitárias. **Ci. Biol. Saúde**, v. 9, p. 31-39, 2003.
- FARMER III, J. J.; BOATWRIGHT, K. D.; JANDA, M. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of Clinical microbiology**. 9 ed. American Society for Microbiology: Washington, v. 1, cap. 42, p. 649-669, 2007.
- FREITAS, A. L. P.; MACHADO, D. P.; SOARES, F. S. C.; BARTH, A. L. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* obtained in a Brazilian teaching hospital: detection, prevalence and molecular typing. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, p. 344-328, 2003.

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

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

GOMEZ, J.; VÁZQUEZ, E. G.; GÓMEZ, J. R. Significación clínica de las resistências bacterianas: una perspectiva histórica (1982-2007). **Ver. Esp. Quimioter.**, v. 21, p. 115-122, 2008.

HARADA, S.; ISHII, Y.; YAMAGUCHI, K. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. **Korean J. Lab. Med.**, v. 28, p. 401-412, 2008.

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

JONES, R. N. *et al.* Antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. with resistance phenotypes consistent with extended-spectrum β -lactamases in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, p. 708-712, 2003.

KHANFAR, H. S. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: trends in the hospital and community settings. **J. infect. Dev. Ctries.**, v. 3, p. 295-299, 2009.

LIVERMORE, D. M. Mechanisms of resistance to β -lactams antibiotics. **Scandinavian Journal Infectious Diseases**, v. 78, p. 7-16, 1991.

LIVERMORE, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 557-584, 1995.

LIVERMORE, D. M.; BROWN, D. F. J. Detection of β -lactamases-mediated resistance. **Journal of Antimicrobial chemotherapy**, v. 48, p. S59-S64, 2001.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 413-420, 2006.

MACGOVAN, A. P. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. ii105-ii114, 2008.

MENASHE, G. *et al.* Clinical significance and impact on mortality of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in nosocomial bloodstream infections. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 33, p. 188-193, 2001.

MENDELSON, G. *et al.* Prevalence and risk factors of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in an Israeli long-term care facility. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 24, p. 17-22, 2005.

MINARINI, R. A. R.; GALES, A. C.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, L. C. Prevalence of community-occurring extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Brazil. **Current Microbiology Reviews**, v. 54, p. 335-341, 2007.

MONSTEIN, H. J. *et al.* Multiplex PCR amplification assay for rapid detection of ^{bla}SHV, ^{bla}TEM and ^{bla}CTX-M genes in Enterobacteriaceae. **APMIS**, v. 115, p. 1400–1408, 2007.

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

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

OZGUMUS, O. B.; TUSUN, I.; AYDIN, F.; KILIC, A. O. Horizontal dissemination of TEM and SHV-Type Beta-lactamase genes carrying resistance plasmids amongst clinical isolates of Enterobacteriaceae. **Brazilian Journal of microbiology**, v. 39, p. 636-643, 2008.

PATERSON, D. L. Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **Am. J. Infect. Control**, v. 34, p. S20-S28, 2006.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 657-676, 2005.

PFALLER, M. A.; SEGRETÍ, J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, p. S153–S163, 2006.

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

RIVA, K. B.; BRUST, F. R.; PICOLI, S. U. Disco-Aproximação e E-teste na Pesquisa de Enterobactérias Produtoras de Beta-lactamase de Espectro Estendido (ESBL). **RBAC**, v. 40, p. 305-308, 2008.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

SADER, H. S. Antimicrobial Resistance in Brazil: Comparison of results from two multicenter studies. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 4, p. 91-99, 2000.

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

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

SANCHEZ, L.; RIOS, R.; MATTAR, S. Detección de beta-lactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* aislados en una clínica de Villavivencio, Colombia. **Asociación Colombiana de Infectología**, v. 12, p. 193-200, 2008.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; AHMED, S.; HAMEED, A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 409-421, 2004.

SILVA, C. H. P. M. Elaboration and evaluation of a new screening medium for detection and presumptive identification of extended-spectrum β -lactamase-producing organisms (ESBL). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 271-274, 2000.

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

SOUSA JR, M. A.; FERREIRA, E. S.; CONCEIÇÃO, G. C. Betalactamasas de espectro ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. **NewsLab**, v. 63, p. 152-174, 2004.

STURENBURG, E.; MACK, D. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **Journal of Infection**, v. 47, p. 273-295, 2003.

SUPERTI, S. V.; AUGUSTI, G.; ZAVASCKI, A. P. Risk factors for and mortality of stended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* nosocomial bloodstream infections. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 51, p. 211-216, 2009.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

TENOVER, F. C. *et al.* Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detect by automatic susceptibility testing. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1209-1213, 2006.

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

TURNER, P. J. Extended-spectrum β -lactamase. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 273-275, 2005.

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

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](#)