

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS/GENÉTICA E
BIOTECNOLOGIA

Vanessa Cordeiro Dias

**PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E AVALIAÇÃO
FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA A B-LACTÂMICOS
(ESBL, AmpC E KPC) EM ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE
INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO**

Juiz de Fora
Dezembro/2010

VANESSA CORDEIRO DIAS

**PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E AVALIAÇÃO
FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA A B-LACTÂMICOS
(ESBL, AmpC E KPC) EM ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE
INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadores:

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz
Prof^a. Dr^a. Vânia Lúcia Silva (co-orientadora)

Juiz de Fora
Dezembro/2010

Dias, Vanessa Cordeiro.

Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e avaliação fenotípica e genotípica da resistência a β -lactâmicos (ESBL, AmpC e KPC) em enterobactérias isoladas de infecções do trato urinário. Juiz de Fora (MG), 2010/ Vanessa Cordeiro Dias. – 2011.
74 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Imunologia)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Infecções bacterianas. 2. Sistema Urinário. . I. Título.

CDU 616.98

DESENVOLVIMENTO

Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

COLABORAÇÃO

Prof^a. Dra. Cíntia Marques Coelho
Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos
Departamento de Biologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

Cortes Villela Medicina Laboratorial
Laboratório de Análises Clínicas
Juiz de Fora, MG

APOIO FINANCEIRO

Laboratório Cortes Villela, Juiz de Fora, MG
CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

Dedico este trabalho ao meu pai, que mesmo ausente fisicamente se faz presente nas lembranças.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelas orações e presença nesta caminhada.

Ao meu orientador, Cláudio Galuppo Diniz, exemplo de competência, postura e sucesso profissional, meu profundo respeito e admiração. Muito obrigada pela oportunidade, confiança, conhecimento científico, amizade e orientação. Agradeço também por ter acreditado que eu seria capaz de realizar este trabalho, embora a dupla jornada.

À minha co-orientadora, Vânia Lucia da Silva, pelo apoio científico, suporte técnico, amizade, confiança, carinho e atenção. Enorme gratidão também pelo exemplo de profissionalismo e ensinamentos repassados.

À Prof^a Cíntia Marques Coelho, obrigada pela disponibilidade, atenção, ensinamentos, correções e sugestões.

Ao Laboratório Côrtes Villela pela oportunidade que me foi concedida.

Ao Dr. Marinho, Dr. Ricardo e Dr. André pela confiança, amizade, carinho e incentivo. Jamais esquecerei dos valiosos conselhos, das portas abertas em meu caminho e da inspiração para escolher a microbiologia como área de atuação profissional. Muito obrigada!

Ao Flávio Januário e Renato Barbosa pela valiosa contribuição na pesquisa dos dados registrados no sistema de informática do Laboratório Cortes Villela.

Ao Maurício Soares Ferreira pelos ensinamentos, amizade e incentivo.

Aos demais colegas do Laboratório Cortes Villela pela colaboração na execução de muitos serviços.

À Renata Barros, pela ajuda incansável na execução das inúmeras tarefas, amizade, carinho e dedicação.

Às amigas Vivian Barletta e Sílvia Lanziotti pela experiência compartilhada, companheirismo, carinho e incentivo.

Aos amigos que fiz durante o curso que de uma forma ou de outra me ajudaram nesta conquista.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana pela ajuda na concretização dos experimentos e pelo aprendizado compartilhado.

A Deus, por ter colocado todas essas pessoas em minha vida e também por iluminar sempre meu caminho.

RESUMO

As infecções do trato urinário (ITU) são manifestações frequentes na população, geralmente causadas por bacilos Gram-negativos. As β -lactamases são enzimas bacterianas que conferem resistência aos antimicrobianos do tipo β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, aztreonam e carbapenêmicos). A produção de β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) tem sido descrita como um importante mecanismo de resistência aos β -lactâmicos. De maneira geral, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são as espécies bacterianas mais comumente encontradas produzindo ESBL, embora a detecção dessas enzimas já tenha sido observada em diversos gêneros dentro da família *Enterobacteriaceae*. O objetivo deste estudo foi avaliar os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos e correlacionar os testes fenotípicos com a detecção de marcadores genéticos para produção de β -lactamases dos tipos ESBL, AmpC e KPC em enterobactérias associadas à etiologia de ITUs em pacientes atendidos em um Laboratório de Análises Clínicas da cidade de Juiz de Fora, MG. Para o estudo retrospectivo (2001-2008), 66.660 isolados de urina com suspeita de ITU foram analisadas, e após a identificação bioquímica, as linhagens de enterobactérias foram submetidas a testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, pelo método de disco-difusão, de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute/CLSI. A detecção fenotípica da produção de ESBL foi feita através do teste de aproximação dos discos. Para o estudo prospectivo (2009), 12.304 amostras com suspeita de ITU foram avaliadas, e após a identificação bioquímica das linhagens, foram feitos os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos e o teste de aproximação dos discos, para a detecção fenotípica da produção de ESBL. A identificação dos marcadores de β -lactamase (SHV, TEM, CTX-M, AMPc e KPC) foi feita por reação em cadeia da polimerase (PCR). De 416 linhagens produtoras de ESBL entre 2001- 2008, *E. coli* foi a mais freqüente (74,4%). Altos níveis de resistência foram obtidos para sulfazotrim, gentamicina e ciprofloxacina neste período. Todas as linhagens foram sensíveis ao imipenem. No estudo prospectivo, 105 linhagens produtoras de ESBL foram isoladas, sendo *E. coli* a mais freqüente (63%). Foi observado um alto índice de resistência a amoxicilina-clavulanato (80,8%), e aproximadamente 70% das amostras foram resistentes à associação trimetoprim/sulfametoxazol e as fluoroquinolonas (ciprofloxacina e ácido nalidíxico). Dentre as drogas utilizadas como substrato para detecção de ESBL, a cefotaxima foi o substrato com maior índice de resistência (86,6%), seguido de aztreonam (60,9%) e ceftazidima (55,2%). Entre as 105 linhagens recuperadas, todos os marcadores genéticos pesquisados para ESBL foram detectados. Considerando-se a freqüência de detecção dos marcadores genéticos, TEM foi o mais frequente (86,6%), seguido por SHV (59%), CTX-M (31,4%) e AMPc (27,6%). Em todas as linhagens bacterianas avaliadas, foi detectado pelo menos 1 dos marcadores genéticos associados à produção de β -lactamases (22,8%), 52,4% apresentaram 2 marcadores, 20% apresentaram 3 marcadores e 4,8% apresentaram 4 dos marcadores pesquisados. β -lactamases do tipo KPC não foram detectadas. O conhecimento da epidemiologia, dinâmica de disseminação e circulação destes marcadores genéticos de resistência a drogas constitui um dado clínico relevante, pois possibilita a instauração de uma terapia antimicrobiana mais adequada, bem como a construção de um banco de informações epidemiológicas, como ferramenta para contenção da expansão da disseminação dos genes de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos.

Palavras chaves: ESBL, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, KPC, SHV, TEM, TEM, CTX-M, AMPc

ABSTRACT

The urinary tract infections (UTI) are highly frequent within the population and usually caused by Gram-negative rods. The bacterial β -lactamases are enzymes which confer resistance against β -lactam antibiotics (penicillins, cephalosporins, aztreonam and carbapenems) amongst which Extended Spectrum β -Lactamases (ESBL) has been described as an important resistance mechanism to the β -lactam in Gram-negative bacteria. Generally, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are the most frequent ESBL producing bacterial species, but its production by representatives of other bacterial genus within the *Enterobacteriaceae* family has already been documented. The aim of this study were to evaluate the antimicrobial susceptibility patterns and to correlate phenotypic tests with the detection of genetic markers for β -lactamases production such as ESBL, AmpC and KPC in enterobacteria associated to the UTI etiology in patients assisted at a Clinical Analyses Laboratory in Juiz de Fora, MG. From a retrospective study (2001-2008), 66.660 urine samples were analyzed, and the biochemically identified bacteria were submitted to antibiotic susceptibility testing by the disk-diffusion method, according to the Clinical Laboratory Standards Institute/CLSI guidelines. Further, phenotypic detection of the ESBL production was carried out through the disk approximation test. From a prospective study (2009), 12.304 samples were evaluated, and after the microbial identification, antibiotic susceptibility tests and disk approximation assays were performed, for ESBL phenotypic detection. Identification of β -lactamase genetic markers (SHV, TEM, CTX-M, AMPc and KPC) were performed through polymerase chain reaction (PCR). Out of 416 ESBL producing bacteria identified between 2001 and 2008, *E. coli* was the most frequent (74.4%). High resistance levels were obtained for trimethopim-sulfamethoxazole, gentamicin and ciprofloxacin in this period. All of the strains were sensitive to imipenem. Regarding the prospective study, 105 ESBL producing bacteria were isolated, being *E. coli* the most frequent (63%). A high resistance rate was observed against amoxicillin/clavulanic-acid (80.8%), and almost 70% of the samples were resistant to the association trimethopim-sulfamethoxazole and the fluoroquinolones (ciprofloxacin and nalidixic acid). Among the drugs for ESBL detection, the cefotaxime was the substrate with the highest resistance rate (86.6%), followed by aztreonam (60.9%) and ceftazidime (55.2%). Among these strains, all of the researched genetic markers for ESBL were detected. In regard to the frequency of detection of the genetic markers, TEM was the most frequent (86.6%), following by SHV (59%), CTX-M (31.4%) and AmpC (27.6%). In all of the bacterial strains it was detected at least 1 of the genetic markers associated to the production of β -lactamases. Two markers were detected in 52.4% and in 20% and 48%, at least 3 or 4 markers were detected, respectively. The KPC type β -lactamase was not detected. The knowledge about the epidemiology, spread dynamics and circulation of these resistance genetic markers to drugs among the different bacterial populations constitutes a relevant issue and makes possible the establishment of a more appropriated chemotherapy. Besides, the generation of basic epidemiological information may sustain for contention of the antimicrobial resistance and the spread of resistant genetic markers related to inactivation of β -lactam drugs.

Key words: ESBL, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, KPC, SHV, TEM, TEM, CTX-M, AMPc

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Anel β -lactâmico	17
Figura 2. Teste confirmatório positivo para ESBL, com a formação de zona fantasma entre drogas β -lactâmicas e o disco de ácido clavulânico: método de aproximação dos discos. CAZ = ceftazidima, CTX = cefotaxima, AZT = aztreonam	28
Figura 3. Teste positivo para detecção de β -lactamase do grupo C de Ambler (induzida). CFO = cefoxitina, CAZ = ceftazidima	29
Figura 4. Evolução dos níveis de resistência a antimicrobianos entre as espécies de enterobactérias produtoras de ESBL isoladas de infecção de trato urinário no período de 2001 a 2008	41
Figura 5. Eletroforegrama representativo da amplificação de segmento parcial do gene codificador para β -lactamase de espectro estendido <i>bla</i> _{TEM} (968pb) em enterobactérias	45
Figura 6. Eletroforegrama representativo da amplificação de segmento parcial do gene codificador para β -lactamase de espectro estendido <i>bla</i> _{SHV} (982pb) em enterobactérias	45
Figura 7. Eletroforegrama representativo da amplificação de segmento parcial do gene codificador para β -lactamase de espectro estendido <i>bla</i> _{CTX-M} (562pb) em enterobactérias	46
Figura 8. Eletroforegrama representativo da amplificação de segmento parcial do gene codificador para β -lactamase do tipo <i>ampC</i> (630pb) em enterobactérias	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Grupos de β -lactâmicos em uso na terapia antimicrobiana, segundo Samaha-Kfoury e Araj (2003)	Pag. 18
---	------------

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Oligoiniciadores utilizados	35
Tabela 2. Distribuição das espécies de enterobactérias (n=416) produtoras de ESBL, recuperadas de monoinfecção de trato urinário no período de 2001 a 2008	37
Tabela 3. Distribuição de microrganismos da família <i>Enterobacteriaceae</i> produtores de ESBL isolados de infecção de trato urinário, no período de 2001 a 2008 e frequência (%) de detecção de resistência a drogas antimicrobianas	39
Tabela 4. Distribuição das espécies de enterobactérias (n=105) produtoras de ESBL recuperadas de monoinfecção de trato urinário, no período de janeiro a dezembro de 2009	43
Tabela 5. Frequência de observação de resistência a drogas antimicrobianas (%) entre as enterobactérias produtoras de β -lactamase, isoladas de paciente com ITU, em 2009	44
Tabela 6. Frequência de detecção dos genes codificadores de β -lactamase pesquisados nas espécies bacterianas, isoladas em 2009	47
Tabela 7. Características fenotípicas e genotípicas das bactérias produtoras de β -lactamase de espectro estendido, isoladas em 2009	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Infecções do trato urinário.....	16
2.2 Antimicrobianos β -lactâmicos.....	17
2.3 Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos	20
2.3.1 Resistência aos antimicrobianos associada a enzimas do tipo β - lactamases	22
2.3.2 Tipos de tipo β -lactamases de espectro estendido.....	24
2.3.2.1 ESBL do tipo SHV.....	24
2.3.2.2 ESBL do tipo TEM.....	25
2.3.2.3 ESBL do tipo CTX-M.....	25
2.3.3 Enzimas β -lactamases do tipo AmpC.....	26
2.3.4 Enzimas β -lactamases do tipo carbapenemases.....	27
2.4 Métodos e técnicas usadas para o estudo de resistência associada à produção de β -lactamase.....	27
2.4.1 Métodos baseados em testes fenotípicos.....	27
2.4.2 Métodos baseados em testes genotípicos.....	30
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivos gerais.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Estudo retrospectivo (2001 a 2008).....	32
4.2 Estudo prospectivo (2009 a 2010).....	33
4.2.1 Isolamento de amostras bacterianas no ano de 2009.....	33
4.2.2 Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	33
4.2.3 Determinação fenotípica da produção de ESBL.....	34
4.2.4 Extração de DNA bacteriano.....	34
4.2.5 Identificação dos marcadores de β -lactamases por PCR.....	35
5 RESULTADOS	37
5.1 Estudo retrospectivo (2001 a 2008)	37
5.2 Estudo prospectivo (2009 a 2010).....	42

5.2.1 Isolamento e identificação de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL.....	42
5.2.2 Perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas	43
5.2.3 Caracterização das β -lactamases.....	45
6 DISCUSSÃO.....	51
6.1 Considerações finais.....	57
7 CONCLUSÕES.....	59
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

O trato urinário é um dos locais mais comuns de infecção bacteriana. Infecções urinárias não complicadas, adquiridas na comunidade, são muito freqüentes e acometem ambos os sexos, com maior freqüência nas mulheres. Embora a maioria destas infecções seja de natureza aguda e de curta duração, elas contribuem para uma taxa significativa de morbidade na população. As formas graves da doença podem resultar em perda da função renal e em seqüelas permanentes. A principal bactéria isolada nas uroculturas é *Escherichia coli*.

Os β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmico) são inibidores ativos da síntese da parede celular e, mesmo associados ou não aos inibidores de β -lactamases (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam), constituem a principal classe de antimicrobianos utilizada na prática clínica. Em contrapartida, as bactérias desenvolveram diferentes estratégias para neutralizar a ação dessas drogas. As β -lactamases são consideradas enzimas capazes de catalisar a hidrólise de amidos, amidinas e outras ligações C-N, separando, assim, a base do substrato. A atividade dessas enzimas está dirigida especificamente à hidrólise do anel β -lactâmico, provocando a produção de um composto desprovido de atividade antimicrobiana. O uso irracional dos antibióticos β -lactâmicos, tanto na prática clínica quanto na agricultura e pecuária, vem contribuindo, por várias décadas, para a seleção de bactérias tanto Gram negativas quanto Gram positivas que produzam essas enzimas.

Em investigações epidemiológicas utilizadas para sustentar as observações clínico-laboratoriais relacionadas a este fenômeno, é considerada de fundamental importância a disseminação dos marcadores genéticos entre células bacterianas. Embora a globalização tenha contribuído para a propagação destes marcadores, alguns ainda podem ser considerados típicos de determinadas áreas geográficas, ou de distribuição ampla. Um grande número de classes de genes tem sido descritos como marcadores de resistência aos β -lactâmicos e são divididos ou classificados de acordo com o comportamento bioquímico-fisiológico das enzimas codificadas.

A produção de β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) também tem sido descrita como um importante mecanismo de resistência aos β -lactâmicos. Estas substâncias são codificadas por genes plasmidiais como *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, e *bla*_{CTX-M},

cujo produto de expressão pode hidrolisar drogas β -lactâmicas como as cefalosporinas de 1^a, 2^a e 3^a geração, além de monobactâmico. No entanto, estas enzimas do tipo ESBL podem ser inativadas por substâncias inibidoras de β -lactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam.

De maneira geral, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são as espécies bacterianas mais comumente encontradas produzindo ESBL. Entretanto, a detecção dessas enzimas já foi observada em diversos outros gêneros da família *Enterobacteriaceae*, tais como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia* e espécies da família *Pseudomonaceae*.

Os marcadores de resistência do tipo *ampC* são genes que podem estar associados ao cromossomo ou a plasmídios bacterianos e codificam enzimas que podem ter sua expressão indutiva ou constitutiva. Estas enzimas são resistentes aos inibidores de β -lactamases e podem hidrolisar todas as drogas β -lactâmicas com exceção das cefalosporinas de 4^a geração e os carbapenêmicos.

As enzimas do tipo carbapenemases são codificadas por diversos genes já descritos, como *bla*_{IMI}, *bla*_{GES}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA}. Conforme a classificação proposta por Ambler, tais enzimas podem ser agrupadas em 3 classes. Classe A (serina β -lactamases) compreende os tipos IMI, GES e KPC, por exemplo. A presença desses genes plasmidiais confere resistência às penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e aztreonam. Entretanto, estas enzimas são inibidas por associação com inibidores de β -lactamases. As metalo-beta-lactmases (classe B) são enzimas dependentes de zinco, capazes de apresentar resistência a todos os β -lactâmicos, incluindo associações com ácido clavulânico, com exceção do aztreonam, ao qual podem apresentar-se sensíveis. São os tipos IMP, VIM, SPM, GIM, dentre outros. As oxacilinas (OXA) são carbapenemases que utilizam a oxacilina como substrato e são inibidas pelo ácido clavulânico, não dependendo do zinco como co-fator. Algumas apresentam atividade hidrolítica frente aos carbapenêmicos. Podem ser produzidas por genes tanto cromossômicos quanto plasmidiais.

O conhecimento da epidemiologia, da dinâmica de disseminação e circulação destes marcadores genéticos de resistência a drogas constitui um dado clínico relevante, pois possibilita a instauração de uma terapia antimicrobiana mais adequada, bem como a prevenção e desaceleração da perda gradativa desses fármacos do nosso arsenal terapêutico.

Assim, dando sequencia à linha de pesquisa do Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular Bacteriana sobre “Epidemiologia da resistência e resposta bacteriana aos antimicrobianos”, com este trabalho, pretende-se avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e a ocorrência de marcadores genéticos relacionados à produção de β -lactamases em bactérias Gram negativas da família *Enterobacteriaceae*, isoladas de infecções de trato urinário, em Juiz de Fora, MG. As informações geradas poderão contribuir para a construção de bancos de dados para vigilância epidemiológica a cerca da resistência bacteriana a drogas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infecções do trato urinário

As infecções do trato urinário (ITU) são manifestações freqüentes na população, independente da idade, com maior incidência nas mulheres do que nos homens, em decorrência da uretra feminina ser mais curta, favorecendo a colonização pela microbiota do trato gastrintestinal. Outro aspecto relevante na mulher seria a probabilidade de contaminação bacteriana da uretra feminina no ato sexual (SPIEGEL, 1991; SCHAECHTER et al., 1999).

As ITU's podem ser classificadas de acordo com a sua localização anatômica: a das vias inferiores, como cistite, uretrite, epididimite e prostatite e das vias superiores, que correspondem às infecções que acometem os rins (pielonefrites) (YAMASAKI, 1999).

Um achado clínico comum na predisposição dos pacientes a ITU é um fluxo urinário comprometido, seja por obstrução da bexiga, estrangulamento da uretra, hipertrofia da próstata, expansão do útero durante a gestação, nefropatia diabética ou poliomielite (KONEMAN et al., 2001).

Nos EUA, considera-se que essas infecções sejam responsáveis por mais de 8 milhões de consultas médicas anuais (GUPTA, 2001), sendo comum casos de infecções por repetição (RAZ et al., 2000).

No Brasil, a ITU de origem hospitalar é responsável por aproximadamente 40% de todas as infecções hospitalares, sendo também uma das maiores fontes de sepse adquiridas neste ambiente. Nestes casos, o uropatógeno mais encontrado é *Escherichia coli*. Entretanto, outros bacilos Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* também são causadores de ITU hospitalar, como *Klebsiella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp* e *Proteus spp*. *Acinetobacter spp*, *Candida albicans* e cocos Gram-positivos, como *Staphylococcus spp* e *Enterococcus spp* também estão associadas a estas infecções (BLATT e MIRANDA, 2005).

Infecções urinárias de origem comunitária são comumente causadas por bacilos Gram-negativos e, também nestes casos, estudos apontam *Escherichia coli* como a bactéria mais isolada nas uroculturas, com índices de 75 a 90%.

Staphylococcus saprophyticus, *Enterococcus spp* e outras enterobactérias, como *Proteus mirabilis* e espécies de *Klebsiella*, estão frequentemente associadas a ITU adquiridas na comunidade (ESMERINO, GONÇALVES e SCHELESKY, 2003).

2.2 Antimicrobianos β -lactâmicos

Os antimicrobianos são substâncias com baixo peso molecular capazes de provocar alterações que promovem a morte (bactericida) ou inibição do crescimento e da reprodução bacteriana (bacteriostático). São vários os seus mecanismos de ação: inibição da síntese da parede celular, alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, além de interferência na replicação do DNA e na síntese protéica (MURRAY et al., 2004; RANG et al., 2004).

Os β -lactâmicos representam a classe de antimicrobianos mais variada e mais amplamente utilizada na rotina médica (BERTONCHELI e HÖRNER, 2008). Sua ampla utilização deve-se principalmente ao fato de possuírem baixa toxicidade, boa ação antimicrobiana e atividade modulada de acordo com as características moleculares do anel β -lactâmico (Figura 1) (KUBOYAMA, 2009). Atuam como inibidores da síntese da parede celular bacteriana, estrutura vital para estes microrganismos e inexistente nas células humanas, o que a torna o foco de atenção para o desenvolvimento de novas drogas (SAMAH-KFOURY e ARAJ, 2003).

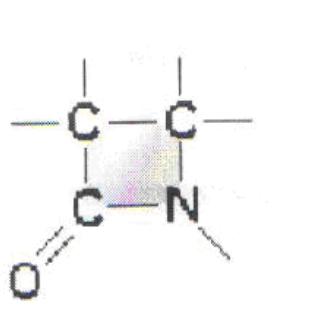


Figura 1: Anel β -lactâmico

De acordo com sua estrutura molecular, os compostos β -lactâmicos são divididos em 4 grupos: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmico e

carbapenêmicos (Quadro 1). A base da estrutura molecular destas substâncias é um anel β -lactâmico, que é essencial para o mecanismo de ação dessas drogas na parede celular bacteriana (Figura 1). Tal anel também é o alvo de atuação das enzimas (β -lactamases) envolvidas na resistência bacteriana a estes compostos. A estrutura química destes fármacos vem sendo frequentemente manipulada, para se obter maior atividade e mais aplicações terapêuticas (FORBES, et al., 1998).

Quadro 1. Drogas β -lactâmicas em uso na terapia antimicrobiana, segundo Samaha-Kfoury e Araj (2003).

Penicilinas	Penicilina G, penicilina V
	Penicilinas resistentes a penicilinase: meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina
	Aminopenicilinas: ampicilina, amoxicilina
	Carboxipenicilinas: carbenicilina, ticarcilina
	Ureidopenicilinas: mezlocilina, piperacilina
Cefalosporinas	1ª Geração: cefazolina, cefalotina, cefalexina
	2ª Geração: cefuroxima, cefaclor, cefamandol, cefamicinas (cefotetan, ceftioxima)
	3ª Geração: cefotaxima, ceftriaxona, cefpodoxima, ceftizoxima, cefoperazona, ceftazidima
	4ª Geração: cefepime, ceftipime
Monobactâmico	Aztreonam
Carbapenêmicos	Imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem

As penicilinas constituem um dos grupos mais importantes entre os antibióticos β -lactâmicos. A primeira penicilina foi descoberta por Alexander Fleming em 1928 e, uma década mais tarde, através de pesquisas conduzidas por Florey, Chain e Abraham, tornaram-se agentes terapêuticos sistêmicos (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2006). As penicilinas mais antigas, como a benzilpenicilina, são obtidas de culturas de *Penicillium chrysogenum*, enquanto as mais recentes são semi-sintéticas, obtidas por incorporação de grupamentos químicos ao anel β -lactâmico (RANG, DALE e RITTER, 2001). A penicilina G e a penicilina V são, de modo geral, bastante ativas contra cocos Gram-positivos, apesar de demonstrarem-se ineficazes contra algumas linhagens de *Staphylococcus aureus*, sendo rapidamente hidrolisadas por penicilinases. Em contrapartida, penicilinas resistentes à penicilinases, como meticilina, oxacilina e cloxacilina são consideradas alternativas de escolha para o tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* produtores de

penicilinas. Penicilinas como ampicilina e amoxicilina constituem um grupo de drogas com ação melhorada sobre bactérias Gram-negativas, como *Haemophilus influenzae* e representantes da família *Enterobacteriaceae*, tais como *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2006).

As cefalosporinas são agentes antimicrobianos semi-sintéticos derivados do fungo *Cephalosporium acremonium* (ROCHA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009). Estas substâncias possuem um anel β -lactâmico fundido a um anel dihidrotiazínico constituindo o núcleo *cefem* característico de todas as cefalosporinas, e que as diferencia das penicilinas (MARSHALL e BLAIR, 1999). Do ponto de vista clínico, é comum agrupar esses compostos em quatro gerações, de acordo com algumas características estruturais e microbiológicas em comum (NEU, 1985; MELLA et al., 2001). As cefalosporinas de primeira geração, como cefalexina, cefalotina e cefazolina apresentam boa atividade sobre cocos Gram-positivos como *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*. No entanto, carecem de atividade sobre *Enterococcus spp.* Sua atividade sobre bacilos Gram-negativos é limitada a linhagens de *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* e *Proteus mirabilis* não produtores de β -lactamases (MELLA et al., 2001). As cefalosporinas de segunda geração, como cefuroxima e cefoxitina, exibem uma atividade ligeiramente aumentada contra microrganismos Gram-negativos, mas muito menos ativas do que os agentes de terceira geração (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2006). Apresentam como característica marcante a sua atividade sobre *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoea*. Apresentam também maior atividade sobre enterobactérias resistentes a cefalotina, como linhagens de *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Providencia* e *Proteus*, quando comparada às de primeira geração. A terceira geração inclui cefalosporinas de amplo espectro de ação, como ceftriaxona, ceftazidima e cefotaxima. Apesar de normalmente serem menos ativas do que as de primeira geração contra cocos Gram-positivos, exibem atividade muito maior contra as enterobactérias, incluindo linhagens produtoras de betalactamases clássicas (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2006). As cefalosporinas de quarta geração, como a cefepime, possuem um maior espectro de ação quando comparadas às de terceira geração.

Os carbapenêmicos, como imipenem e meropenem, representam uma classe de β -lactâmicos de boa estabilidade frente à β -lactamases e com um amplo espectro

de ação, incluindo cocos e bacilos Gram-positivos e Gram-negativos, aeróbios e anaeróbios. Atuam ainda sobre bactérias que se tornaram resistentes às cefalosporinas de 2ª e 3ª geração (BRUNTON, LAZO e PARKER, 2006 e OLIVEIRA et al., 2009). No entanto, apesar de boa atividade, o seu uso indiscriminado deve ser evitado, uma vez que os carbapenêmicos podem induzir produção de β -lactamases plasmidiais em bacilos Gram-negativos, levando a uma resistência cruzada entre monobactâmico, cefalosporinas de 2ª e 3ª geração, ureidopenicilinas e entre os próprios carbapenêmicos (HELLINGER e BREWER, 1999).

O monobactâmico, aztreonam, é usado principalmente como uma alternativa aos aminoglicosídeos para o tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas. São comumente utilizados em ITU's, infecções cutâneas, respiratórias, intra-abdominais, ginecológicas e septicemia (HELLINGER e BREWER, 1999).

2.3 Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos

À medida que os diferentes agentes de pressão seletiva, como as drogas antimicrobianas, são introduzidos no ambiente, os microrganismos respondem, podendo se tornar resistentes a eles. Algumas espécies bacterianas são consideradas naturalmente resistentes aos antimicrobianos (resistência intrínseca). Outras, sob exposição continuada a estes compostos, podem apresentar resistência adquirida, decorrente do desenvolvimento de novos mecanismos de defesa. Estes mecanismos adquiridos resultam em alterações na fisiologia celular e na estrutura microbiana devido a alterações genéticas (WITTE, 2000 e O'BRIEN, 2002).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos e outros compostos pode se apresentar sob diferentes fenômenos bioquímicos. Do ponto de vista genético, a resistência pode ser mediada por genes cromossômicos (via mutações ou alterações na expressão gênica), por genes situados em elementos extracromossomais, tais como plasmídeos ou, ainda, em elementos móveis do próprio genoma, como os transposons e os integrons (ODELSON et al., 1987; RANG et al., 2004; SERRANO, 2005). Desta forma, estas modalidades de resistência, tanto a mutação

(cromossômica) quanto a transferível (via elementos extracromossomais) podem estar presentes na mesma bactéria.

Segundo Rang et al. (2004), os plasmídeos são moléculas extracromossomais de DNA circulares, encontradas livremente no citoplasma, que podem replicar-se por si próprios. Não se sabe como esses genes apareceram, porém grande parte da resistência a fármacos se deve a presença desses plasmídeos. Os plasmídeos podem ser eliminados da célula depois de serem submetidos a diferentes condições de estresse, como mudanças na temperatura, presença de certos corantes ou carência de certos nutrientes. Entretanto, a presença destes elementos pode conferir vantagens seletivas, como degradação de certos substratos, resistência a um antibiótico ou a um metal tóxico, por exemplo.

Rossi e Andreatzi (2005) distinguiram alguns mecanismos bacterianos de resistência aos fármacos β -lactâmicos: (i) Alteração do sítio ativo da droga na bactéria: os β -lactâmicos são capazes de se ligar a proteínas ligadoras de penicilinas (PBP's) que são alvos ativos específicos na bactéria. Se esse sítio (PBP's) for alterado, o quimioterápico não pode efetivar a ligação e torna-se ineficiente contra o microrganismo. Essa alteração físico-química diminui a afinidade da droga pelo sítio, fazendo com que haja perda da atividade da mesma. É o que se observa em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina; (ii) Alteração da permeabilidade da membrana: a alteração na expressão dos canais de porina modifica a penetração e conseqüentemente a ação de diferentes antibióticos. Exemplo: *Pseudomonas* resistente ao imipenem; (iii) Efluxo ativo de antibióticos: propriedade de expulsar ativamente os antibióticos para fora da célula, contribuindo para uma concentração inadequada da droga e, conseqüentemente, ação não efetiva (bomba de fluxo). Exemplo: tetraciclina; e (iv) Produção de enzimas capazes de inativar a droga: β -lactamases são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de amidos, amidinas e outras ligações C-N, separando a base do substrato. Ueno e Jorge (2001) ressaltaram ainda a importância da caracterização da resistência borderline, que diferentemente da resistência a meticilina mediada por cromossomo, observada em linhagens de *Staphylococcus aureus* BORSA (*Borderline Oxacillin Resistant Staphylococcus aureus*), confere resistência a meticilina pela alta capacidade de produção de β -lactamase, via plasmídeo.

O uso extensivo e indiscriminado de antibióticos β -lactâmicos vem favorecendo, ao longo de várias décadas, a seleção de microrganismos produtores de enzimas com atividade hidrolítica frente a estas drogas.

2.3.1 Resistência aos antimicrobianos associada a enzimas do tipo β -lactamases

Atualmente, as β -lactamases são agrupadas de acordo com dois grandes esquemas: a classificação molecular de Ambler e o sistema de classificação funcional proposto por Bush-Jacoby-Medeiros (PATERSON e BONOMO, 2005; NOGUEIRA, 2005). O esquema de classificação de Ambler divide as β -lactamases em quatro classes principais (A a D). A base dessa classificação reside na similaridade entre as seqüências de aminoácidos e não nas características fenotípicas. Nesse esquema, as β -lactamases das classes A, C, e D são serino- β -lactamases, e atuam sobre o antibiótico rompendo o anel β -lactâmico por um mecanismo de hidrólise, com conseqüente inativação da droga. Em contraste, as enzimas da classe B são metalo- β -lactamases, que utilizam íons zinco para romper o anel β -lactâmico e inativar o antimicrobiano (AMBLER et al., 1991). Segundo Dalmarco, Blatt e Córdova (2006), β -lactamases denominadas SHV e TEM pertencem a classe A e possuem uma serina como seu principal resíduo catalítico. Além disso, são penicilinasas e cefalosporinasas usualmente encontradas em plasmídeos ou transposons; enquanto as β -lactamases OXA-derivadas pertencem à classe D (oxacilinasas) e as enzimas AmpC de bactérias Gram-negativas pertencem à classe C (ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

O esquema de Bush-Jacoby-Medeiros agrupa as β -lactamases de acordo com a similaridade funcional. Nesse esquema, são definidos 4 grupos principais (1 a 4) e múltiplos sub-grupos (a, b, c, d, e, f...) (BUSH, JACOBY e MEDEIROS, 1995). Essa classificação é a de maior relevância para profissionais envolvidos em diagnóstico laboratorial, uma vez que considera inibidores de β -lactamase e substratos β -lactâmicos, o que é clinicamente importante (PATERSON e BONOMO, 2005).

As β -lactamases de espectro estendido (ESBL's) são enzimas de classe molecular A (classificação de Ambler) ou das classes 2be ou 2d (classificação de Bush, Jacoby e Medeiros), capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas (primeira, segunda e terceira geração, exceto as cefamicinas e carbapenêmicos) e o monobactâmico (aztreonam). Possuem sítio de ação contendo o aminoácido serina como resíduo catalítico principal e, geralmente, são inibidas por compostos como ácido clavulânico, sulbactam e ou tazobactam (BUSH, JACOBY e MEDEIROS, 1995; BRADFORD, 2001; STURENBURG e MACK, 2003; PFALLER e SEGRETI, 2006).

Diversos tipos de β -lactamases de espectro estendido já foram descritas. ESBL tipo TEM foi reportada em 1965 a partir de um isolado de *Escherichia coli*, de uma paciente em Atenas, na Grécia, chamada *Temoneira*. Essa enzima ficou conhecida como TEM-1, e as subseqüentes enzimas descritas com essas características foram incorporando diferentes números (DALMARCO, BLATT e CÓRDOVA, 2006).

O nome β -lactamase SHV deriva de uma propriedade bioquímica dessa mesma enzima TEM, porém com variável sulfidril (Sulphydryl Variable), e também passou a incorporar números para distinguir características menores (ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

Algumas enzimas foram nomeadas segundo a preferência de substratos ou espectro de ação. Ao longo dos anos, essa diversidade de nomenclaturas contribuiu para uma falta de sistemática na compreensão e no estudo dessas enzimas (PATERSON e BONOMO, 2005; ROSSI e ANDREAZZI, 2005; DALMARCO, BLATT e CÓRDOVA, 2006).

Os plasmídeos que carregam os genes codificadores das ESBL's podem carregar também determinantes de resistência a outras drogas, como aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicol, trimetropim e sulfonamidas (BRADFORD, 2001; COQUE et al., 2002; HERANDEZ et al., 2003).

De maneira geral, as ESBL podem ser encontradas na família *Enterobacteriaceae*, em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (BRADFORD, 2001; SHAHCHERGI, NIKBIN e FEIZABADI, 2009).

No Brasil, pesquisas apontam *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* como as espécies bacterianas produtoras de ESBL mais freqüentes (TOFTELAND et al., 2007). Entretanto, observam-se diferenças na freqüência de distribuição das demais enterobactérias produtoras de ESBL, conforme a origem do paciente, se

ambulatorial ou hospitalizado. Peloso et al. (2003) isolaram *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter spp* e *Morganella morgannii* produtores de ESBL em indivíduos hospitalizados. Minarini e colaboradores (2007) encontraram *Providencia stuartii*, *Citrobacter freundii* e *Serratia marcescens* ESBL positiva em pacientes comunitários ou ambulatoriais.

2.3.2 Tipos de β -lactamases de espectro estendido

As β -lactamases de espectro estendido dos tipos TEM e SHV são precursores da maioria das ESBL's, das quais derivam 150 e 88 enzimas, respectivamente. Entre as ESBL's não-TEM e não-SHV, as enzimas do tipo CTX-M são as mais prevalentes (BRADFORD, 2001).

Outros tipos de β -lactamases, não menos importantes clinicamente, são AMPc, KPC, OXA, PER, GES e VEB, dentre outros (MOLAND et al., 2006; GUPTA, 2007; FANG et al., 2008; SHAHCHERGI, NIKBIN e FEIZABADI, 2009).

2.3.2.1 ESBL tipo SHV

Do ponto de vista filogenético, acredita-se que o precursor de SHV seja universalmente encontrado em *Klebsiella pneumoniae*. SHV-1 confere resistência às penicilinas de amplo espectro, como a ampicilina, ticarcilina e piperacilina, mas não às cefalosporinas oximino-substituídas. Em 1983 foi demonstrado um novo tipo de SHV, derivada de uma mutação em SHV-1, com resistência transferível a cefotaxima (GUPTA, 2007). A maioria das β -lactamases SHV (classe A) tem fenótipo ESBL e são resistentes aos inibidores de β -lactamases. Esta enzima mantém parcialmente sua habilidade de hidrolisar as penicilinas, porém sua atividade contra as cefalosporinas é significativamente reduzida (BRADFORD, 2001; HOWARD et al., 2002). SHV-2, por sua vez, apresenta atividade hidrolítica eficiente frente à cefotaxima e em menor grau para ceftazidima (PATERSON e BONOMO, 2005). As enzimas deste grupo são encontradas, com frequência, em *Klebsiella pneumoniae*,

Escherichia coli e em outras espécies de enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa* (MONSTEIN et al., 2007; SHAHCHERGI, NIKBIN e FEIZABADI, 2009).

2.3.2.2 ESBL tipo TEM

As β -lactamases do tipo TEM são as enzimas mais comumente encontradas em bastonetes Gram-negativos, localizadas normalmente no transposon TN3, que é pouco seletivo, o que permite que haja uma série de transposições e rearranjos envolvendo seu gene codificador *bla*TEM. Estas enzimas são comumente encontradas em diversas espécies de enterobactérias, principalmente, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae* (CAO et al., 2002; PAGANI et al., 2002; ARPIN et al., 2005). Em microrganismos não entéricos, como *Acinetobacter*, também foram encontradas enzimas do tipo TEM. A β -lactamase do tipo TEM (classe A) é capaz de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de primeira geração, mas não é capaz de atacar oximino-cefalosporinas (GUPTA, 2007). Entretanto, há registros de enzimas com atividade hidrolítica frente às oximinocefalosporinas e associações com inibidores de beta-lactamase, como TEM-12, TEM-39 e TEM-125. Essas enzimas são designadas de Complexo Mutante de TEM (CMT) e já foram encontradas em espécies como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, além de outras enterobactérias (ROBIN et al., 2006).

2.3.2.3 ESBL tipo CTX-M

O grupo CTX-M é composto por enzimas que tem ação hidrolítica, preferencialmente sobre a cefotaxima. Estas β -lactamases tem sido relatadas em *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e outras enterobactérias. CTX-M (classe A) é inibida por inibidores de β -lactamase, como tazobactam, sulbactam e clavulanato (GUPTA, 2007). O primeiro relato de β -lactamase CTX-M surgiu na Alemanha, em 1989 e após isso foi rapidamente disseminada entre diferentes espécies clínicas, especialmente na

América do Sul, Japão (Toho) e Índia (CTX-M 15) (QUINTEROS et al., 2003; PITOUT et al., 2005 e GUPTA, 2007).

2.3.3 Enzimas β -lactamases do tipo AmpC

O grupo AmpC, relacionado a β -lactamases de classe C, pode ser codificado em genes presentes em plasmídeos e cromossomos (PEREZ-PEREZ e HANSON, 2002; LIVERMORE e WOODFORD, 2006).

Microrganismos que possuem o gene *ampC* cromossômico (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Providencia spp* – grupo CESP, *Proteus spp*, *Hafnia alvei*, *Morganella morgannii*, *Escherichia coli*, *Shigella spp*, *Aeromonas spp* e *Pseudomonas aeruginosa*) produzem β -lactamase do tipo AmpC em um nível basal, possuindo função fisiológica no metabolismo da parede celular (PEREZ-PEREZ e HANSON, 2002; LIVERMORE e WOODFORD, 2006). Esta característica, porém, confere resistência às cefamicinas (cefexitina), penicilinas, cefalosporinas de 1ª e 2ª geração e associações de antibióticos com inibidores de β -lactamase (YUM et al., 2005).

Bactérias do grupo CESP, *Proteus spp*, *Hafnia alvei*, *Morganella morgannii* e *Pseudomonas aeruginosa* podem exibir resistência às cefalosporinas de 3ª geração por hiperprodução de β -lactamase do tipo AmpC. A hiperprodução pode ocorrer devido à indução mediante a presença de alguns antimicrobianos β -lactâmicos e inibidores de β -lactamase, que promovem alterações na regulação da produção de enzima (LIVERMORE, 1995; LIVERMORE, WINSTANLEY e SHANNON, 2001).

Há relatos de AmpC plasmidiais em *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp* e outras enterobactérias, fato que as torna igualmente resistente às penicilinas, cefalosporinas de 1ª, 2ª (incluindo cefamicinas) e 3ª geração, além de associações com inibidores de β -lactamase (MOLAND et al., 2006).

Vários são os tipos de AmpC plasmidiais existentes descritos na literatura: CMY, MIR, MOX, FOX, LAT, BIL, DHA, ACC e outros. A eles são associados

subtipos, como por exemplo: MOX-1, MOX-2, CMY-1 a 11, LAT-1 a 4, DHA-1, DHA-2 (ROBBERTS, KOHNER e PATEL, 2009 e SONG et al., 2009).

2.3.4 Enzimas β -lactamases do tipo carbapenemases

Enzimas do tipo carbapenemases, em especial do Grupo KPC - *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase*, são codificadas por genes localizados em elementos extra-cromossômicos. Apresentam atividade hidrolítica dirigida contra penicilinas, cefalosporinas e aztreonam, em adição aos carbapenêmicos. São inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam (PEIRANO et al., 2009).

Há registros da detecção de pelo menos 7 variantes de KPC, designadas de 1 a 7. Seu isolamento ainda é um evento raro. Entretanto, β -lactamases do tipo KPC 2 e 3 já foram identificadas em *Enterobacter cloacae* (MOLAND et al., 2006) e KPC 5 em *Pseudomonas aeruginosa* (PEIRANO et al., 2009).

2.4 Métodos e técnicas usadas para o estudo de resistência associada à produção de β -lactamases

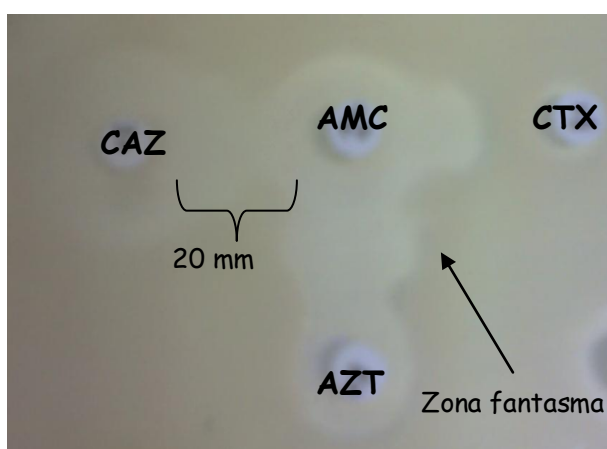
2.4.1 Métodos baseados em testes fenotípicos

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2010) propõe o método de disco difusão como triagem para a caracterização de ESBL produzida por espécies de *Klebsiella* sp., *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*. Neste caso, a produção de ESBL é avaliada pela medição do diâmetro da zona de inibição ao redor do disco de aztreonam, cefpodoxima, ceftazidima, cefotaxima ou ceftriaxona (NOGUEIRA et al., 2006). Para Paterson e Bonomo (2005), o uso de mais de um disco de antimicrobiano aumenta a sensibilidade da detecção de ESBL. Se algum dos halos destas drogas indicar resistência, suspeita-se de produção de β -lactamase de espectro estendido e um teste confirmatório devem ser realizados para determinar o diagnóstico (JÚNIOR, FERREIRA e CONCEIÇÃO, 2004; YU, CHUANG e RASMUSSEN, 2006).

Messai et al. (2006) recomendam o uso da amostra de referência *E. coli* ATCC 25922, como controle, no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Sejas et al. (2003) sugerem monitoramento constante da qualidade dos discos de papel empregados nos testes de disco difusão. Demais fontes de erro, como qualidade do meio de cultura, espessura do ágar e parâmetros de incubação também não devem ser negligenciados.

O teste de aproximação dos discos é um dos métodos confirmatórios mais utilizados para a caracterização fenotípica de linhagens produtoras de ESBL, pois se trata de uma metodologia acessível, que não acarreta custos adicionais ao laboratório, visto que os antimicrobianos envolvidos neste método podem ser incluídos no antibiograma rotineiro para bactérias Gram-negativas (JUNIOR, FERREIRA e CONCEIÇÃO, 2004). Descrito por Jarlier e colaboradores (1988), este teste consiste em inocular uma placa de ágar Mueller Hinton e acrescentar discos de aztreonam e de cefalosporinas de terceira geração, como cefotaxima, ceftazidima, cefpodoxima e cefepime, dispostos 20 mm (centro a centro) de um disco de amoxicilina-clavulanato, colocado no centro da placa. É considerada sinergia positiva (e, portanto, detecta-se a produção de ESBL), quando se observa uma ampliação do halo de inibição em alguma das cefalosporinas ou do aztreonam ou o aparecimento de uma terceira zona irregular, conhecida como zona fantasma ou buraco de fechadura, entre o disco combinado e o disco de uma das drogas β -lactâmicas (Figura 2).



Arquivo pessoal

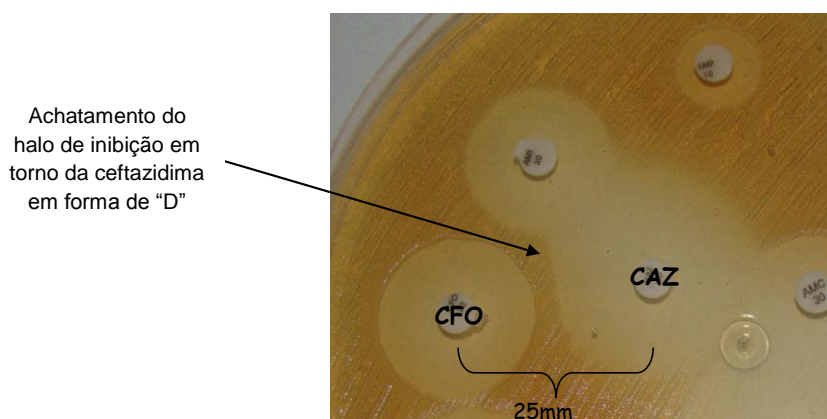
Figura 2. Teste confirmatório positivo para ESBL, com a formação de zona fantasma entre drogas β -lactâmicas e o disco de ácido clavulânico: método de aproximação dos discos. CAZ = ceftazidima, CTX = cefotaxima, AZT = aztreonam

Outros métodos confirmatórios para detecção de ESBL podem ser utilizados, tais como a técnica do sinergismo de duplo disco (JUNIOR, FERREIRA e CONCEIÇÃO, 2004), E-test ESBL (WIEGAND et al., 2007), método de substituição do disco, (CASALS e PRINGLER, 1990) e teste tridimensional (THOMSON e SANDERS, 1992).

Alguns sistemas automatizados para identificação de ESBL também estão disponíveis: sistema Vitek® (bioMérieux) e MicroScan® (Dade Behring) (ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

Segundo protocolos do CLSI (2006), após testes de triagem e confirmatório, o laboratório deve interpretar e liberar o resultado de linhagens produtoras de ESBL como resistente para todas as penicilinas (com exceção de associações com inibidores de β -lactamase), cefalosporinas e monobactâmico (aztreonam). É conveniente liberação de uma observação junto ao microrganismo: “Linhagem produtora de ESBL” (ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

Para a detecção de enzima AmpC indutível a metodologia disponível por disco-difusão é uma adaptação do teste de aproximação de discos, em que discos do indutor (como a cefoxitina) e substrato (ceftazidima, aztreonam ou outro β -lactâmico) são colocados na superfície de uma placa contendo ágar Mueller Hinton, distantes 25 mm centro a centro um do outro. O achatamento do halo de inibição em torno do substrato (forma de “D”) é presuntivo da presença de β -lactamase classe C de Ambler (DUNNE e HARDIN, 2005; DALMARCO, BLATT e CORDOVA, 2006; TANEJA et al., 2008).



Arquivo pessoal

Figura 3. Teste positivo para detecção de β -lactamase do grupo C de Ambler (induzida). CFO = cefoxitina, CAZ = ceftazidima

2.4.2 Métodos baseados em características genotípicas

A detecção e identificação dos grupos de ESBL e outras β -lactamases pode ser feita através de métodos moleculares como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Single-Strand Conformational Polymorfism (SSCP), hibridização e seqüenciamento (JARLIER et al., 1998; BRADFORD, 2001; KONEMAN et al., 2001; COQUE et al., 2002; SABATÉ et al., 2002; TENOVER et al., 2003).

A PCR possibilita a amplificação de seqüências de DNA através da utilização de oligoiniciadores específicos (*primers*). Permite a replicação, *in vitro*, de uma seqüência definida do DNA, sendo esta amplificada de forma exponencial e possível de ser visualizada após uma eletroforese convencional (MATTÉ, 2003).

Quinteros et al. (2003) identificaram enterobactérias como produtoras de ESBL do tipo CTX-M e PER, utilizando análises por PCR e posterior eletroforese.

Odeh et al. (2002) e Jones et al. (2009) confirmaram a presença de genes que codificam enzimas do tipo AmpC e ESBL clássicas, respectivamente, em linhagens bacterianas de interesse clínico, por meio de PCR.

Cattoir et al. (2007), por sua vez, desenvolveram uma técnica rápida de biologia molecular (<3 horas), para a detecção de resistência plasmídeo-mediada a quinolonas (genes *qnr*) em enterobactérias ESBL positivas. Assim, o uso destes oligoiniciadores degenerados em Multiplex PCR possibilitou a identificação de genes de resistência a múltiplas drogas.

Desta forma, o emprego da PCR neste trabalho para fins de caracterização molecular de genes de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos é justificada pela facilidade de execução, sensibilidade, especificidade e versatilidade frente à possibilidade de detecção dos diferentes marcadores genéticos de interesse. Contudo, esta técnica possui uma limitação: não permite a discriminação entre as variantes de cada família de enzima, o qual somente é possível por meio de sequenciamento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos e correlacionar testes fenotípicos com a detecção de marcadores genéticos para produção de β -lactamases dos tipos ESBL, AmpC e KPC em enterobactérias associadas à etiologia de infecções do trato urinário em pacientes atendidos em um Laboratório de Análises Clínicas da cidade de Juiz de Fora, MG.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar, a partir de banco de dados de um Laboratório de Análises Clínicas a ocorrência e o perfil de susceptibilidade a drogas, de bastonetes Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* produtores de ESBL, determinados fenotipicamente, isolados de pacientes com ITU, no período de 2001 a 2008;
- Isolar e identificar amostras de enterobactérias associadas à monoinfecção do trato urinário, em pacientes atendidos no mesmo Laboratório, durante o ano de 2009;
- Determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de relevância clínico-microbiológica dos microrganismos recuperados durante o ano de 2009;
- Avaliar a produção de β -lactamases dos tipos ESBL, AmpC e KPC nestas linhagens bacterianas, por meio de métodos fenotípicos;
- Identificar os genes associados à produção de β -lactamases dos tipos ESBL, AmpC e KPC nas linhagens bacterianas com resultado positivo no teste fenotípico;
- Estabelecer correlações entre a presença de marcadores genéticos e o fenótipo de resistência aos β -lactâmicos nas linhagens bacterianas isoladas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estudo retrospectivo (2001 a 2008)

Foram avaliadas 66.660 amostras de urina de pacientes exclusivamente comunitários, de ambos os sexos, independente da idade, atendidos no Laboratório Cortes Villela, em Juiz de Fora, MG, no período de 2001 a 2008. Este estudo encontra-se em conformidade com a legislação vigente sobre pesquisa científica envolvendo seres humanos (resolução CNS 196/96) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFJF (parecer 033/2009, protocolo 1678.022.2009) (Anexo 1).

De acordo com os registros do laboratório, após identificação bioquímica, as linhagens bacterianas isoladas foram submetidas a testes de susceptibilidade a drogas pelo método de disco-difusão, de acordo com protocolos do CLSI vigentes em cada ano estudado. Foram testadas drogas como: amicacina (30µg), gentamicina (10µg), nitrofurantoína (300µg), ciprofloxacina (5µg), sulfazotrim (25µg) e imipenem (10µg). O método de aproximação dos discos, adaptado de Jarlier e colaboradores (1998), foi empregado como teste confirmatório fenotípico para determinação de ESBL em todos os isolados. Após inoculação em placa de Agar Mueller Hinton (Difco, EUA), discos de cefotaxima (30µg), ceftazidima (30µg) e aztreonam (30µg) (Laborclin/Brasil) foram colocados 20 mm centro a centro de um disco de amoxicilina-ácido clavulânico (20/10µg). O aparecimento de uma zona de inibição na área entre o disco de amoxicilina-ácido clavulânico e a pelo menos uma das outras drogas foi interpretado como indicativo da presença de ESBL nas amostras analisadas.

Escherichia coli ATCC 25922 foi empregada como amostra de referência no controle da qualidade. Os critérios de interpretação (sensível ou resistente) de cada antimicrobiano testado seguiram os protocolos vigentes no referido período.

4.2. Estudo prospectivo (2009-2010)

4.2.1 Isolamento de amostras bacterianas no ano de 2009

Um total de 12.304 amostras de urina obtidas de pacientes com o mesmo perfil do estudo retrospectivo foram analisadas durante o período de janeiro a dezembro de 2009, no mesmo laboratório privado, localizado em Juiz de Fora, Minas Gerais.

As amostras clínicas foram semeadas em Agar Cled (Difco, EUA), com auxílio de alça calibrada descartável de 1µl (Pleion/Brasil) e incubadas a 37°C por até 48 horas em estufa bacteriológica. Todas as espécies bacterianas isoladas foram identificadas pelo sistema ATB Expression (BioMerieux, França), por meio da galeria ID 32 E, de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.2 Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

Para as enterobactérias isoladas foi determinado o perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas pelo método de disco-difusão, segundo recomendações do CLSI (2009), utilizando-se discos impregnados com a droga. Foram utilizadas as seguintes drogas: amicacina (30µg), gentamicina (10µg), nitrofurantoína (300µg), ciprofloxacina (5µg) e sulfazotrim (25µg). Os β-lactâmicos testados foram ampicilina (10µg), amoxicilina-clavulanato (20/10µg), cefalotina (30µg), cefotaxima (30µg), ceftazidima (30µg), aztreonam (30µg), cefoxitina (30µg) e imipenem (10µg).

Após crescimento bacteriano em ágar Cled, com auxílio de uma agulha bacteriológica, foram obtidas suspensões bacterianas em solução salina estéril (NaCl 0,9%), com turbidez ajustada a 0,5 na escala McFarland ($\sim 10^8$ UFC/ml). Com o auxílio de um *swab* estéril, foi realizado inóculo por esgotamento na superfície de uma placa de ágar Mueller Hinton (Difco, EUA) de forma a obter um crescimento confluyente. Os discos foram depositados sobre o meio e a leitura dos halos de inibição foi realizada após 16-18 horas de incubação a 37°C, determinando-se o

diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano e comparando à tabela de referência. Para controle de qualidade, foi incluída a amostra de referência *Escherichia coli* ATCC 25922.

4.2.3 Detecção fenotípica da produção de β -lactamases

O método de aproximação dos discos foi usado como teste fenotípico confirmatório para determinação da produção de ESBL em todos os isolados. Após inoculação em placa de ágar Mueller Hinton, os discos de cefotaxima (30 μ g), ceftazidima (30 μ g) e aztreonam (30 μ g) (Laborclin, Brasil) foram colocados 20 mm centro a centro de um disco de amoxicilina-ácido clavulânico (20/10 μ g), conforme demonstrado na Figura 2. O aparecimento de uma zona de inibição na área entre o disco de amoxicilina-ácido clavulânico e pelo menos uma das outras drogas foi interpretado como indicativo da presença de ESBL nas amostras analisadas.

Este mesmo método foi adaptado e empregado para detecção simultânea de AmpC indutível, por meio da utilização do disco de cefoxitina (30 μ g), considerado forte indutor da produção de AmpC, distante 25 mm do disco de ceftazidima (30 μ g). O achatamento do halo de inibição ao redor da ceftazidima em forma de “D” foi considerado resultado positivo.

As linhagens pertencentes à família *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases (n=105) foram mantidas em ágar Mueller Hinton inclinado, em temperatura ambiente, para experimentos posteriores.

4.2.4 Extração de DNA bacteriano

Para a obtenção de DNA genômico, as amostras bacterianas foram cultivadas em Tryptic Soy Broth (TSB), por 24 horas, a 37°C. A seguir, 1 mL da cultura foi utilizado para extração de DNA genômico total, usando-se o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega Corporation, Madison WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA foi estocado em freezer a -20°C , para posteriormente ser utilizado como DNA molde em reações em cadeia da polimerase (PCR).

4.2.5 Identificação dos marcadores de β -lactamase por PCR

As análises por PCR foram realizadas utilizando oligoiniciadores específicos para amplificação de genes que codificam as enzimas ESBL (CTX-M, SHV e TEM), AmpC, incluindo as carbapenemases KPC (Tabela 1). Todos os oligoiniciadores utilizados são considerados universais, com exceção de AmpC, que é dirigido à identificação do sub-tipo CMY-2.

Tabela 1: Oligoiniciadores utilizados e tamanho dos fragmentos.

Gene	Sequência (5'-3')	Amplicon (bp)	Referência
<i>bla</i> CTX-M	5'-ATG TGC AGY ACC AGT AAA G-3'	562	Jones et al., 2009
	5'-GGT CAC CAG AAG GAG C-3'		
<i>bla</i> SHV	5'-CTT TAC TCG CCT TTA TCG GC -3'	982	Jones et al., 2009
	5'-TTA CCG ACC GGC ATC TTT CC-3'		
<i>bla</i> TEM	5'-GTG CGC GGA ACC CCT ATT-3'	968	Jones et al., 2009
	5'-TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA GGC-3'		
<i>AmpC</i>	5'-ATA ACC ACC CAG TCA CGC-3'	630	Odeh et al., 2002
	5'-CAG TAG CGA GAC TGC GCA-3'		
<i>bla</i> KPC	5'-ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT-3'	892	Jones et al., 2009
	5'-TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC-3'		

As reações foram realizadas em volumes de 25 μL , contendo aproximadamente 10ng de DNA molde, 12,5 μL de *Gotaq Green Master Mix 2X* (Promega Corporation, Madison WI, USA), 1 μM dos iniciadores e 5,5 μL de água ultrapura. As condições de amplificação para as reações de SHV, TEM, CTX-M e KPC foram: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e extensão final a 45°C por 1 minuto e 72°C por 5 minutos. Para a reação de AmpC, as condições de amplificação foram: 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1

minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 10 minutos. As reações foram realizadas em termociclador automatizado (Bioer Genepro).

Os amplicons esperados foram observados em gel de agarose 0,8%, coradas com brometo de etídio. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador de 1Kb DNA ladder (Life Technologies Inc., Gathersburg, MD, EUA).

O controle negativo deste teste foi realizado a partir de reações sem DNA molde e como controle positivo, foi realizado seqüenciamento de amplicons selecionados numa amostragem de 10% das reações específicas de cada um dos marcadores, com exceção de KPC, em que apenas uma amostra mostrou-se sugestiva por PCR. Para as reações do seqüenciamento foram utilizados os produtos de PCR de cada gene estudado em cinco réplicas, após precipitação com PEG (polietilenoglicol) a 20% (Sigma) e etanol gelado (Vetec). A quantificação do DNA bacteriano extraído foi realizada por meio de espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Wilmington – DE, USA) e visualização em gel de agarose 2% (Invitrogen). As reações foram processadas em equipamento ABI 3730 DNA analyser (Applied Biosystems).

5 RESULTADOS

5.1 Estudo retrospectivo (2001 a 2008)

Dos 66.660 espécimes clínicos avaliados no período, foram recuperadas 416 amostras bacterianas produtoras de ESBL. A média de idade dos indivíduos com ITU por microrganismo produtor de ESBL foi de 56,95 anos (intervalo de 28 dias a 98 anos).

Em relação ao sexo, 281 linhagens bacterianas foram isoladas de pacientes do sexo feminino (67,5%) enquanto que 135 (32,5%) do sexo masculino. Entre os pacientes do sexo feminino, aproximadamente 52,6% estavam incluídos na faixa etária > 65 anos, representando a idade com maior incidência de ITU por microrganismos produtores de ESBL, no período amostrado. Em relação aos pacientes do sexo masculino, a faixa etária predominantemente observada foi, também, superior aos 65 anos, representando 48,1%.

As bactérias produtoras de ESBL isoladas e identificadas foram distribuídas entre as espécies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii* e *Enterobacter cloacae*. *E. coli* foi a espécie mais freqüente (74,2%), seguida de espécies de *Klebsiella spp.* (21,1%). *M. morganii* foi a espécie menos freqüente, estando presente em somente 0,5% do total de enterobactérias produtoras de ESBL isoladas (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição das espécies de enterobactérias (n=416) produtoras de ESBL, recuperadas de mono-infecção de trato urinário no período de 2001 a 2008

Espécie Bacteriana	Frequência (%)
<i>Escherichia coli</i>	74,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,7
<i>Klebsiella ozanae</i>	1,4
<i>Proteus mirabilis</i>	1,9
<i>Serratia marcescens</i>	0,7
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,7
<i>Providencia stuartii</i>	0,7
<i>Morganella morganii</i>	0,5

Considerando-se o perfil de susceptibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos, observou-se que todas as linhagens bacterianas isoladas no período foram sensíveis ao imipenem.

Entre as linhagens de *E. coli*, altos índices de resistência foram observados para todas as drogas não β -lactâmicas, ao longo do período amostrado, com exceção da amicacina. De maneira geral, nota-se um pico nos perfis de resistência no período de 2004 a 2005, embora se observe uma diminuição nos índices de resistência para amicacina e nitrofurantoína nos últimos anos. Resistência crescente foi observada para ciprofloxacina e para sulfazotrim (associação trimetoprim/sulfametoxazol).

Já para os representantes da espécie *K. pneumoniae*, observou-se um pico nos perfis de resistência no período de 2004 a 2005. Embora um aumento nos níveis de sensibilidade para amicacina e gentamicina tenha ocorrido nos últimos anos, uma crescente resistência foi observada para ciprofloxacina, nitrofurantoína e para a associação trimetoprim/sulfametoxazol.

Mesmo as espécies *K. oxytoca* e *K. ozanae* não tendo sido observadas durante todo o tempo amostrado, altos níveis de resistência foram observados para *K. oxytoca* em 2003, com diminuição na ocorrência de linhagens resistentes aos antimicrobianos testados em 2004 e em 2007. Considerando-se a espécie *K. ozanae*, neste trabalho, todas as linhagens foram isoladas somente em 2008 (n=6) e o antimicrobiano mais eficiente foi a amicacina (sensibilidade ~ 83%). Para as outras drogas testadas, níveis maiores que 60% de resistência foram observados.

Com relação à espécie *P. mirabilis*, os níveis de resistência atingiram o pico máximo para ciprofloxacina e gentamicina ao longo dos anos estudados. A amicacina se mostrou nos testes *in vitro* uma boa opção terapêutica para infecções causadas por este microrganismo, quando ESBL positivo, sobretudo nos últimos anos.

Considerando-se as demais espécies bacterianas produtoras de ESBL isoladas e identificadas, em menor escala, como *Providencia stuartii*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *M. morgannii*, foram observadas altas frequências de resistência para os antimicrobianos não β -lactâmicos avaliados, especialmente em 2008 (Tabela 3).

Tabela 3. Continuação

Espécies bacterianas	Número de isolados (n) e frequência de resistência (%)							
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
<i>Serratia marcescens</i>					(n=1)	(n=1)		(n=1)
Amicacina					0	100		100
Ciprofloxacina					100	0		100
Gentamicina					0	0		100
Nitrofurantoína					100	100		100
Sulfazotrim					100	0		100
Imipenem					0	0		0
<i>Enterobacter cloacae</i>			(n=1)					(n=2)
Amicacina			0					0
Ciprofloxacina			100					50
Gentamicina			100					50
Nitrofurantoína			100					100
Sulfazotrim			100					0
Imipenem			0					0
<i>Enterobacter aerogenes</i>								(n=1)
Amicacina								100
Ciprofloxacina								100
Gentamicina								100
Nitrofurantoína								100
Sulfazotrim								100
Imipenem								0
<i>Morganella morganii</i>								(n=2)
Amicacina								0
Ciprofloxacina								100
Gentamicina								0
Nitrofurantoína								100
Sulfazotrim								50
Imipenem								0

No período amostrado, considerando-se o fenômeno da resistência bacteriana e o uso dos agentes antimicrobianos na rotina clínica para o tratamento de ITU, observa-se alteração no padrão de comportamento microbiano frente a estas drogas (Figura 4). Com exceção, do imipenem para o qual a sensibilidade bacteriana permaneceu constante em todo o período amostrado, observaram-se baixos níveis de resistência bacteriana à amicacina e à nitrofurantoína no início da década de 2000. Por outro lado altos níveis de resistência à ciprofloxacina, sulfazotrim (trimetoprim/sulfametoxazol) e gentamicina foram observados neste período.

Apesar da redução na resistência à ciprofloxacina no ano de 2002, observou-se um aumento significativo da resistência aos demais antimicrobianos testados, com pico máximo entre os anos de 2004 e 2005 (Figura 4).

Na segunda metade da década, embora houvesse uma tendência na diminuição nos níveis de resistência bacteriana aos antimicrobianos testados, altos níveis de sensibilidade, foram observados apenas para amicacina. Para os outros antimicrobianos, entretanto, uma retomada no aumento dos níveis de resistência foi observada a partir de 2007 (Figura 4).

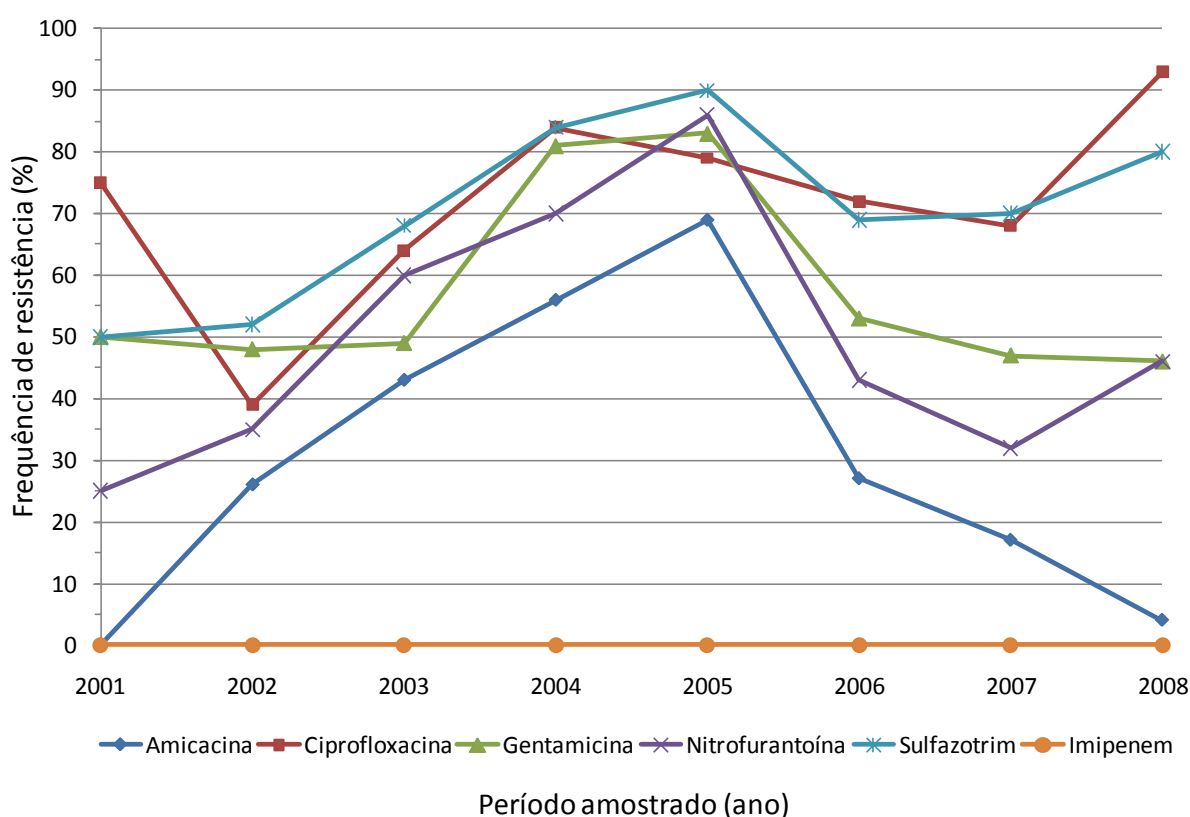


Figura 4. Evolução dos níveis de resistência a antimicrobianos entre as espécies de enterobactérias produtoras de ESBL isoladas de infecção de trato urinário no período de 2001 a 2008

5.2 Estudo prospectivo (2009 a 2010)

5.2.1 Isolamento e identificação de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL

Foram avaliadas 12.304 amostras de urina em uroculturas no período de janeiro a dezembro de 2009, com recuperação de 105 linhagens bacterianas produtoras de ESBL (5,3% de linhagens ESBL positivas entre as uroculturas positivas). Considerando-se as linhagens ESBL recuperadas em relação a todas as uroculturas realizadas, sua frequência de isolamento foi de 0,85%.

Do total de indivíduos portadores de monoinfecção urinária por microrganismo produtor de ESBL atendidos no período, a média de idade foi de 61,3 anos (intervalo de 4 a 96 anos). Em relação ao sexo, 83 (79%) linhagens foram isoladas de pacientes pertencentes ao sexo feminino e 22 (21%) ao sexo masculino.

Entre os pacientes do sexo feminino, aproximadamente 50% estavam incluídos na faixa etária dos 16 aos 65 anos, representando a idade com maior incidência de infecção de trato urinário por microrganismos produtores de ESBL.

Em relação aos pacientes do sexo masculino, foi observada a mesma frequência (50%) de distribuição por idade entre 16 a 65 anos e > 65 anos. Não foi isolado microrganismo produtor de β -lactamase de espectro estendido na faixa etária até os 15 anos para o sexo masculino.

As amostras bacterianas produtoras de ESBL (n=105) foram identificadas como *E. coli* (63%), *K. pneumoniae* (15,2%) e *M. morgannii* (11,4%). *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *P. stuartii*, *P. alcalifaciens* e *P. mirabilis* também foram recuperados em menores porcentagens (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição das espécies de enterobactérias (n=105) produtoras de β -lactamases recuperadas de monoinfecção de trato urinário no período de janeiro a dezembro de 2009.

Espécie Bacteriana	Frequência (%)
<i>Escherichia coli</i>	63
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15,2
<i>Morganella morgannii</i>	11,4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3,8
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,9
<i>Providencia stuartii</i>	1,9
<i>Proteus mirabilis</i>	1,9
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0,9

5.2.2 Perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas

Todas as linhagens produtoras de β -lactamases isoladas no ano de 2009 foram sensíveis à ação antimicrobiana do imipenem. As enterobactérias encontradas apresentaram altos índices de resistência à associação amoxicilina-clavulanato (80,8%). Dentre as drogas utilizadas como substrato para detecção de ESBL, cefotaxima foi aquela para a qual as bactérias estudadas apresentaram maior resistência (~87%). Aproximadamente 70% das amostras estudadas foram resistentes à associação trimetoprim/sulfametoxazol e as fluoroquinolonas (ciprofloxacina e ácido nalidíxico). Dentre os aminoglicosídeos, amicacina demonstrou maior atividade antimicrobiana (sensibilidade >90%), seguida da gentamicina (sensibilidade ~70%) (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência de observação de resistência a drogas antimicrobianas (%) entre as enterobactérias produtoras de β -lactamases, isoladas de pacientes com ITU, em 2009.

Espécies bacterianas	Frequência de ocorrência de linhagens resistentes (%)													
	XL	AN	NA	CI	GM	NI	TS	IP	TE	AT	TZ	CT	AM	CF
<i>Escherichia coli</i> (n=66)	41,3	3,9	48,7	48,7	21,1	8,9	49	0	57,4	42	37,3	63	63	63
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=16)	12,2	0,9	13,3	13,3	5,7	8,5	10,4	0	6,6	13,3	12,4	15,2	15,2	15,2
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=4)	2,8	0,9	1,9	1,9	0,9	2,8	1,9	0	1,9	3,8	2,8	3,8	3,8	3,8
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=2)	1,9	0	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0	0,9	0,9	0,9	0,9	1,9	1,9
<i>Providencia stuartii</i> (n=2)	0,9	0	0,9	0,9	1,9	0,9	0	0	1,9	0	0	1,9	1,9	1,9
<i>Providencia alcalifaciens</i> (n=1)	0,9	0	0	0	0,9	0,9	0	0	0,9	0	0	0	0,9	0,9
<i>Morganella morganii</i> (n=11)	11,4	0	5,7	5,7	0	10,4	6,6	0	8,5	0	0,9	0,9	11,4	11,4
<i>Proteus mirabilis</i> (n=2)	1,9	0	1,9	1,9	0	0,9	1,9	0	1,9	0,9	0,9	0,9	1,9	1,9
Total	73,3	5,7	73,3	73,3	31,4	34,2	70,7	0	80	60,9	55,2	86,6	100	100

Legenda: Amoxicilina-ácido clavilânico (XL), amicacina (AN), ácido nalidíxico (NA), ciprofloxacina (CI), gentamicina (GM), nitrofurantoína (NI), trimetoprim-sulfametoxazol (TS), imipenem (IP), tetraciclina (TE), aztreonam (AT), ceftazidima (TZ), cefotaxima (CT), ampicilina (AM), cefalotina (CF).

5.2.3 Caracterização das β -lactamases

Neste trabalho, foram realizadas pesquisas dos principais marcadores genéticos de β -lactamase em 105 amostras obtidas durante o ano de 2009. Entre os marcadores mais frequentemente detectados, citam-se TEM (86,6%) e SHV (59,0%). Além disso, CTX-M e AMPc também foram detectados, numa frequência de 31,4% e 27,6%, respectivamente (Figuras 5 a 8).

Embora uma amostra tenha mostrado amplificação para um segmento gênico em tamanho semelhante àquele esperado para o marcador KPC, o sequenciamento do amplicon confirmou o teste fenotípico negativo, mostrando homologia para genes diferentes daquele pesquisado, revelando amplificação inespecífica. Assim, não foi identificado nas amostras bacterianas analisadas gene para KPC.

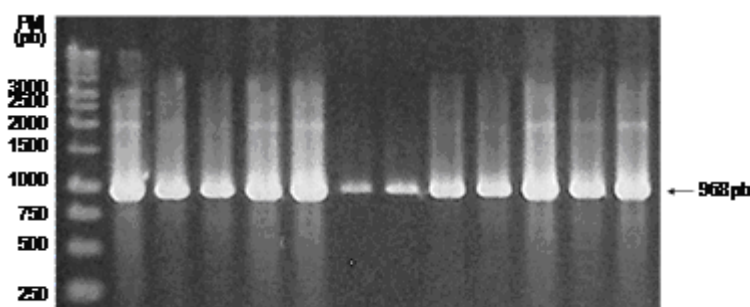


Figura 5. Eletroforegrama representativo da amplificação de segmento parcial do gene codificador para β -lactamase de espectro extendido *bla*_{TEM} (968pb) em enterobactérias

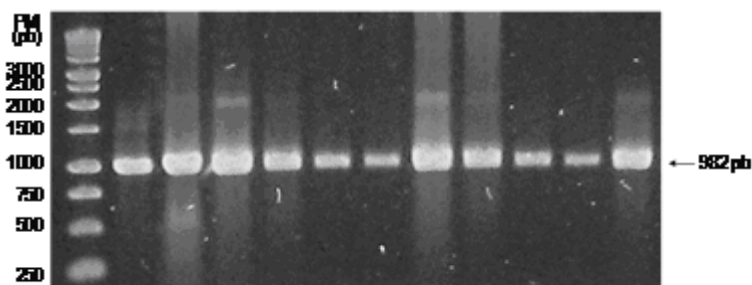


Figura 6. Eletroforegrama representativo da amplificação de segmento parcial do gene codificador para β -lactamase de espectro extendido *bla*_{SHV} (982pb) em enterobactérias

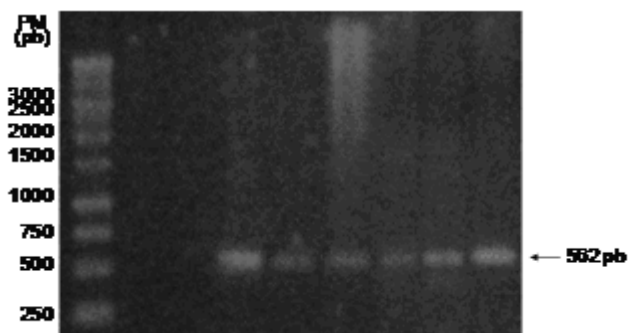


Figura 7. Eletroforegrama representativo da amplificação de segmento parcial do gene codificador para β -lactamase de espectro extendido *bla*_{CTX-M} (562pb) em enterobactérias

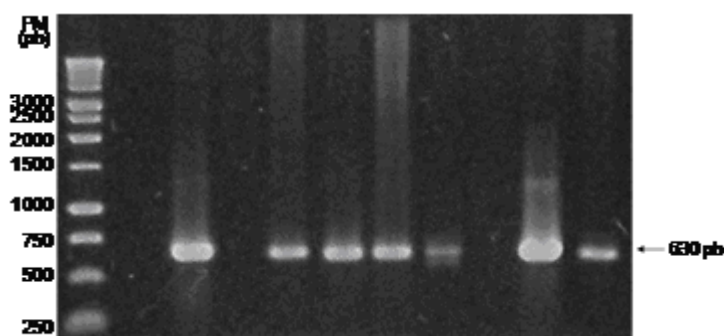


Figura 8. Eletroforegrama representativo da amplificação de segmento parcial do gene codificador para β -lactamase do tipo *ampC* (630pb) em enterobactérias

A pesquisa de marcadores genéticos associados aos fenótipos de resistência bacteriana às drogas β -lactâmicas, bem como sua correlação, estão apresentadas nas tabelas 6 e 7, em termos de frequência de ocorrência de cada marcador e associação entre fenótipo e genótipo.

Entre as espécies bacterianas recuperadas neste estudo, todos os marcadores genéticos para ESBL foram detectados. Considerando-se a frequência de detecção, o marcador *bla*_{TEM} foi o mais observado em todas as espécies recuperadas, seguido de *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *ampC*, embora o número de representantes não tenha sido uniforme. Do total de linhagens bacterianas avaliadas (n=105), em todas foi detectado pelo menos 1 dos marcadores genéticos associados à produção de β -lactamases. Assim, 22,8% das amostras bacterianas apresentaram 1 marcador, 52,4% apresentaram 2 marcadores, 20% apresentaram 3 marcadores e 4,8% apresentaram 4 dos marcadores pesquisados.

Entre as linhagens de *M. morgannii* avaliadas (n=11), em 10 (90,9%) daquelas cujos marcadores foram detectados não foi observado fenótipo de resistência bacteriana às drogas avaliadas como marcadoras fenotípicas de ESBL. O mesmo fenômeno foi observado para uma das duas linhagens de *P. mirabilis* recuperadas.

Tabela 6: Frequência de detecção dos genes codificadores de β -lactamase pesquisados nas espécies bacterianas, isoladas em 2009.

Espécies bacterianas	Frequencia de detecção (%)			
	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>ampC</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=4)	50	75	-	25
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=2)	100	50	50	-
<i>Escherichia coli</i> (n=67)	86,6	59,7	28,3	32,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=16)	100	56,2	50	12,5
<i>Morganella morgannii</i> (n=11)	72,7	63,6	9,1	27,3
<i>Providencia alcalifaciens</i> (n=1)	100	-	-	-
<i>Providencia stuartii</i> (n=2)	100	100	100	100
<i>Proteus mirabilis</i> (n=2)	100	50	50	-

Tabela 7: Características fenotípicas e genotípicas das bactérias produtoras de β -lactamase, isoladas em 2009.

Espécies bacterianas	Fenótipo	Genótipo	Frequência (%)
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=4)	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>ampC</i>	25
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM}	25
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM}	25
	AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV}	25
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=2)	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM}	50
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM}	50
<i>Escherichia coli</i> (n=67)	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{TEM} , <i>ampC</i>	3
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>ampC</i>	4,4
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>ampC</i>	6
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>ampC</i>	1,5
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>ampC</i>	1,5
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM}	15
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV}	4,4
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M}	1,5
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{TEM}	10,4
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	8,9
	AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>ampC</i>	1,5
	AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>ampC</i>	1,5
	AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM}	3
	AZT, CTX	<i>bla</i> _{TEM}	3
	AZT, CTX	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	1,5
	CAZ, CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>ampC</i>	1,5
	CAZ, CTX	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>ampC</i>	1,5
	CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	3
	CTX	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>ampC</i>	1,5
	CTX	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	3
	CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>ampC</i>	7,4
	CTX	<i>bla</i> _{TEM}	6
	CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM}	6
	CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M}	1,5
	CTX	<i>bla</i> _{TEM} , <i>ampC</i>	1,5

Tabela 7: Continuação

Espécies bacterianas	Fenótipo	Genótipo	Frequência (%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=16)	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>ampC</i>	6,25
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM}	37,5
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	6,25
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>ampC</i>	6,25
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	25
	AZT, CTX	<i>bla</i> _{TEM}	6,25
	CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	6,25
	CTX	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	6,25
<i>Morganella morgannii</i> (n=11)	CAZ, CTX	<i>bla</i> _{SHV}	9,1
	D-teste +	<i>bla</i> _{SHV}	18,2
	D-teste +	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>ampC</i>	9,1
	D-teste +	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM}	27,2
	D-teste +	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	9,1
	D-teste +	<i>bla</i> _{TEM}	9,1
	D-teste +	<i>bla</i> _{TEM} , <i>ampC</i>	18,2
<i>Providencia alcalifaciens</i> (n=1)	D-teste +	<i>bla</i> _{TEM}	100
<i>Providencia stuartii</i> (n=2)	CTX	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>ampC</i>	100
<i>Proteus mirabilis</i> (n=2)	D-teste +	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	50
	CAZ, AZT, CTX	<i>bla</i> _{TEM}	50

Legenda: AZT=Aztreonam, CAZ= Cefotaxima, CTX= Cefotaxima

Entre todos os achados de AMPc positivos por PCR (n=29) apenas 3 amostras (10,3%) se mostraram positivas no teste fenotípico de AMPc indutível. Todas estas amostras positivas nos testes fenotípico e genotípico foram caracterizadas como *Morganella morgannii*. Entretanto, 8 amostras (27,6%) demonstraram resistência à cefoxitina, no teste por disco difusão, e positivos por PCR. Do total destas amostras, 6 foram identificadas como *E. coli* e 2 como *K. pneumoniae*. As demais amostras

positivas para AMPc em técnica de biologia molecular não apresentaram correlação com o teste fenotípico.

Entretanto, observou-se amostras com teste genotípico negativo e teste de detecção de AMPc indutível positivo em 6 amostras. Resistência a cefoxitina foi obtida em 7 amostras com PCR negativo para AMPc. Uma amostra negativa para AMPc por PCR demonstrou resistência a cefoxitina e teste de indução de AMPc positivo (*M. morgannii*).

6 DISCUSSÃO

Segundo Pitout e colaboradores (2005), Paterson e Bonomo (2005) e Stratton (2002), apesar da ocorrência de bactérias produtoras de ESBL ser mais freqüente em pacientes hospitalizados, já existem evidências de sua emergência e disseminação na comunidade. O presente estudo revelou essa tendência, pois 521 amostras isoladas de pacientes extra-hospitalares no período 2001 a 2009 foram ESBL-positivas. Apesar disso, segundo a literatura, estes isolados podem aparecer de forma esporádica, sem relação epidemiológica, ou como surtos nosocomiais (PATERSON e BONOMO, 2005).

A ITU é a segunda infecção mais comum em ambiente não-hospitalar, atrás somente das infecções respiratórias (ANDREU et al., 2005). No que se refere à etiologia, as enterobactérias são responsáveis pela maioria destas infecções (BLATT e MIRANDA, 2005).

Pesquisas alertam para o aumento de casos, sobretudo na comunidade, de ITU's causadas por linhagens bacterianas multi-resistentes, como aquelas capazes de produzir ESBL (freqüência de isolamento entre 0,2 a 3,5% aproximadamente), o que pode refletir em falha da terapia antimicrobiana e em desenvolvimento de quadros clínicos complicados com maior morbidade, além da disseminação de genes de resistência a esses antimicrobianos (ARPIN et al., 2005; MINARINI et al., 2007; AKRAM, SHAHID e KHAN, 2007).

Pacientes com alto risco de apresentar colonização ou infecção por microrganismos produtores de ESBL são aqueles gravemente doentes, com estadia prolongada em hospital e que fazem uso, por tempo prolongado, de instrumentos médicos invasivos, como sonda urinária, tubo endotraqueal, tubo nasogástrico e cateter venoso central. A estes procedimentos somam-se administração de nutrição parenteral, cirurgia recente, hemodiálise e úlcera de decúbito (TUMBARELLO et al., 2007).

Trabalhos recentes apontam clínicas de reabilitação e casas de repouso como reservatórios, não hospitalares, de bactérias produtoras de ESBL (DALMARCO, BLATT e CÓRDOVA, 2006).

A exposição prévia às cefalosporinas de segunda geração, como cefuroxima oral, em pacientes comunitários, portadores de ITU por *Escherichia coli* está

estritamente (63%) relacionada à produção de β -lactamase de espectro estendido (CALBO et al., 2006). O uso de uma variedade de outras drogas antimicrobianas também tem sido associado a este achado, incluindo-se trimetropim/sulfametoxazol e aminoglicosídeos (MOROSINI et al., 2006).

Nos casos de infecção comunitária, relacionam-se como fatores predisponentes além daqueles mencionados, diabetes mellitus, uso prévio de ciprofloxacina e seus derivados, ITU recorrente, admissão hospitalar recente e idade avançada (PATERSON e BONOMO, 2005).

Diante do exposto, considerando-se a epidemiologia e os fatores de risco associados, seria de se esperar que neste estudo, o maior índice de bactérias ESBL positivas estivesse relacionado a indivíduos com média de idade superior a 56 anos, em ambos os sexos. Por outro lado, o predomínio dos achados de pacientes portadores de ITU, nesta pesquisa, no sexo feminino está intimamente associado à presença de fatores predisponentes: uretra mais curta e maior proximidade do ânus com o vestíbulo vaginal e uretra. No homem, o maior comprimento uretral, maior fluxo urinário e o fator antibacteriano prostático desempenham papel protetor frente às ITU's.

De maneira geral, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são as espécies bacterianas mais comumente encontradas produzindo ESBL (TOFTELAND et al., 2007). Corroborando os dados da literatura, em nosso trabalho, *E. coli* e *K. pneumoniae* foram as espécies prevalentes, sendo recuperadas numa média de 68,7% e 16,6%, respectivamente, do total das urinas analisadas, no período de 2001 a 2009. Alta diversidade na distribuição das enterobactérias isoladas como produtoras de ESBL, em ITU, foi observada ao longo desta pesquisa. Espécies de *Klebsiella* não *pneumoniae*, como *K. oxytoca* (1,7%) e *K. ozanae* (1,4%) também foram isoladas. *Proteus mirabilis* (1,9%), *Providencia alcalifaciens* (0,9%), *Providencia stuartii* (1,3%), *Enterobacter aerogenes* (3,8%), *Enterobacter cloacae* (1,3%) e *Serratia marcescens* (0,7%) confirmam o perfil não homogêneo de uropatógenos produtores de ESBL. Resultado notável foi observado para *Morganella morganii*, que não tendo distribuição em todos os anos estudados, demonstrou frequência crescente de isolamento: 2 casos em 2008 e 11 em 2009, alcançando índice de 11,4% dos isolados neste último ano.

Dada à habilidade das ESBL de hidrolisar diferentes antibióticos, é de se esperar que o arsenal terapêutico seja reduzido. Os plasmídeos que carregam os

genes que codificam as enzimas β -lactamases também podem carregar genes de resistência a outras drogas, como aminoglicosídeos, quinolonas e sulfametoxazol-trimetropim (YU, CHUANG e RASMUSSEN, 2006).

Nos estudos de Calbo e colaboradores (2006), mais de 70% das amostras de *E. coli* produtoras de ESBL eram multi-resistentes. Esta resistência associada a outras classes de antimicrobianos é problemática (não somente em isolados urinários), pois a escolha terapêutica torna-se difícil.

Nosso estudo retrospectivo evidenciou expressiva resistência das linhagens de *E. coli* e *K. pneumoniae* frente às fluoroquinolonas e sulfazotrim. Embora tenha-se obtido picos de resistência para amicacina em 2004-2005 o número de linhagens bacterianas recuperadas (n= 43 e 29, respectivamente) foi reduzido, contrastando com altas taxas de sensibilidade nos anos posteriores. Esta informação é de suma importância para a adoção de uma terapia antimicrobiana eficaz frente a estas bactérias portadoras de genes de resistência a várias drogas, reduzindo a pressão seletiva sobre o imipenem, única droga com 100% de sensibilidade encontrada neste estudo (MOROSINI et al., 2006). Para as demais espécies bacterianas isoladas neste trabalho, embora não tenham sido recuperadas em número expressivo e em todos os anos avaliados, observam-se elevados índices de resistência às drogas não β -lactâmicas testadas. Este dado é de extrema relevância do ponto de vista epidemiológico, em virtude da possibilidade da transferência destes marcadores de resistência a outros microrganismos.

Considerando-se a evolução dos níveis de resistência a drogas entre as enterobactérias ESBL positivas, isoladas de ITU, entre 2001 a 2008, observa-se aumento expressivo no nível de resistência para ciprofloxacina e sulfazotrim, desaconselhando o uso dos mesmos em terapia empírica. O contrário é notado para amicacina, cujo índice de resistência mostrou declínio ao longo dos anos. O uso de gentamicina e nitrofurantoína deve ser sustentado com base num teste de susceptibilidade a drogas, direcionado para a linhagem isolada, visto que oscilações nos perfis de resistência foram encontradas.

Em nossa região, um estudo de caráter semelhante, realizado de 2000 a 2002, por Minarini e colaboradores (2007) apontou uma frequência de 1,48% de bactérias ESBL positivas, do total de enterobactérias isoladas em urina. Nosso estudo demonstrou taxa de 5,3% durante o ano de 2009. Esse dado alerta para uma

expansão dos casos de ITU causada por microrganismo produtor de ESBL, na comunidade, especialmente na região.

Em nosso estudo prospectivo, foi observada reduzida sensibilidade (26,7%) das ESBL isoladas frente às fluoroquinolonas, confirmando resistência cruzada entre β -lactâmicos e quinolonas em enterobactérias (CATTOIR et al., 2007).

Resistência cruzada de β -lactâmico com amicacina é um evento menos comum (NOGUEIRA et al., 2006). Em nosso estudo prospectivo, tal aminoglicosídeo demonstrou eficiência antimicrobiana em 94,3% das amostras positivas para ESBL, isoladas em 2009. Esse dado confirma a amicacina como opção terapêutica para tratamento de infecções por ESBL.

Em virtude dos altos padrões de resistência das linhagens de ESBL estudadas frente às associações sulfametoxazol/trimetropim (70,7%) e amoxicilina/ácido clavulânico (73,3%) e à tetraciclina (80,0%) é desaconselhável o uso destes fármacos como droga de escolha para terapia empírica de infecções associadas a microrganismo produtor de ESBL.

In vitro, os carbapenêmicos (incluindo, imipenem, meropenem e ertapenem) têm se mostrado ativos contra os microrganismos produtores de ESBL, em virtude da estabilidade que apresentam frente à hidrólise por estas enzimas (AKRAM, SHAHID e KHAN, 2007). Não há evidência de que a terapia combinada de um carbapenêmico com uma outra classe de antimicrobiano seja superior ao uso do carbapenêmico isolado. Entretanto, esta “arma” deve ser reservada para infecções graves, tipo pneumonia ou meningite, ou quando há falha terapêutica com outros antimicrobianos (PATERSON e BONOMO, 2005). Bhattacharya (2006), porém, defende a superioridade da atividade bactericida do imipenem associado à amicacina frente ao uso do carbapenêmico isolado.

Ao longo dos anos estudados (2001 a 2009), nenhuma das amostras bacterianas analisadas apresentaram resistência ao imipenem. Mody e colaboradores (2007) obtiveram em seus estudos o mesmo resultado: 100% de susceptibilidade de bactérias produtoras de ESBL ao ertapenem e ao imipenem.

O teste fenotípico de aproximação dos discos utilizado neste trabalho para a caracterização de linhagens produtoras de ESBL apresentou 94% de sensibilidade e 81,4% de especificidade, em pesquisa realizada por Wiegand e colaboradores (2007).

Nossos experimentos demonstraram que todas as amostras com teste fenotípico positivo para ESBL exibiram pelo menos um marcador genético de resistência, dentre aqueles pesquisados. Este resultado eleva o desempenho da metodologia analítica utilizada (método de aproximação dos discos), tendo a PCR como parâmetro de comparação. Entretanto, deve-se ressaltar a importância em se preservar a distância entre os discos: 20 mm centro-centro na execução desta técnica. A determinação desta distância constitui a maior dificuldade do método.

Nogueira et al. (2006) apontaram a cefotaxima como o melhor antimicrobiano para os testes de triagem e confirmatório a ser utilizado na identificação de ESBL. A elevada taxa de resistência obtida neste trabalho para cefotaxima (86,6%) comparada aos outros substratos utilizados, como aztreonam (60,9%) e ceftazidima (55,2%), confirma este resultado.

Diante do exposto, o uso de apenas uma droga β -lactâmica pode falhar na detecção de ESBL, acarretando um laudo falso negativo e, assim, falha terapêutica. O uso de cefalosporina de terceira e/ou de quarta geração e/ou aztreonam são recomendados no teste (CLSI, 2009).

Embora o CLSI (2010) ainda não reconheça nenhum teste fenotípico para detecção de AmpC, neste trabalho foi utilizado o teste para indução de AmpC, descrito por Taneja e colaboradores (2008). Esta técnica apresenta várias vantagens, tais como baixo custo, possibilidade de execução em conjunto com o método de aproximação dos discos para detecção de ESBL, além da facilidade de execução.

Vários antimicrobianos tem sido utilizados como indutores e substratos em testes fisiológicos para indução de AmpC. Além de cefoxitina e ceftazidima usados neste trabalho, Dunne e Hardin (2005) testaram outras combinações de drogas, como cefoxitina/piperacilina, imipenem/cefotaxima, imipenem/ceftazidima, imipenem/piperacilina/tazobactam e imipenem/cefotaxima. A especificidade de cada combinação de droga empregada no teste foi de 100%. A sensibilidade, entretanto, foi variável para cada combinação de antimicrobiano e para cada grupo bacteriano analisado (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *Serratia spp* e outros microrganismos).

Nossos experimentos para detecção de AMPc por técnica fenotípica e genotípica não apresentaram relação direta. Entretanto, acredita-se que as 8 amostras (6 *E. coli* e 2 *K. pneumoniae*) resistentes à cefoxitina e as 2 amostras (*M.*

morgannii) que apresentaram D-teste positivo para AMPc e AMPc positiva por PCR, apresentam esta enzima codificada por gene plasmidial, e pode ser caracterizada como AMPc do tipo CMY-2, conforme dados relacionados ao sequenciamento de amplicons como controle positivo do experimento. Além disso, de acordo com a referencia utilizada, os pesquisadores basearam-se em gene de ampC plasmidial do tipo CMY-2 para idealização dos oligonucleotídeos iniciadores (Odeh et al., 2002). Ao achado de amostras positivas para *ampC* por biologia molecular sem expressão de fenótipo, associa-se a possibilidade de interferência de outros genes que codificam ESBL clássicas presentes na mesma bactéria (tipo SHV, TEM e CTX-M) mascarando o teste fenotípico e à possibilidade de se ter usado uma combinação de indutor-substrato (cefotaxima e ceftazidima) fracos, visto que outras combinações de drogas podem apresentar melhor desempenho conforme a espécie bacteriana analisada.

Isolados *ampC* negativos por PCR, mas resistentes à cefotaxima (n=6) constituem espécies de *Enterobacter*, *M. morgannii* e *K. pneumoniae*, que podem exibir resistência a esta droga por outros mecanismos, como alteração da expressão de porinas ou a própria presença de *ampC* cromossômica não pesquisada. A única amostra positiva no D-teste para este fenótipo e simultaneamente resistente à cefotaxima, com resultado genotípico negativo para *ampC*, pode apresentar outro subtipo de *ampC*, que não o CMY-2 testado neste trabalho. Entretanto, a possibilidade resultado falso positivo do teste fenotípico não deve ser descartada.

A frequência encontrada dos genes dos tipos TEM (86,6%), SHV (59,0%) e CTX-M (31,4%) foi bastante similar a reportada por Minarini e colaboradores (2007) num estudo regional, utilizando linhagens ESBL positivas recuperadas de urina de pacientes comunitários. Este dado confirma a circulação destes marcadores de resistência fora do ambiente hospitalar e serve de alerta para a necessidade de contenção da disseminação dos mesmos também em Juiz de Fora.

Entre as espécies estudadas, *E. coli* foi aquela que demonstrou os maiores percentuais dos genes de resistência avaliados, confirmando dados da alta prevalência de CTX-M nesta espécie em trabalhos internacionais recentes (TOFTELAND et al., 2007 e GALAS, 2008).

Entre as 33 amostras CTX-m positivas, 31 delas foram resistentes à cefotaxima. Este achado confirma a proposição de que esta cefalosporina seja o alvo preferencial de ação de enzimas ESBL do tipo CTX-M (PITOUT et al., 2005).

A sensibilidade observada de todos os exemplares bacterianos analisados frente ao imipenem e o resultado negativo da PCR para a pesquisa de carbapenemase KPC subtipos 1 a 3, permite inferir que tal fenômeno de resistência, até o momento pesquisado ainda não foi evidenciado na região. Entretanto, é válido salientar a existência de outros subtipos de KPC: 4, 5, 6 e 7 que não foram avaliados pelo oligoiniciador utilizado nas reações de PCR. Assim, nossos dados não permitem inferir sobre a ocorrência destes marcadores (KPC subtipos 4 a 7) em nosso meio, sem expressão do fenótipo (resistência ao imipenem). Embora, em baixa incidência, existem relatos na literatura da distribuição desses marcadores, em diversas áreas geográficas, como Itália (2 casos de *K. pneumoniae*, KPC-2), Colômbia (1 caso de *K. pneumoniae* KPC-2) e Estados Unidos (1 caso de *E. cloacae* KPC-2, 1 caso de *E. cloacae* KPC-3 e uma taxa de até 24% entre da enzima KPC entre as linhagens de *K. pneumoniae*) (BRATU et al., 2005; VILLEGAS et al., 2006 e FONTANA et al., 2010). Especificamente no Brasil, há relatos de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2, isolados de pacientes em hospitais do Recife (4 casos) e Rio de Janeiro (6 casos) (MONTEIRO et al., 2009 e PEIRANO et al., 2009).

6.1 Considerações finais

Os resultados desse trabalho demonstraram uma alta prevalência de microrganismos produtores de ESBL entre os membros da Família *Enterobacteriaceae*, obtidos a partir de amostras biológicas de pacientes atendidos em um Laboratório de Análises Clínicas, apontando para uma questão bastante preocupante.

A incidência de linhagens produtoras de ESBL entre isolados clínicos vem aumentando ao longo dos últimos anos resultando em limitações nas opções terapêuticas. Esse aumento é devido, em sua maioria, à pressão seletiva sofrida pela utilização indiscriminada de antibióticos β -lactâmicos.

O surgimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos é inevitável, em virtude da natural evolução das espécies, mas o controle na utilização dos mesmos pode limitar o aparecimento de linhagens multi-resistentes. Neste contexto, o papel do laboratório de microbiologia clínica é de extrema importância, visto que é a partir da análise do antibiograma que o médico deve instaurar a terapia antimicrobiana adequada. Se o clínico indicar um antimicrobiano β -lactâmico para um paciente portador de uma infecção causada por uma bactéria produtora de ESBL, ocorrerá falha terapêutica, seja por erro do laboratório, que pode não ter detectado a presença da enzima ou por equívoco do médico. Desta forma, o paciente não vai responder positivamente ao tratamento e pode ocorrer agravamento da infecção.

Com base nas informações geradas neste trabalho se faz importante a determinação dos subtipos de enzimas β -lactamases encontradas, para a construção de um banco de informações epidemiológicas, como ferramenta para contenção da expansão da disseminação dos genes de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, em especial na área pesquisada.

7 CONCLUSÕES

- A principal espécie produtora de ESBL entre as linhagens bacterianas recuperadas neste trabalho é *Escherichia coli*.
- Com base no teste de aproximação dos discos, cefotaxima foi o melhor substrato para os testes de triagem e confirmatório a ser utilizado na identificação fenotípica de ESBL.
- Carbapanêmico do tipo imipenem foi o único antimicrobiano para o qual todas as amostras analisadas apresentaram 100% de sensibilidade.
- De forma geral, as diferentes espécies bacterianas isoladas como produtoras de ESBL apresentaram altos padrões de resistência a outras classes de antimicrobianos, como quinolonas e sulfazotrim e baixos níveis de resistência frente à amicacina.
- Os genes codificadores para β -lactamases do tipo AMPc, TEM, SHV e CTX-M estão presentes entre as enterobactérias isoladas de pacientes com ITU, de um Laboratório de Análises Clínicas de Juiz de Fora, MG.
- O marcador genético para ESBL encontrado com maior frequência foi TEM
- β -lactamases do tipo ampC são prevalentes na população bacteriana amostrada, embora sejam menos freqüentes do que ESBL.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBLER, R.P.; COULSON, A.F.; FRERE, J.M.; GHURYSSEN, J.M.; JORIS, B.; LEVESQUE, R.C.; TIRABY, G.; WALEY, S.G. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. **Journal Biochemistry**, **276**: 269-270, 1991.

ANDREU, A.; ALÓS, J.L.; GOBERNADO, M. Etiología y sensibilidad a los antimicrobianos de los uropatógenos causantes de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad. **Enfermagem Infeccion Microbiology Clinical**, **23**: 4-9, 2005.

ARPIN, C.; DUBOIS, V.; MAUGEIN, J.; JULLIN, J.; DUTILH, B.; BROCHET, J.P.; LARRIBET, G.; FISCHER, I.; QUENTIN, C. Clinical and molecular analysis of extended spectrum β -lactamase producing enterobacteria in the community setting. **Journal of Clinical Microbiology**, **43**: 5048-5054, 2005.

AKHAM, M.; SHARID, M.; UKHAN, A.U. Etiology and antibiotic resistance patterns of community urinary tract infections in J N M C Hospital Aligarh, India. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, **6**: 4, 2007.

BERTONCHELI, C.M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, **44 (4)**: 577-599, 2008.

BHATTACHARYA, S. ESBL: from petri dish to the patient. **Indian Journal of Medical Microbiology** **24**, (1) : 20-4, 2006.

BRATU, S.; LANDMAN, D.; ALAM, M.; TOLENTINO, E.; QUALE, J. Detection of KPC carbapenem – hydrolyzing enzymes in *Enterobacter spp*, from Brooklin, New York. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** , **49**: 776-778, 2005.

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 Brooklin, New York: Epidemiology and recommendations for detection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** , **49**: 3018-3020, 2005.

BLATT, J.M.; MIRANDA, M.C. Perfil dos microrganismos causadores de infecções do trato urinário em pacientes internados. **Revista Panamericana de Patologia**, **7**: 10-14, 2005.

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

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman**: As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: Mc. Graw Hill, 1848, 2006.

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

CALBO, E.; ROMANI, V.; XERCAVINS, M.; GÓMEZ, L.; VIDAL, C.G.; QUINTANA, S.; VILA, J.; GARAU, J. Risk factors for community onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**, **57**: 780-783, 2006.

CAO, V.; LAMBERT, T.; NHU, D.Q.; LOAN, H.K.; ARLET, G.; COURVALIN P. Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. **Antimicrobial Agents Chemother**, **46**: 3739-3743, 2002.

CARVALHO, W.S.; MIRANDA, S.S.; PESQUERO, J.L.; GOMES, M.A. Diagnóstico de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina utilizando-se da reação em cadeia da polimerase. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, **43**: 31-38, 2007.

CASALS, J.B.; PRINGLER, N. Detection in the routine laboratory of new plasmid mediated broad-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae*, abstr. 603, p. 144. In Proceedings of the 7th Mediterranean Congress of Chemotherapy, Barcelona, Spain, 1990.

CATTOIR, V.; POIREL, L.; ROTIMI, V.; SOUSEY, C. J. ; NORDMAN, P. Multiplex PCR for detection of plasmid mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL producing enterobacterial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, **60**: 394-397, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 16th information supplement M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 19th information supplement M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th information supplement M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2010.

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

CRETI, R.; IMPERI, M.; BERTUCCINI, L.; FABRETTI, F.; OREFICI, G.; ROSA, R.; BALDASSARI, L. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. **Journal of Medical Microbiology**, **53**: 13-20, 2004.

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

DAVIES, J. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiologia SEM**, **12**: 9-16, 1996.

DUNNE, W.M.; HARDIN, D.J. Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk approximation assay format to screen for AmpC induction in patient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp* and *Serratia spp*. **Journal of Clinical Microbiology**, **43**: 5945-5949, 2005.

ESMERINO, L.A.; GONÇALVES, L.G.; SCHELESKY, M.E. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas *Escherichia coli* isoladas de infecções urinárias comunitárias. **Revista Ciências Biológicas**, **9**: 31-39, 2003.

FANG, H.; ATAKER, F.; HEDIN, G.; DORNBUSCH, K. Molecular epidemiology of extended spectrum β -lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. **Journal of Clinical Microbiology**, **46**: 707-712, 2008.

FONTANA, C.; FAVARO, M.; SARAMTI, L.; NATOLIA, S.; ALTIERIZ, A.; BOSSAZ, M.C.; MINELLIZ, S. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. **BMC Research Notes**, **3**: 40, 2010.

FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S.; BAILEY & SCOTT'S Diagnostic Microbiology, 10^a ed, St. Louis: Mosby; 1998. Cap.17, 234-249.

GUPTA, K.; HOOTON, T.M.; STAMM, W.E. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community acquired urinary tract infection. **Annals of Internal Medicine**, **35**: 41-50, 2001.

GUPTA, A.; AMPOFO, K.; RUBENSTEIN, D.; SAIMAN L. Extended spectrum β -lactamase – producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a review of the literature. **Journal of Perinatology**, **23**: 439-443, 2003.

GALAS, M.; DECOUSSER, J.; BRETON, N.; GODARD, T.; ALLOUCH, P. Y. ; PINA, P. College de Bacteriologie Virologie Hygiene (ColBVH) Study Group. Nationwide Study of Prevalence, Characteristics and Molecular Epidemiology of extended spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **52**: 786-789, 2008.

GUPTA, V. An update on newer β -lactamases. **Indian Journal of Medical Research**, **126**: 417-427, 2007.

HELLINGER, W.C.; BREWER, N. S. Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam. **Mayo Clinical Proceedings**, **74 (4)**: 420-434, 1999.

HERANDEZ, J.R., PASCUAL, A.; CANTÓN, R.; MARTINEZ-MARTINEZ, L. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamases de espectro estendido em hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, **21**: 77-82, 2003.

HO, P.L.; CHOW, K.H.; YUEN, K.Y.; NG, W.S.; CHAU, P.Y. Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**, **42**: 49-54, 1998.

HOWARD, C.; DAAL, A.; KELLY, G.; SCHOONEVELDT, J.; NIMMO, G.; GIFFARD, P.M. Identification and minisequencing based discrimination of SHV β -lactamases in

nosocomial infection associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. **Antimicrobial Agents Chemother**, **46**: 659-664, 2002.

JARLIER, V.; NICOLAS, M.H.; FOURNIER, G.; PHILIPPON, A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **28**: 302-307, 1988.

JONES, C.H.; TUCKMAN, M. KEENEY, D.; RUZIN, A.; BRADFORD, P.A. Characterization and sequence analysis of extended spectrum β lactamase encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates during tigecycline phase 3 clinical trials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** (**53**), **2**: 465-475, 2009.

JUNIOR, M.A.S.; FERREIRA, E.S., CONCEIÇÃO, G.C. β -lactamases de espectro ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. **Revista Newslab**, **63**: 152-174, 2004.

KONEMAN, E, W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, Jr. W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica Ltda., 2001. 1465 p.

KUBOYAMA, R. H. Detecção de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido em pacientes assistidos em hospitais terciários na cidade de Campinas: epidemiologia molecular e fatores de risco. 2009. 166 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

LEVY, S.B. The challenge of antibiotic resistance. **Scientific American**, **278** (3): 32-39, 1998.

LIVERMORE, D.M. β -lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, **8**: 557- 584, 1995.

LIVERMORE, D.M.; WINSTANLEY, T.G.; SHANNON, K.P. Interpretative reading recognising the unusual and interfering resistance mechanisms from resistance phenotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **48**: 87-102, 2001.

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

MACHADO, E.; COQUE, T.M.; CANTÓN, R.; NOVAIS, A.; SOUSA, J.C.; BAQUERO, F.; PEIXE, L. High diversity of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **60**: 1370-1374, 2007.

MARSHALL, W.F.; BLAIR, J.E. The cephalosporins. **Mayo Clinic Proceedings**, **74**: 187-195, 1999.

MATTÉ, G.R. Estudo de *Vibrio* spp potencialmente patogênicos através de métodos moleculares [tese de livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, 2003.

MEDEIROS, A. A. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. **Clinical Infectious diseases**, **24**: 19-45, 1997.

MEDEIROS, A.W.; D'AZEVEDO, P.; PEREIRA, R.I.; CASSENEGO, A.P.; SAND, S.V.D.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A.P.G. PCR-RFLP of 16S ribosomal DNA to confirm the identification of *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* isolated from clinical and food samples. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **43**: 100-101, 2010.

MELLA, S.M.; ZEMELMAN, C.M.; BELLO, H.T.; DOMÍNGUEZ, M.Y.; GONZÁLEZ, G.R.; ZEMELMAN, R.Z. Propriedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. **Revista Chilena de Infectología**, **18 (1)**: 2001.

MESSAI, Y.; BENHASSINE, T.; NAIM, M.; PAUL, G.; BKOUR, R. Prevalence of β -lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers. **Revista Española de Quimioterapia**, **19**: 144-151, 2006.

MINARINI, L.A.R.; GALES, A.C.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A.L.C. Prevalence of community occurring extended spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Current Microbiology**, **24**: 335-341, 2007.

MINARINI, L.A.R.; POIREL, L. TREVISANI, N.A.C.; DARINI, A.L.C.; NORDMANN, P. Predominance of CTX-M type extended-spectrum β -lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, **65**: 202-206, 2009.

MODY, R.M.; ERWIN, D.P.; SUMMERS, A.M.; CARRERO, H.A.; SELBY, E.B.; EWELL, A.L.; MORAN, K.A. Ertapenem susceptibility of extended spectrum β -

lactamases producing organisms. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, **6**: 6, 2007.

MOLAND, E.S.; HANSON, N.D.; BLACK, J.A.; HOUSSAIN, A.; SONG, W.; THOMSON, K.S. Prevalence of newer β -lactamases in Gram negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, **44**: 3318-3324, 2006.

MONSTEIN, H.I.; OSTHOLM-BALKHED, A.; NILSSON, M.V.; NILSSON, M.; DORNBUSCH, K.; NILSSON, L.E. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*SHV, *bla*TEM and *bla*CTX-M genes in *Enterobacteriaceae*. **APMIS**, **115**:1400-1408, 2007.

MOROSINI, M.I.; CASTILLO, M.G.; COQUE, T.M.; VALVERDE, A.; NOVAIS, A.; LOZA, E.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Antibiotic co-resistance in extended spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* and in vitro activity of tigycycline. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **50**: 2695-2699, 2006.

MONTEIRO, J. SANTOS, A.F.; ASENSI, M.D.; PEIRANO, G.; GALES, A.C.; First report of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **53**: 333-334, 2009.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, O.S.; PFALLER, M.A. Microbiologia médica. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

NEMOY, L.L; KOTETISHVILI, M.; TIGNO, J.; NORRIS, A.K.; HARRIS, A.D.; PERENCEVICH, E.N.; JOHNSON, J.A.; TORPEY, D.; SULAKVELIDZE, A.; MORRIS, J.G.; STINE, O.C. Multilocus sequence typing versus pulsed field gel electrophoresis for characterization of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, **43**: 1776-1781, 2005.

NEU, H.C. Relation of structural properties of beta-lactam antibiotics to antibacterial activity. **American Journal of Medicine**, **79**: 2-13, 1985.

NOGUEIRA, K. S. **Ocorrência de β -lactamasesde espectro ampliado em enterobactérias isoladas em dois hospitais universitários**. 100 f. Dissertação (mestrado Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

NOGUEIRA, K.S.; HIGUTI, I.H.; NASCIMENTO, A.J.; TERASAWA, L.B.; OLIVEIRA, S.; MATOS, A.P.; SOUSA, H.A.P.H.M.; COGO, L.L.; COSTA, L.M.D. Occurrence of

extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in Curitiba, Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infection Disease**, **10**: 390-395, 2006.

ODEH, R.; KELKAR, A.M.; BONOMO, R.A.; SCHRECKENBERGER, P.C.; QUINN, J.P. Broad resistance due to plasmid mediated AmpC β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*. **Clinical Infectious Diseases**, **35**:140-145, 2002.

O'BRIEN T.F. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an Antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. **Clinical Infectious Diseases**, **34 (3)**: 78-84, 2002.

ODELSON, D. A.; RASMUSSEN, J. L.; SMITH C. J.; MACRINA F. L. Extrachromosomal systems and gene transmission in anaerobic bacteria. **Plasmid**, **17**: 87-109, 1987.

OLIVEIRA, L.J.H.H.; GRANATO, A. C.; HIRATA, D.B.; HOKKA, C.O.; BARBOZA, M.; TRSIC, M. Ácido clavulânico e cefamicina C: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. **Química Nova**, **15 (00)**: 1-9, 2009.

PAGANI, L.; MIGLIAVACCA, R.; PALLECCHI, L.; MATTI, C.; GIACOCONE, E.; AMICOSANTE, G. Emerging extended spectrum β -lactamases in *Proteus mirabilis*. **Journal Clinical Microbiology**, **40**: 1549-1552, 2002.

PATERSON, D.L.; BONOMO, R.A. Extended-Spectrum β -lactamases: a Clinical Update. **Clinical Microbiology Reviews**, **18**: 657-686, 2005.

PEIRANO, G.; SEKI, L.M.; PASSOS, V.L.V.; PINTO, M.C.F.G.; GUERRA, L.R.; ASENSI, M.D. Carbapenem hydrolysing β -lactamases KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **63**: 265-268, 2009.

PELOSO, P.F.D.; LEITE, C.C.F.; SILVA, H.P.; FILHO, H.M.T. Importância da Utilização de Metodologias para a Detecção de ESBL em Espécies de Enterobactérias. **Revista Newslab**, **61**: 118-128, 2003.

PEREZ-PEREZ, F.J.; HANSON, N.D. Detection of plasmid mediated AmpC β -lactamases genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, **40**: 2153-2162, 2002.

PFALLER, M.A.; SEGRETI, J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended spectrum β -lactamases (ESBL's) in the community. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **42**: 153-163, 2006.

PITOUT, J.D.; NORDMANN, P.; LAUPLAND, K.B.; POIREL, L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **56**: 52-59, 2005.

QUINTEROS, M.; RADICE, M.; GARDELLA, N.; RODRIGUEZ, M.M.; COSTA, N.; KORBENFELD, D.; COUTO, E.; GUTKIND, G. Extended-spectrum β -lactamase in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **47**: 2864-2867, 2003.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001. 703 p.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RAZ, R.; GENNESIN, Y.; WASSER, J.; STOLER, Z.; ROSENFELD, F.; ROTTENSTERICH, E.; STAMM, W.E. Recurrent urinary tract infections post menopausal women. **Clinical Infection Disease**, **30**: 152-156, 2000.

ROBBERTS, F.J.L.; KOHNER, P.C.; PATEL, R. Unreliable extended spectrum β -lactamase detection in the presence of plasmid mediated AmpC in *Escherichia coli* isolates. **Journal Clinical Microbiology**, **47**: 358-361, 2009.

ROBIN, F.; DELMAS, J.; ARCHARNBAUD, M.; SCHWEITZER, C.; CHANAL, C.; BONNET, R. CMT-Type β -lactamase TEM-125, na emerging problem for extended spectrum β -lactamase detection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **50 (7)**: 2403-2408, 2006.

ROCHA, A.O.; MENDONÇA, A.C.O.; SÁ, A.C.S.; VALOIS, D.S.; ARAÚJO, J.S.; MENDES, L.M.B.; OLIVEIRA, L.C.S.; ALCÂNTARA, T.Q.N.; NASCIMENTO-CARVALHO, C.M. Antibioticoterapia em Crianças com Pneumonia. **Gazeta Médica da Bahia**, **77**: 88-92, 2007.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. Resistência Bacteriana – Interpretando o Antibiograma, 1. ed., Atheneu, São Paulo, SP, 2005.

SABATTÉ, M. MIRÓ, E.; NAVARRO, F.; VERGÉS, C.; ALIARGA, R.; MIRELIS, B.; PRATS, G. β -lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella spp* clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **49**: 989-997, 2002.

SAMAHA-KFOURY, J.N.; ARAJ, G.F. Recent developments in β -lactamases and extended-spectrum β -lactamses. **BMJ Journal**, **327**: 273-280, 2003.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. Mechanisms of microbial disease. 3th edition, Ed. Lippincott, Williams & Wilkins, 1999.

SEJAS, L.M.; SILBERT, S.; REIS, O.A.; SADER, H.S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de discos-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, **39**: 27-35, 2003.

SHAHCHERAGHI, F.; NIKBIN, V.S.; FEIZABADI, M.M. Prevalence of ESBLs genes among multidrug resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in Tehran. **Microbial Drug Resistance**, **15**: 37-39, 2009.

SONG, S.; LEE, E.Y.; KOH, E.M.; HA, H.S.; JEONG, H.J.; BAE, K.; JEONG, S.H. Antibiotic resistance mechanisms of *Escherichia coli* isolates from urinary specimens. **Korean Journal Laboratory Medical**, **29**: 17-24, 2009.

SPIEGEL, C. Bacterial Vaginosis. **Clinical Microbiology**, **4**: 485-502, 1991.

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

SERRANO P. H. Responsible use of antibiotics in aquaculture. **FAO Fisheries Technical Paper**, **469**. 2005. 97p.

SILVA-VALENZUELA, M.G.; ALMEIDA, F.C.S.; ANTONIO, L.F.M.; LIBORIO, T.N.; ACQUAFREDA, T.; CAZAL, C.; FERRAZ, A.; NUNES, F.D. Hibridização *in situ* com sonda não radioativa para mRNA: princípios e aplicações em patologia. **Jornal Brasileiro de Medicina Laboratorial**, **42**: 207-213, 2006.

STRATTON, C. M. D. Extended-Spectrum B-lactamases : An Unappreciated Global Problem. **Medscape**, San Diego, set.2002.

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

TAIT, S. Mobile genetic elements in antibiotic resistance. **Journal of Medical Microbiology**, **38**: 157-159, 1993.

TANEJA, N.; RAO, P.; ARORA, J.; DOGRA, A. Occurrence of ESBL and AmpC β -lactamases and susceptibility to newer antimicrobial agents in complicated UTI. **Indian Journal Medical Research**, **127**: 85-88, 2008.

TENOVER, F.C.; RANEY, P.M.; WILLIAMS, P.P.; RASHEED, J.K.; BIDDLE, J.W.; OLIVER, A. Evaluation of the NCCLS extended-spectrum β -lactamases confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during project ICARE. **Journal Clinical Microbiology**, **41**: 3142-3146, 2003.

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

TOFTELAND, S.; HALDORSEN, B.; DAHL, K.H.; SIMONSEN, G.S.; STEINBAKK, M.; TIMOTHY R. WALSH, T.R.; SUNDSFJORD, A. 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**, **45 (1)**: 199-205, 2007.

TUMBARELLO, M.; SANGUINETTI, M.; MONTUORI, E.; ENRICO, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; CITTON, R.; D'INZEO, T.; CAUDA, R.; SPANU, T. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections extended spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae*: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **51**: 1987-1994, 2007.

UENO, M.; JORGE, A.O.C. Caracterização de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, envolvidos em infecções nosocomiais, por meio de técnicas fenotípicas e análise de perfil plasmidial. **Revista Biociência**, **7**: 15-22, 2001.

VILLEGAS, M.V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; SUAREZ, C.J.; LOPEZ, J.A.; VALLEJO, M.; QUINN, J.P.; 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**, **50**: 2880-2882, 2006.

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

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **14**: 321-325, 2000.

YAMASAKI, R. Infecções urinárias inespecíficas. In: SBU. Guia Prático de Urologia. BG Cultural, 113-117, 1999.

YOUNG, F.E.; MAYER, L. Genetic determinants of microbial resistance to antibiotics. **Reviews of infectious diseases**, **1 (10)**: 55-62, 1979.

YU, W.L.; CHUANG, C.M.; RASMUSSEN, J.W. Extended-spectrum β -lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, **39**: 264-277, 2006.

YUM, J.H.; KIM, S.; LEE, H.; YONG, D.; LEE, K.; CHO, S.N.; CHONG, Y. Emergence and wide dissemination of CTX-M type ESBLs, and CMY-2 and DHA-1 type AmpC β -lactamase in Korean respiratory isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal Korean Medicine Science**, **20**: 961-965, 2005.

ZEMELMAN, Z.R. Detecção de β -lactamase de espectro extendido em el laboratorio de microbiologia. **Revista Chilena de Infectologia**, **19**: 92-95, 2002.