



**Susana Cláudia de  
Matos Lima Ferreira**

**Detecção de  $\beta$ -lactamases de Espectro Expandido  
em *E.coli* e *K.pneumoniae***



**Susana Cláudia de  
Matos Lima Ferreira**

**Detecção de  $\beta$ -lactamases de Espectro Expandido  
em *E.coli* e *K.pneumoniae***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica do Prof. Doutor António Carlos Matias Correia, professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

“Estás determinado?  
Agarra-te a esse momento.  
O que puderes fazer ou sonhas que podes fazer,  
Começa a faze-lo.  
A coragem traz em si o génio,  
O poder da magia.  
Empenha-te somente  
E a mente incendeia-se,  
Começa, e o trabalho  
Será completado.”

Goethe

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor António Carlos Matias Correia**  
professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

vogais

**Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso**  
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

**Dr.<sup>a</sup> Maria Helena da Silva Santos Ramos,**  
especialista em Patologia Clínica e Directora do Serviço de Microbiologia do Hospital Geral de Santo António do Porto

**Doutora Isabel da Silva Henriques**  
investigadora do CESAM da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

A todos aqueles que deram o seu contributo para a concretização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

**palavras-chave**

$\beta$ -lactâmico,  $\beta$ -lactamase,  $\beta$ -lactamases de espectro expandido, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, infecção nosocomial, sensibilidade, especificidade, teste de sinergismo de duplo-disco, E-test, teste VITEK2 ESBL

**resumo**

A produção de  $\beta$ -lactamases de espectro expandido (ESBLs) é o mecanismo de resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos mais frequente entre a família *Enterobacteriaceae*. A sua detecção deve ser executada, por todos os laboratórios de Microbiologia, para que resultados de falsas sensibilidades às oximinocefalosporinas não sejam fornecidos indevidamente. Para além disso, o estudo da epidemiologia dos microrganismos produtores destas enzimas contribui para a prevenção e combate à sua disseminação. Assim, torna-se fundamental que o diagnóstico *in vitro* seja efectuado com recurso a metodologias de alta especificidade e sensibilidade, adequadas à realidade hospitalar em que cada laboratório se insere. O objectivo deste trabalho foi fazer a caracterização fenotípica de isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs, avaliar a sua incidência nas infecções nosocomiais e da comunidade e fazer a comparação entre três métodos de detecção e confirmação da produção de ESBLs, estudando a sua sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo.

Os resultados obtidos sugerem a eleição do teste VITEK2 ESBL a adoptar como metodologia de rotina no laboratório de Microbiologia do Hospital Geral de Santo António, EPE, ao detectar 96,9% de isolados produtores de ESBLs e apresentar 100% de sensibilidade na detecção de estirpes de *E. coli* ESBL positivas. Adicionalmente, os resultados demonstram que este método não implica custos acrescidos nem mobilização extraordinária de recursos materiais e humanos, para o serviço de Microbiologia deste hospital.

**keywords**

$\beta$ -lactam,  $\beta$ -lactamase, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, nosocomial infection, sensibility, specificity, double-disc synergism test, E-test, VITEK2 ESBL test

**abstract**

Production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) is the mechanism of antimicrobial  $\beta$ -lactam resistance more frequent within *Enterobacteriaceae* family members. Its detection should be made, in all diagnosis laboratories, to avoid reports of false susceptibility results to oximinocefalosporins. The epidemiological study of this type of microorganisms gives important information for the adoption of prevention and control measures to reduce dissemination of this mechanism of resistance among bacteria. So, it's emergent that *in vitro* diagnosis should be done with laboratorial methods, adjusted to the hospital reality and presenting high levels of sensibility and specificity.

The aim of this study was to do the phenotypical characterization of *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates harboring ESBLs, study their incidence in nosocomial and community infections and compare three methods of detection and phenotype confirmation of ESBLs production, evaluating their sensibility and specificity levels.

Results suggest that the VITEK 2 ESBL test it's a reliable methodology in the routine of Hospital Geral de Santo António, EPE, Microbiology laboratory, detecting 96,9% of ESBL producers and presenting 100% of sensibility in the detection of *E. coli* ESBL producers. Results also suggest, to Microbiology laboratory from this hospital, less costs, less professionals and resources mobilization.





## Índice

|  |     |
|--|-----|
| Lista de abreviaturas .....  | II  |
| Lista de figuras .....   | III |
| Lista de quadros .....   | IV  |
| 1. Introdução .....  | 1   |
| 1.1. <i>Enterobacteriaceae</i> .....                                     | 1   |
| 1.2. Acção antimicrobiana dos $\beta$ -lactâmicos .....                  | 2   |
| 1.3. Mecanismos bacterianos de resistência aos $\beta$ -lactâmicos ..... | 4   |
| 1.4. Beta-lactamases .....   | 5   |
| 1.4.1. Classificação .....   | 6   |
| 1.4.1. Outras $\beta$ -lactamases .....                                  | 9   |
| 1.5. Beta-lactamases de espectro expandido (ESBLs) .....                 | 11  |
| 1.6. Epidemiologia .....   | 20  |
| 1.7. Factores de risco .....   | 24  |
| 1.8. Infecções nosocomiais <i>versus</i> infecções da comunidade .....   | 24  |
| 1.9. Detecção laboratorial de ESBLs .....                                | 27  |
| 1.10. Métodos de caracterização genótipica .....                         | 33  |
| 1.11. Significado clínico da detecção de ESBLs .....                     | 35  |
| 1.12. Terapêutica .....  | 35  |
| 1.13. Objectivo .....  | 36  |
| 2. Material e Métodos .....  | 37  |
| 3. Resultados .....  | 40  |
| 4. Discussão .....   | 48  |
| 5. Perspectivas futuras .....  | 53  |
| 6. Bibliografia .....  | 54  |

## **Lista de abreviaturas**

**DPCO** – Doença pulmonar crónica obstrutiva.

**ESBLs** –  $\beta$ -lactamases de espectro expandido.

**PBPs** – Penicillin-Binding-Proteins.

**pI** – ponto isoeléctrico.

**IRT** –  $\beta$ -lactamase TEM resistente ao inibidor.

**CLSI** – Clinical and Laboratory Standards Institute.

**CIM** – Concentração inibitória mínima.

**NNIS** – National Nosocomial Infection Surveillance.

**UCI** – Unidade de Cuidados Intensivos.

**PCR** – Polimerase Chain Reaction.

**RFLP** – Restriction Fragment Length Polymorphism.

**SSCP** – Single-strand Conformational Polymorphism.

**LCR** – Ligase Chain Reaction.

**AES** - Advanced Expert System.

**CAZ** – Ceftazidima.

**ATM** – Aztreonamo.

**CTX** – Cefotaxima.

**CRO** – Ceftriaxona.

**CDP** – Cefpodoxima.

**AMC** – Amoxicilina/ ácido clavulânico.

**CT/CTL** – cefotaxima/cefotaxima com ácido clavulânico.

**TZ/TZL** – ceftazidima/ceftazidima com ácido clavulânico.

**PM/PML** – cefepima/cefepima com ácido clavulânico.

## **Lista de figuras**

**Figura 1** – Estrutura química das penicilinas e das cefalosporinas.

**Figura 2** – Parede celular das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

**Figura 3** – Tiras Etest® ESBL.

**Figura 4** – Sistema automático VITEK2 AES.

**Figura 5** – Resultados das metodologias praticadas.

**Figura 6** – Outros resultados relevantes.

**Figura 7** – Frequência de estirpes produtoras de ESBLs detectadas em 42 meses.

**Figura 8** – Frequência de estirpes isoladas em regime de internamento e ambulatório.

**Figura 9** – Frequência de estirpes ESBL positivas por produto biológico.

**Figura 10** – Relação entre idade, sexo e microrganismo produtor de ESBLs.

## **Lista de quadros**

**Quadro I** – Classificação das  $\beta$ -lactamases segundo Richmond e Sykes.

**Quadro II** – Agrupamentos das  $\beta$ -lactamases segundo Ambler.

**Quadro III** – Grandes grupos das  $\beta$ -lactamases segundo Bush.

**Quadro IV** – Subgrupos das  $\beta$ -lactamases segundo Bush.

**Quadro V** – Diferentes grupos de  $\beta$ -lactamases de espectro expandido.

**Quadro VI** – Características das  $\beta$ -lactamases do tipo TEM.

**Quadro VII** – Características das  $\beta$ -lactamases do tipo SHV.

**Quadro VIII** – Características das ESBLs do tipo CTX-M.

**Quadro IX** – Características das ESBLs do tipo OXA.

**Quadro X** – Características das novas ESBLs.

**Quadro XI** – Relação de resultados entre as metodologias praticadas.

**Quadro XII** – Principais discrepâncias entre testes.

**Quadro XIII** – Genótipos de amostras referentes ao ano de 2004.

**Quadro XIV** – Validade e capacidade preditiva por teste e por microrganismo.

**Quadro XV** – Perfis hidrolíticos bacterianos mais comuns no internamento e no ambulatório.

**Quadro XVI** – Controlo de Qualidade.

## 1. Introdução

O uso de antibióticos deve ser encarado como um acto de inteligência, pois as bactérias são melhores engenheiros genéticos que o homem e vão continuar a escapar ao seu efeito (1). Dada a sua eficácia e a sua baixa toxicidade para os animais e para o Homem, os  $\beta$ -lactâmicos são um dos grupos de antibióticos mais utilizados na terapêutica de infecções de vários tipos, nomeadamente, aquelas da responsabilidade dos constituintes da família *Enterobacteriaceae*. Estes, são importantes patogêneos, capazes de causar inúmeros géneros de infecções, no Homem, por serem detentores de complexos factores de virulência e por apresentarem a capacidade de resistir aos antimicrobianos (1,2).

### 1.1. *Enterobacteriaceae*

Esta família abrange um grupo grande e heterogêneo de bastonetes Gram-negativos, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos apresentando diversas características ecológicas e patogénicas. Nela incluem-se os géneros *Escherichia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp. e *Proteus* spp., entre outros. Bioquimicamente caracterizam-se pela capacidade de reduzir os nitratos a nitritos, fermentar a glicose (com produção de ácido ou ácido e gás) e são oxidase negativo (2). Estirpes de *Escherichia coli*, apresentando serogrupos distintos, fazem parte da flora comensal do intestino humano e animal, mas podem ser patogénicas, dentro ou fora do tracto gastrointestinal. Podem causar infecção noutras órgãos e a nível do aparelho gastrointestinal, quando há invasão deste por estirpes distintas das comensais (diarreia do viajante). São responsáveis por 90% das infecções do tracto urinário, 15% dos casos de septicemia, e ainda, meningite neonatal, peritonite, entre outros. A posse de fímbrias e adesinas, são os principais factores de infecção/colonização por estas bactérias, bem como, os internamentos prolongados, as alterações da imunidade e a antibioterapia (3).

Outros géneros como *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. e *Serratia* spp., que podem ser encontrados como habitantes normais do intestino grosso,

incluem bactérias que são essencialmente oportunistas e normalmente patogêneos nosocomiais. Estirpes de *Klebsiella pneumoniae* são habituais colonizadores da pele e das mucosas e são, frequentemente, responsáveis por infecções do tracto urinário, pneumopatias e septicemias nosocomiais (2,3). Apresentam grande capacidade de adaptação e multiplicação nas mãos dos profissionais de saúde e no material de apoio, podendo originar surtos epidémicos de difícil controlo (2,3). Entre os factores promotores de infecção/colonização, por estes microrganismos, encontram-se as doenças subjacentes (alcoolismo, diabetes, DPCO), os tratamentos invasivos, os internamentos prolongados e a antibioterapia (2).

O uso excessivo, muitas vezes indiscriminado, dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos no tratamento destas infecções, é a principal causa do aparecimento de determinado tipo de resistências (1,4,8).

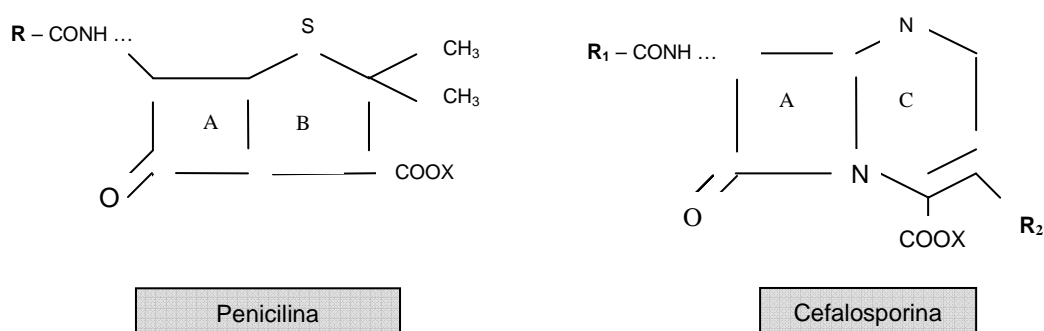
As primeiras referências à resistência microbiana, neste grupo de bactérias, remontam aos anos 60, acerca de estirpes de *E. coli* em relação à ampicilina (5). Actualmente, a resistência elevada destes microrganismos, é responsável pelos enormes problemas, principalmente a nível hospitalar, ocasionando o insucesso da terapêutica empírica, o prolongamento dos internamentos e o concomitante aumento dos custos hospitalares e sociais (4).

## **1.2. Acção antimicrobiana dos $\beta$ -lactâmicos**

Os  $\beta$ -lactâmicos constituem o grupo de antimicrobianos mais utilizado no combate a infecções provocadas por microrganismos Gram-negativos (1,11,21). Entre eles encontram-se as penicilinas, as cefalosporinas de primeira (cefalotina), de segunda (cefotaxima), terceira (ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona) e de quarta (cefepima) geração, os monobactamos (aztreonamo) e os carbapenemos (imipenemo, meropenemo). A sua aplicação é amplamente utilizada pois estes apresentam elevada toxicidade selectiva, larga diversidade de compostos e elevada eficácia terapêutica (1, 4).

Porém esta eficácia foi posta em causa com o aparecimento de bactérias resistentes, algum tempo após a introdução de novos  $\beta$ -lactâmicos no arsenal

terapêutico, as quais apresentam a capacidade de transmitir essa resistência entre a mesma espécie ou entre espécies diferentes. Este facto ocasionou a necessidade de aprofundar conhecimentos sobre farmacocinética dos  $\beta$ -lactâmicos, a natureza dos seus alvos, assim como, os mecanismos de resistência bacteriana e os diversos processos de transmissão da resistência (1). Este grupo de antibióticos é um conjunto de substâncias que apresentam algumas diferenças na sua composição química, na sua farmacocinética, e nas suas indicações terapêuticas. No entanto, têm em comum um anel  $\beta$ -lactâmico constituído por três átomos de carbono e um de azoto com radicais alteráveis. O anel  $\beta$ -lactâmico encontra-se combinado com um anel tiazolidina nas penicilinas ou com um anel dihidrotiazina nas cefalosporinas (1).



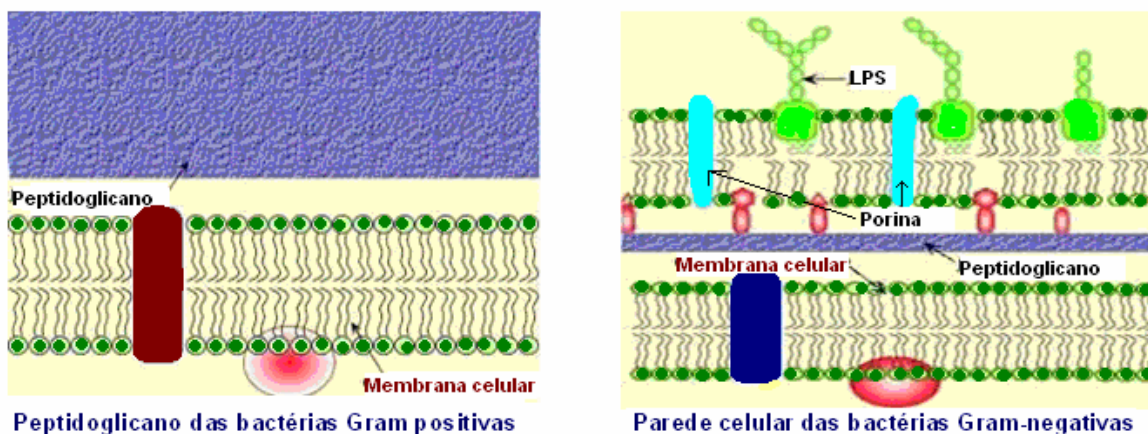
**Figura 1** – Estrutura química das penicilinas e das cefalosporinas

A – anel  $\beta$ -lactâmico; B – anel tiazolidina; C – anel dihidrotiazina;

Adaptado de Sousa JC. Manual de Antibióticos Antibacterianos, p. 109, 2005.

Como se pode ver na figura 1, para além do núcleo elementar das penicilinas e das cefalosporinas encontram-se, na sua estrutura, radicais variados (R, R1 e R2), cuja composição modifica o espectro antibacteriano e pode tornar o antibiótico sensível ou resistente ao suco gástrico ou conceder-lhe uma farmacocinética diferente. Assim, como nas cefalosporinas se podem modificar as características farmacocinéticas do antibiótico, mediante modificação de dois radicais, estas apresentam mais potencial do que as penicilinas. Por outro lado, a

possibilidade de substituir X, no grupo carboxilo, quer por metais, quer por radicais orgânicos, pode atribuir ao composto particulares e dinâmicas novas (1). Os  $\beta$ -lactâmicos afectam a fase final da biosíntese dos componentes do peptidoglicano, constituinte fundamental da parede celular das bactérias (fig.2). As PBPs (*Penicillin-Binding-Proteins*) são enzimas que catalizam o *cross-linking* da parede de peptidoglicano que rodeia a bactéria, mantendo a integridade da sua forma e da sua estrutura. Os  $\beta$ -lactâmicos antiparietais actuam ligando-se às PBPs, inibindo-as irreversivelmente e consequentemente impedindo a síntese do peptidoglicano, ocorrendo falha na sustentabilidade da parede e subsequente lise celular (1,6,7).



**Figura 2** – Parede celular das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas

### 1.3. Mecanismos bacterianos de resistência aos $\beta$ -lactâmicos

Sem dúvida que a resistência sempre fez parte da história das bactérias, mas só se tornou uma ameaça a partir do momento que o Homem começou a utilizar os  $\beta$ -lactâmicos, clinicamente (4). Estes, rapidamente promoveram uma selecção, matando as bactérias susceptíveis, mas deixando as resistentes sobreviver (8). Os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos apresentam o importante inconveniente de poderem ser inactivados por hidrolases bacterianas ( $\beta$ -lactamases) (1,7,8,10,12).



Aliás existem evidências que estas enzimas, capazes de inactivar os  $\beta$ -lactâmicos, eram produzidas pelas bactérias anteriormente à inserção e ao aperfeiçoamento destes, no uso clínico (4,5,9)

Pode considerar-se o aparecimento da resistência como uma acção de causa-efeito. Após a utilização da penicilina, no tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus*, surgiram as primeiras resistências, devido à produção de penicilinases plasmídicas, que rapidamente alastraram entre a mesma espécie, bem como a outras espécies de *Staphylococcus*. Esta resistência implicou o aparecimento de novos fármacos estáveis à acção destas enzimas (1,5). No entanto, as bactérias são versáteis e rapidamente desenvolveram novos meios de resistir.

A resistência às cefalosporinas (e outros  $\beta$ -lactâmicos) pode ser característica de um determinado género, como nos de *Enterococcus* spp. (resistência intrínseca), ou pode ser adquirida por mutação espontânea ou transferência de ADN (8). Funcionalmente esta resistência pode reflectir-se na produção de  $\beta$ -lactamases, em alterações da permeabilidade da membrana externa bacteriana e no sistema de efluxo, ou por alteração do alvo de acção. Alteração nas PBPs originais ou a aquisição de novas é um mecanismo mais comum em Gram-positivos, tais como, a resistência à penicilina em estirpes de *Pneumococcus* ou a resistência à isoxazolilpenicilinas nos *Staphylococcus*. Na generalidade, a resistência em Gram-negativos envolve a interrelação de vários mecanismo de resistência associados (impermeabilidade, efluxo, etc.) (1,4,6,8,12).

#### **1.4. Beta-lactamases**

As  $\beta$ -lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico (fig.1), constituinte comum dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, por hidroxilação irreversível da ligação amida, inactivando-os (1). Estas enzimas apresentam afinidades distintas para os diferentes grupos de  $\beta$ -lactâmicos. Determinados tipos de  $\beta$ -lactamases podem ser produzidas por diferentes espécies bacterianas, mas uma espécie bacteriana também pode produzir diferentes tipos de  $\beta$ -lactamases (4). O

seu aparecimento pode estar relacionado com a pressão selectiva exercida por microrganismo do solo, produtores de  $\beta$ -lactâmicos (1,4,10,11,12). Podem ser cromossómicas e universais numa dada espécie ou podem ser mediadas por plasmídeos, oriundos de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Estes últimos, apresentam um número extraordinário de  $\beta$ -lactamases, sobretudo cromossómicas e plasmídicas (8).

A primeira  $\beta$ -lactamase plasmídica isolada de Gram-negativos – TEM-1 – foi descoberta em 1960. Esta foi encontrada numa estirpe de *E. coli*, isolada de uma amostra de sangue de uma doente Grega chamada Temoniera e daí a designação de TEM (1).

Através da intervenção de plasmídeos e transposões, as enzimas do tipo TEM multiplicaram-se e difundiram-se, a nível mundial, em diferentes espécies das famílias das *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Haemophilus* e *Neisseriae* (1,10).

A  $\beta$ -lactamase plasmídica, SHV-1, por sua vez, pode ser encontrada frequentemente em estirpes de *K. pneumoniae*, nas quais se encontra codificada em cromossomas, sendo em estirpes de *E. coli* mediada por plasmídeos (11).

#### **1.4.1. Classificação**

Em virtude do elevado número de  $\beta$ -lactamases que foram surgindo e da sua designação não se encontrar sistematizada, uma vez que era efectuada segundo características pouco homogéneas, isto é, com base no nome do paciente de onde foram isoladas (TEM), com a afinidade específica para um dado substrato (CTX, CAZ), de acordo com as suas propriedades bioquímicas, etc., várias classificações ocorreram ao longo dos anos. As primeiras foram efectuadas por Jack, Richmond e Sykes (Quadro I), entre 1970 e 1973, tendo em conta o tipo de substrato e o comportamento em relação aos inibidores (1,13,14).

Em 1976, nova classificação, estudando o ponto isoeléctrico (pI) das  $\beta$ -lactamases, foi proposta por Sykes e Matthew (1).

**Quadro I** – Classificação das  $\beta$ -lactamases segundo Richmond e Sykes

| Classe | $\beta$ – Lactamases   |
|--------|--|
| I      | Cromossômicas (cefalosporinases), inibidas pela cloxacilina e carbenicilina    |
| II     | Cromossômicas (penicilinases), inibidas pela cloxacilina                       |
| III    | Plasmídicas (TEM-1, TEM-2, etc.), inibidas pelo ácido clavulânico              |
| IV     | Cromossômicas, não inibidas pela cloxacilina                                   |
| V      | Plasmídicas (penicilinases) de largo espectro, inibidas pelo ácido clavulânico |

Adaptado de Sousa JC. Manual de Antibióticos Antibacterianos, p. 128, 2005.

Ambler, em 1980 (15), propôs uma nova sistematização agrupando as  $\beta$ -lactamases em classes com base na sequência dos aminoácidos das moléculas das  $\beta$ -lactamases. Nesta classificação, as serino- $\beta$ -lactamases, as metalo- $\beta$ -lactamases, as  $\beta$ -lactamases cromossômicas e as oxacilinases fazem parte das Classes A, B, C e D, respectivamente (quadro II).

**Quadro II** – Agrupamentos das  $\beta$ -lactamases segundo Ambler

| Localização                        | Classe A   | Classe B                      | Classe C            | Classe D  |
|------------------------------------|--|-------------------------------|---------------------|---|
| <b>Cromossoma</b>                  | SHV -1<br>( <i>k. pneumoniae</i> )<br><i>P. vulgaris</i><br><i>C. diversus</i><br><i>Bacteroides</i> | Carbapenemases <sup>(1)</sup> | AmpC <sup>(2)</sup> | OXA – 1<br>OXA – 2<br>PSE – 2<br>OXA – 10<br>OXA – 23 |
| <b>Plasmídeos,<br/>Transposões</b> | Penicilinases<br>Estafilocócicas<br>TEMs<br>SHVs<br>PSE-1  | IMP-1 (...)                   | AmpC <sup>(3)</sup> |   |

(1) em *S. maltophilia*, *B. cepacia* e *E. faecium*; (2) em *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *C. freundii*, *M. morgani*;

(3) FOX-1, LAT-1, MIR-1, MOX-1; Adaptado de Sousa JC. Manual de Antibióticos Antibacterianos, p. 128, 2005.

Mais recentemente, na década de 90, Bush, Jacoby e Medeiros (16), propuseram uma classificação que relacionava o tipo de substrato e de inibidor com a sua estrutura molecular (quadros III e IV).

### Quadro III – Grandes grupos das $\beta$ -lactamases segundo Bush

|         |   |
|---------|---|
| Grupo 1 | Cefalosporinas cromossómicas de bacilos de Gram-negativos, resistentes ao ácido clavulânico. Classe C de Ambler.                    |
| Grupo 2 | $\beta$ -lactamases inibidas pelo ácido clavulânico. Classes moleculares A e D.   |
| Grupo 3 | Metaloenzimas, capazes de hidrolisar os carbapenemos, resistentes ao ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Classe B de Ambler. |
| Grupo 4 | Penicilinas resistentes ao ácido clavulânico.   |

Adaptado de Sousa JC. Manual de Antibióticos Antibacterianos, p. 129, 2005.

### Quadro IV – Subgrupos das $\beta$ -lactamases segundo Bush

|              |   |
|--------------|---|
| Subgrupo 2a  | Penicilinas clássicas das bactérias Gram-positivas.   |
| Subgrupo 2b  | $\beta$ -lactamases TEM-1, TEM-2, SHV-1 e $\beta$ -lactamases cromossómicas de <i>Klebsiella</i> .  |
| Subgrupo 2be | Enzimas capazes de hidrolisar as penicilinas e as cefalosporinas clássicas, bem como a cefotaxima, ceftazidima e aztreonam, e inibidas pelo ácido clavulânico.  |
| Subgrupo 2bd | $\beta$ -lactamases derivadas de TEM, resistentes aos inibidores.   |
| Subgrupo 2c  | Carbenicilinas.   |
| Subgrupo 2d  | Oxacilinas que inactivam a cloxacilina.   |
| Subgrupo 2e  | Cefalosporinas cromossómicas, inibidas por baixas concentrações de ácido clavulânico e as cefalosporinas plasmídicas que hidrolisam a cefotaxima, apresentando fraca actividade hidrolítica face à penicilina e sensíveis ao ácido clavulânico. |
| Subgrupo 2f  | Carbapenemas (excepto as metaloenzimas).  |
| Subgrupo 3a  | Enzimas que hidrolisam as penicilinas. Hidrolisam rapidamente o imipenem e as cefalosporinas.   |
| Subgrupo 3b  | Enzimas das espécies de <i>Aeromonas</i> , consideradas as verdadeiras carbapenemas (Livermore, 1993, Rasmussen e Bush, 1997, Bush, 1998). Com elevada capacidade para hidrolisar os carbapenemos.  |
| Subgrupo 3c  | Metalo- $\beta$ -lactamase de <i>Legionella gormanii</i> . Elevada capacidade para hidrolisar as cefalosporinas e a ampicilina.   |

Adaptado de Sousa JC. Manual de Antibióticos Antibacterianos, p. 129, 2005.

Antes da década de 60, os poucos  $\beta$ -lactâmicos em uso apresentavam acção particularmente contra microrganismos Gram-positivos. Com o desenvolvimento da ampicilina, como primeiro  $\beta$ -lactâmico de espectro mais alargado, deu-se o alastramento das  $\beta$ -lactamases plasmídicas. No esforço de combater estas enzimas, foram desenvolvidos novos compostos químicos estáveis à sua acção durante os anos 70 e 80 (1,4). Entre estes encontravam-se as aminopenicilinas associadas a inibidores, as oximinocefalosporinas ou cefalosporinas de terceira geração (cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona), as cefamicinas e os carbapenemos. No entanto, provavelmente devido à pressão selectiva resultante do uso abusivo das oximinocefalosporinas no tratamento de infecções graves por

bactérias Gram-negativas, novas  $\beta$ -lactamases surgiram. Por serem codificadas por genes localizados em plasmídeos, permitindo a sua fácil disseminação, e devido ao seu largo espectro de actividade contra as oximinocefalosporinas, estas enzimas foram designadas como  $\beta$ -lactamases de espectro expandido (ESBLs) (4,8,10,11,12).

#### **1.4.1. Outras $\beta$ -lactamases**

##### **Beta-lactamases resistentes ao inibidor (IRT Beta-lactamases)**

Estas  $\beta$ -lactamases não são ESBLs, mas por vezes são tidas como tal pois derivam das enzimas clássicas TEM e SHV. Estas  $\beta$ -lactamases que resistem à inibição pelo ácido clavulânico foram descobertas nos anos 90. Por sequenciação nucleotídica concluiu-se que estas derivavam dos tipos TEM-1 e TEM-2 (17). Inicialmente foram apelidadas de IRT ( $\beta$ -lactamase TEM resistente ao inibidor). Posteriormente, procedeu-se à sua classificação numérica, e actualmente, existem numerosas IRTs. Podendo ser encontradas, principalmente, em estirpes de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *oxytoca*, *P. mirabilis* e *Citrobacter freundii*, foram detectadas pela primeira vez em França e noutros locais da Europa (18,19,20). Recentemente, foi descoberta uma enzima – TEM-50 – que apresentava substituições aminoacídicas, comuns às TEMs resistentes ao inibidor e às ESBLs. Esta enzima é resistente ao ácido clavulânico, mas também apresenta uma ligeira resistência às cefalosporinas de largo espectro, o que poderá indicar a possibilidade de um novo grupo de  $\beta$ -lactamases que apresentam características das ESBLs e das enzimas resistentes ao inibidor (21).

#### **AmpC**

A partir de finais dos anos 70, este tipo de  $\beta$ -lactamases emergiu como um dos mediadores da resistência dos bacilos Gram-negativos aos antimicrobianos. Estas enzimas apresentam-se como cefalosporinases capazes hidrolisar todos os  $\beta$ -

lactâmicos e podem ser de dois tipos: de mediação plasmídica e cromossômica ou indutíveis. Podem ser expressas por vários microrganismos, nomeadamente, *C. freundii*, *E. cloacae*, *M. morgani*, *S. marcescens*, entre outros (1,21). A sua produção é fortemente induzida por  $\beta$ -lactâmicos, tais como, a cefoxitina e pelo imipenemo, mas fracamente induzida pelas cefalosporinas de terceira e quarta gerações. Nos finais da década de 80, estes genes foram detectados em plasmídeos e foram transferidos para microrganismos que geralmente não expressavam  $\beta$ -lactamases cromossômicas, tais como estirpes de *K. pneumoniae* e *E. coli*, entre outras (1,22).

Não existem normas padronizadas para a detecção destes mecanismos de resistência. No entanto, torna-se essencial a sua detecção paralela à detecção das ESBLs, pois ambas podem coexistir e mascarar-se umas às outras (1, 8,21,22).

### **Carbapenemases**

Estas enzimas constituem uma família muito versátil de  $\beta$ -lactamases, capazes de rivalizar em termos de espectro de acção com as outras  $\beta$ -lactamases. Apesar de conhecidas como “carbapenemases”, muitas destas enzimas apresentam acção hidrolítica sobre todos os  $\beta$ -lactâmicos, e na sua maioria são resistentes aos inibidores das  $\beta$ -lactamases. As primeiras carbapenemases descritas foram isoladas de bacilos Gram-positivos. Pertencem a duas grandes famílias moleculares que se distinguem entre si pelos diferentes mecanismos de hidrólise, que apresentam. São inibidas pelo EDTA, o que as define como metalo-enzimas. Estas metalo-carbapenemases apresentam no seu centro activo pelo menos um átomo de zinco o que facilita a hidrólise de um anel  $\beta$ -lactâmico bicíclico (1, 21, 23).

Em 1980, carbapenemases apresentando serina no centro activo, emergiram entre a família das *Enterobacteriaceae*. Foram descritas como resistentes ao efeito do EDTA, mas inibidas pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam. Até aos anos 90, todas as carbapenemases podiam definir-se como  $\beta$ -lactamases

cromossomicas específicas de determinadas espécies. No entanto, a descoberta das  $\beta$ -lactamases IMP-1, ARI-1 (OXA-23) e KPC-1 em estirpes de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae*, respectivamente, alterou os padrões de disseminação das carbapenemases. Devido à rápida disseminação interespecies deste tipo de  $\beta$ -lactamases, tornou-se essencial conhecer os seus mecanismos de acção para implementar a antibioterapia mais eficaz para controlo da infecção (23).

### **1.5. Beta-lactamases de espectro expandido (ESBLs)**

O primeiro microrganismo detentor de uma ESBL foi isolado em 1983, em Frankfurt, na Alemanha. Em 1985 e no início da década de 90, ocorreu um primeiro surto hospitalar em França e depois nos EUA, respectivamente. Actualmente, comprovando a sua capacidade de adaptação, o número de variantes de ESBLs identificadas tem vindo a aumentar significativamente por todo o mundo (1,11,21).

As ESBLs, na sua maioria, derivaram de mutações pontuais ocorridas no centro activo das  $\beta$ -lactamases clássicas TEM (TEM-1 e TEM-2) e SHV (SHV-1) e actualmente estão descritas mais de 150 do tipo TEM e mais de 50 do tipo SHV (1). Estas têm sido isoladas com mais frequência de estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* mas já foram encontradas entre outros géneros de *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Salmonella* spp. e na espécie *P. aeruginosa* (1).

Tendo em conta a classificação de Bush, Jacoby e Medeiros (16) (quadro IV), as ESBLs pertencem ao grupo 2be e podem definir-se como capazes de hidrolisar as penicilinas, as oximinocefalosporinas e os monobactams, como o aztreonam. São susceptíveis às cefamicinas e aos carbapenemos e a sua acção hidrolítica é inibida, mais ou menos, pelos inibidores de  $\beta$ -lactamases, nomeadamente, o ácido clavulânico, o tazobactam e o sulbactam (1,4,10,21). De acordo com a sua origem estas enzimas podem agrupar-se em dez grupos diferentes, tal como se pode ver na figura V.

**Quadro V** – Diferentes grupos de  $\beta$ -lactamases de espectro expandido

| ESBL  | Beta-lactamase (origem)  | País          | Espécie                               |
|-------|--------------------------|---------------|---------------------------------------|
| TEM   | TEM-1, TEM-2             | França        | Enterobacteriaceae                    |
| SHV   | SHV-1                    | Alemanha      | <i>P.aeruginosa</i>                   |
| CTX-M | KLUA                     | Alemanha      | <i>E.coli</i> , <i>Salmonella spp</i> |
| OXA   | OXA-10                   | Turquia       | <i>P.aeruginosa</i>                   |
| PER   |                          | França        | <i>P.aeruginosa</i>                   |
| VEB   | PER                      | Vietname      | <i>E.coli</i>                         |
| TLA   | CME-1                    | México        | <i>E.coli</i>                         |
| GES   |                          | África do Sul | <i>K.pneumoniae</i>                   |
| BES   | <i>Y. enterocolitica</i> | Brasil        | <i>S.marcescens</i>                   |
| SFO   | AmpA <i>S. fonticola</i> | Japão         | <i>E.cloacae</i>                      |

Adaptado de Sousa JC. Manual de Antibióticos Antibacterianos, p. 133, 2005.

## TEM

Entre as bactérias Gram-negativas a TEM-1, que confere resistência às penicilinas e as cefalosporinas de primeira geração, é a  $\beta$ -lactamase mais frequentemente encontrada sendo mais de 90% das resistências, em estirpes de *E. coli*, devidas à produção de TEM-1. A substituição de um único aminoácido na  $\beta$ -lactamase TEM-1 deu origem a um novo tipo – TEM-2. Esta modificação foi acompanhada por uma alteração do ponto isoelétrico de 5,4 para 5,6, sem alteração do substrato. A TEM-3, originalmente descoberta em 1989, foi por sua vez, a primeira  $\beta$ -lactamase do tipo TEM que enunciou o fenótipo ESBL (21).

Actualmente existem aproximadamente 90 mutações da TEM original e algumas destas  $\beta$ -lactamases são enzimas resistentes ao inibidor (IRT), mas a sua maioria são ESBLs (17,18,19). As substituições de aminoácidos ocorrem entre as enzimas TEM em número limitado de posições e as combinações destas mudanças de aminoácidos resultam em varias alterações na hidrólise de oximinocefalosporinas específicas (ex.: cefotaxima e ceftazidima), ou alterações dos pontos isoelétricos (quadro VI) (1,11).

Segundo estudos realizados, as ESBLs do tipo TEM, que ocorrem naturalmente, resultam mais das oscilações da pressão selectiva dos vários  $\beta$ -lactâmicos numa dada instituição do que da acção de um único agente (11).



**Quadro VI – Características das  $\beta$ -lactamases do tipo TEM**

| pI <sup>1</sup> | ENZIMAS                                   | TIPO           | DE   | ENZIMA           |
|-----------------|---|----------------|------|------------------|
|                 |   | Largo Espectro | ESBL | IRT <sup>2</sup> |
| 5.2             | TEM-12, -55, -57, -58                     |                |      |                  |
| 5.2             | -30, -31, -35, -36, -37, -38, -41, -45,   |                |      |                  |
| 5.2             | -51, -73, -74                             |                |      |                  |
| 5.3             | TEM-25                                    |                |      |                  |
| 5.4             | TEM-1                                     |                |      |                  |
| 5.4             | TEM-7, -19, -20, -65                      |                |      |                  |
| 5.4             | TEM-32, -33, -34, -39, -40, -44           |                |      |                  |
| 5.42            | TEM-29                                    |                |      |                  |
| 5.55            | TEM-5, -17                                |                |      |                  |
| 5.59            | TEM-9                                     |                |      |                  |
| 5.6             | TEM-2                                     |                |      |                  |
| 5.6             | TEM-10, -11, -13, -26, -63                |                |      |                  |
| 5.6             | TEM-50                                    |                |      |                  |
| 5.6             | TEM-59                                    |                |      |                  |
| 5.7             | TEM-68                                    |                |      |                  |
| 5.8             | TEM-42                                    |                |      |                  |
| 5.9             | TEM-4, -6, -8, -27, -72                   |                |      |                  |
| 6.0             | TEM-15, -47, -48, -49, -52, -66, -92      |                |      |                  |
| 6.1             | TEM-28, -43                               |                |      |                  |
| 6.3             | TEM-3, -16, -21, -22                      |                |      |                  |
| 6.4             | TEM-56, -60                               |                |      |                  |
| 6.5             | TEM-24, -46, -61                          |                |      |                  |
| # <sup>3</sup>  | TEM-14, -53, -54                          |                |      |                  |
|                 | TEM-76, -77, -78, -79, -81, -82, -83, -84 |                |      |                  |

Adaptado de Bradford P. Extended-spectrum  $\beta$  – lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Vol.14, p. 933-51.2001.

(1) Ponto isoelétrico ou pI é o valor de pH onde uma molécula, por exemplo, um aminoácido ou uma proteína, apresenta carga eléctrica líquida igual a zero. O pI é o pH no qual há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos agrupamentos iónicos de um aminoácido ou de uma proteína.

(2) Beta-lactamase TEM resistente ao inibidor

(3) Não determinado

Apesar da maior frequência de  $\beta$ -lactamases TEM se verificar em estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae*, também são encontradas, cada vez com maior frequência, noutras espécies de bactérias Gram negativas (1,4,10,12).

## SHV

Esta  $\beta$ -lactamase é mais frequentemente isolada de estirpes de *K. pneumoniae* e é responsável, nestas espécies, por mais de 20% das resistências à ampicilina

mediadas por plasmídeos (11,21). Em várias estirpes de *K. pneumoniae*, o gene  $bla_{SHV-1}$ , encontra-se integrado no cromossoma bacteriano. Apesar de ter sido posta a hipótese de que o gene que codifica para SHV-1 poder existir como fazendo parte de um transposição, esta nunca foi demonstrada (21).

Ao contrário dos tipos TEM, há relativamente poucas descendências das SHV-1 (quadro VII).

Para além disso, as mudanças observadas no gene  $bla_{SHV}$  ocorrem em menos posições dentro do gene estrutural. A maioria destas variantes que possuem um fenótipo ESBL é caracterizada pela substituição de uma serina por uma glicina, na posição 238. Por outro lado, as variantes relacionadas com as  $\beta$ -lactamases SHV-5, também apresentam uma substituição da lisina por glutamato, na posição 240. O resíduo de serina na posição 238, é fundamental para a hidrólise eficaz da ceftazidima, e o resíduo de lisina é vital para a hidrólise eficiente da cefotaxima (21).

**Quadro VII – Características das  $\beta$ -lactamases do tipo SHV**

| pI  | Enzimas                         | TIPO           | DE   | ENZIMA |
|-----|---------------------------------|----------------|------|--------|
|     |                                 | Largo Espectro | ESBL | IRT    |
| 7.0 | OHIO-1, LEN-1                   |                |      |        |
| 7.0 | SHV-3, SHV-14                   |                |      |        |
| 7.5 | SHV-24                          |                |      |        |
| 7.6 | SHV-1, SHV-11                   |                |      |        |
| 7.6 | SHV-2, -2 <sup>a</sup> , -6, -8 |                |      |        |
| 7.6 | SHV-13, -19, -20                |                |      |        |
| 7.6 | SHV-21, -22                     |                |      |        |
| 7.8 | SHV-4, -7, -18                  |                |      |        |
| 8.2 | SHV-5, -9, -12                  |                |      |        |
| 8.2 | SHV-10                          |                |      |        |

Adaptado de Bradford P. Extended-spectrum  $\beta$  – lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Vol.14, p. 933-51.2001.

Actualmente, a maior parte dos mutantes SHV, são ESBLs (quadro VII). No entanto, o tipo SHV-10 apresenta um fenótipo IRT. Segundo estudos realizados, esta enzima parece derivar de SHV-5 e contém uma substituição de um aminoácido adicional, na posição 130, de glicina pela serina (11,21).

Como já foi dito anteriormente, a maioria das ESBL do tipo SHV encontram-se em estirpes de *K. pneumoniae*, mas também foram encontradas em *Citrobacter diversus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (10,12,24).

## **CTX-M**

Esta família de ESBLs plasmídicas, CTX-M, é mais frequente entre isolados de *Salmonella entérica* e *E. coli*, mas também, em espécies de *Enterobacteriaceae* (quadro VIII) e apresenta preferência hidrolítica para a cefotaxima. Estas enzimas apresentam só 40% de similaridade com as  $\beta$ -lactamases TEM e SHV (11,21).

Previamente, as cefalosporinases de classe A cromossómicas eram as enzimas mais relacionadas com esta família (73 a 77% de homologia), e encontravam-se entre estirpes de *K. oxytoca*, *C. diversus*, *Proteus vulgaris* e *Serratia fonticola* (21). No entanto, segundo estudos realizados, existe um alto grau de homologia entre a enzima cromossómica AmpC de *Kluyvera ascorbata* (Klu-1 e klu-2) e as enzimas CTX-M, sugerindo que a última terá surgido desta espécie. Um estudo filogenético da família das  $\beta$ -lactamases CTX-M, revelou quatro tipos maiores: o tipo CTX-M-1 (incluindo, CTX-M-1 e CTX-M-3), o tipo CTX-M-2 (incluindo, CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, Toho-1 e Toho-2 e CTX-M-8 (11,21).

Estudos realizados revelaram as  $\beta$ -lactamases CTX-M hidrolisam melhor a cefalotina do que a benzilpenicilina, e preferencialmente a cefotaxima em detrimento da ceftazidima, que apesar de sofrer alguma hidrólise, por estas enzimas, esta não é suficiente para fornecer resistência clínica aos microrganismos onde residem. Foi sugerido, inclusive, que o resíduo de serina na posição 237, e que está presente em todas as enzimas CTX-M, tem um papel fundamental na actividade de espectro alargado das  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M (21).

Para além da eficaz hidrólise da cefotaxima, outra característica destas enzimas relaciona-se com a sua melhor inibição pelo tazobactam. Estirpes expressando  $\beta$ -lactamases CTX-M foram isoladas em todo o mundo, mas estão mais frequentemente associadas a episódios no leste da Europa, na América do Sul e no Japão (21,26).

Alguns estudos focam casos do oeste da Europa, mas estes vieram a revelar pertencer a doentes emigrantes provenientes do leste da Europa (21,28). No entanto, Sabeté *et al.* (27) concluíram através de um estudo realizado em Espanha, que 23 amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae* expressavam a  $\beta$ -lactamase CTX-M-9, sugerindo este facto a existência de focos endémicos desta enzima no oeste da Europa.

**Quadro VIII – Características das ESBLs do tipo CTX-M**

| Beta-lactamase | Desig. alternativa | pl <sup>1</sup> | País de origem   | Espécie bacteriana  |
|----------------|--------------------|-----------------|------------------|---|
| CTM-M-1        | MEN-1              | 8.9             | Alemanha, Itália | <i>E. coli</i>  |
| CTX-M-2        |                    | 7.9             | Argentina        | <i>S. enterica</i>  |
| CTXM-3         |                    | 8.4             | Polónia          | <i>C. freundii</i> , <i>E. coli</i>   |
| CTX-M-4        |                    | 8.4             | Rússia           | <i>S. enterica</i>  |
| CTX-M-5        | CTX-M-3            | 8.8             | Letónia          | <i>S. enterica</i>  |
| CTX-M-6        |                    | 8.4             | Grécia           | <i>S. enterica</i>  |
| CTX-M-7        | CTX-M-5            | 8.4             | Grécia           | <i>S. enterica</i>  |
| CTX-M-8        |                    | 7.6             | Brasil           | <i>P. mirabilis</i> ,<br><i>E. cloacae</i> ,<br><i>E. aerogenes</i> ,<br><i>C. amalonaticus</i> |
| CTX-M-9        |                    | 8.0             | Espanha          | <i>E. coli</i>  |
| CTX-M-10       |                    | 8.1             | Espanha          | <i>E. coli</i>  |
| Toho-1         |                    | 7.8             | Japão            | <i>E. coli</i>  |
| Toho-2         |                    | 7.7             | Japão            | <i>E. coli</i>  |

Adaptado de Bradford P. Extended-spectrum  $\beta$  – lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Vol.14, p. 933-51.2001.

(1) ponto isoeléctrico

Entretanto, a  $\beta$ -lactamase CTX-M-3, numa estirpe de *Enterobacter cloacae* foi recentemente isolada em França, e confirmado que, na maior parte dos laboratórios franceses, a enzima CTX-M é a ESBL mais isolada (29).

## OXA

A família constituída pelas enzimas do tipo OXA encontra-se em franco desenvolvimento e difere dos tipos SHV e TEM, pois é característica da classe D de Ambler e do grupo 2d, de Bush. São resistentes à ampicilina e à cefalotina, possuem forte acção hidrolítica contra a oxacilina e a cloxacilina e são muito sensíveis ao ácido clavulânico. Para caracterizar este grupo de  $\beta$ -lactamases que

apresenta um perfil hidrolítico específico, a família OXA foi originalmente criada mais como um fenótipo do que um grupo genótipo (21). Enquanto a maioria das ESBLs foram encontradas em estirpes de *E. coli*, *K. pneumoniae* e outras *Enterobacteriaceae*, as ESBLs do tipo OXA foram, principalmente, isoladas em *P. aeruginosa*, tal como se pode ver no quadro IX (1,11,21).

Este tipo de ESBLs, deriva essencialmente de mutações do tipo OXA – 10 e a estirpes de *E. coli* confere-lhes pouca resistência às oximinocefalosporinas mas, no entanto, o contrário acontece em isolados de *P. aeruginosa* (31).

Por sua vez, o tipo OXA-17 concede resistência à cefotaxima e à ceftriaxona, mas não apresenta o mesmo efeito sobre a ceftazidima (32). Com a exceção da OXA-18, as enzimas OXA clássicas, são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico (33).

**Quadro IX – Características das ESBLs do tipo OXA**

| Beta-lactamase | Derivação     | pl <sup>1</sup> | País de origem | Espécie bacteriana   |
|----------------|---------------|-----------------|----------------|----------------------|
| OXA-11         | OXA-10        | 6.4             | Turquia        | <i>P. aeruginosa</i> |
| OXA-13         | OXA-10        | 8.0             | França         | <i>P. aeruginosa</i> |
| OXA-14         | OXA-10        | 6.2             | Turquia        | <i>P. aeruginosa</i> |
| OXA-15         | OXA-2         | 8.7, 8.9        | Turquia        | <i>P. aeruginosa</i> |
| OXA-16         | OXA-10        | 6.2             | Turquia        | <i>P. aeruginosa</i> |
| OXA-17         | OXA-10        | 6.1             | Turquia        | <i>P. aeruginosa</i> |
| OXA-18         | OXA-9, OXA-12 | 5.5             | França         | <i>P. aeruginosa</i> |
| OXA-19         | OXA-10        | 7.6             | França         | <i>P. aeruginosa</i> |
| OXA-28         | OXA-10        | 7.6             | França         | <i>P. aeruginosa</i> |

Adaptado de Bradford P. Extended-spectrum  $\beta$  – lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Vol.14, p. 933-51.2001

O tipo OXA-21 foi isolado de estirpes de *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), mas permanece pouco claro se esta é uma ESBL ou se uma enzima de espectro original (34).

Para além das ESBLs do tipo OXA, foram descritas algumas derivantes OXA, que não são ESBLs. A maior parte dos novos membros desta família foram isolados em bactérias na Turquia e em França (35,36,37).

### 1.5.1. Outros tipos de ESBLs

Enquanto a maioria das ESBLs deriva das  $\beta$ -lactamases TEM ou SHV, e outras podem ser agrupadas numa das novas famílias de ESBLs, algumas foram descritas e caracterizadas, uma vez que não podiam pertencer a nenhuma das famílias já conhecidas (quadro X).

A  $\beta$ -lactamase PER-1 foi descoberta em estirpes de *P. aeruginosa*, isoladas de doentes turcos e, posteriormente foi também isolada em estirpes de *S. enterica* serovar *Typhimurium* e *A. baumannii* (38,39). Esta  $\beta$ -lactamase encontra-se disseminada pela Turquia e é encontrada em mais de 60% de estirpes de *A. baumannii*, resistentes à ceftazidima. Uma PER-1 plasmídica comum foi encontrada em múltiplos isolados nosocomiais de *S. enterica* serovar *Typhimurium*, sugerindo que as estirpes adquirem resistência plasmídica, em ambiente hospitalar (40,41).

Uma enzima relacionada, PER-2, apresentando 86% de homologia com a PER-1, foi posteriormente isolada entre estirpes de *S. enterica* serovar *Typhimurium*, na Argentina. Sendo de realçar que enquanto a PER-1 foi quase exclusivamente isolada na Turquia, a PER-2 foi praticamente só isolada na América do Sul (42).

Uma outra enzima de certo modo relacionada com PER-1 é a  $\beta$ -lactamase VEB-1. Foi pela primeira vez isolada de uma estirpe de *E. coli* de um doente vietnamita, mas mais tarde também encontrada numa estirpe de *P. aeruginosa*, na Tailândia (21).

Por seu lado, a  $\beta$ -lactamase CME-1 foi isolada do *Chryseobacterium meningosepticum*, e a quarta enzima deste grupo, a TLA-1, foi identificada numa estirpe de *E. coli*, no México (21,43). Estas enzimas estão relacionadas entre si, mas só apresentam 40 a 50% de homologia, e todas conferem resistência às oximinocefalosporinas, especialmente à ceftazidima. Alguns estudos confirmaram a sua homologia às cefalosporinases cromossómicas em *Bacteroides* spp. e que algumas são originárias deste (21). Um outro tipo pouco habitual, SFO-1, altamente relacionado com a  $\beta$ -lactamase de classe A de *Serratia fonticola*, é uma  $\beta$ -lactamase transmissível que pode ser induzida a produzir níveis elevados de  $\beta$ -lactamases, pelo imipenemo. Os plasmídeos que transportam o gene que codifica

a  $\beta$ -lactamase SFO-1, também transportam o gene regulatório *ampR*, que é fundamental na indução das  $\beta$ -lactamases da classe C. No entanto, ao contrário destas, a SFO-1 não consegue hidrolisar as cefamicinas e é francamente inibida pelo ácido clavulânico (44).

**Quadro X – Características das novas ESBLs**

| $\beta$ - lactamase | Proximidade                 | pI <sup>(6)</sup> | Substrato preferido          | País de origem     | Espécie bacteriana                |
|---------------------|-----------------------------|-------------------|------------------------------|--------------------|-----------------------------------|
| BES-1               | Penicilinase <sup>(1)</sup> | 7.5               | CTX, CAZ, ATM <sup>(4)</sup> | Brasil             | <i>S. marcescens</i>              |
| FEC-1               |                             | 8.2               | CTX                          | Japão              | <i>E. coli</i>                    |
| GES-1               | Penicilinase <sup>(2)</sup> | 5.8               | CAZ                          | Guiana Francesa    | <i>K. pneumoniae</i>              |
| CME-1               | VEB-1                       | > 9.0             | CAZ                          | Estirpe referencia | <i>C. meningosepticum</i>         |
| PER-1               | PER-2                       | 5.4               | CAZ                          | França             | <i>P. aeruginosa</i>              |
| PER-2               | PER-1                       | 5.4               | CAZ                          | Argentina          | <i>S. enterica</i> <sup>(5)</sup> |
| SFO-1               | AmpA <sup>(3)</sup>         | 7.3               | CTX                          | Japão              | <i>E. cloacae</i>                 |
| TLA-1               | CME-1                       | 9.0               | CAZ, CTX, ATM                | México             | <i>E. coli</i>                    |
| VEB-1               | PER-1, PER-2                | 5.35              | CAZ, ATM                     | Vietname           | <i>E. coli</i>                    |

Adaptado de Bradford P. Extended-spectrum  $\beta$  – lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Vol.14, p. 933-51.2001

(1) de *Yersinia enterocolitica*; (2) do *P. mirabilis*; (3) da *S. fonticola*; (4) CTX – cefotaxima, CAZ – Cefotaxidima, ATM – aztreonam; (5) serovar Typhimurium; (6) Ponto isoelétrico

A enzima GES-1, é outra ESBL pouco comum, que não estando relacionada com as outras  $\beta$ -lactamases plasmídicas, apresenta 36% de homologia a uma carbanecilinase do *P. mirabilis* (45).

Finalmente, a bibliografia e estudos realizados ao longo dos últimos anos, confirmam que as famílias TEM e SHV estão intimamente relacionadas, e que todas as ESBLs da classe A, se encontram muito mais próximas e relacionadas do que qualquer uma das enzimas OXA, da classe D (1,21).

## 1.6. Epidemiologia

Actualmente as ESBLs são um dos principais problemas com que os doentes em tratamento hospitalar se debatem. Este fenómeno teve início na Europa muito provavelmente devido ao pioneirismo no uso clínico de  $\beta$ -lactâmicos de largo espectro. No entanto, não demorou muito tempo até este fenómeno se estender aos Estados Unidos e à Ásia (21). A prevalência destas enzimas pode variar entre países e entre instituições. Mas devido aos diferentes métodos de detecção de microrganismos produtores de ESBLs praticados pelos diferentes países e instituições, torna-se extremamente difícil aceder aos valores reais da sua incidência e prevalência, a nível mundial. Encontra-se, inclusive, documentado que em certos hospitais a implementação de métodos eficazes de detecção de ESBLs, não é praticada devido aos custos elevados que acarreta às instituições (12). No entanto, numerosos estudos realizados a nível mundial comprovam o aumento significativo destes microrganismos por todo o mundo (1,4,8,10,21).

Na Europa, apesar dos primeiros casos terem sido descritos na Alemanha e na Inglaterra, a sua maioria ocorreu em França. A proliferação de ESBLs, em França revelou-se grave, pois no início dos anos 90, 25 a 35% das estirpes de *K. pneumoniae*, nosocomialmente adquiridas, eram produtoras de ESBLs (10,21). No entanto, pela acção eficaz das comissões de controlo de infecção hospitalares, as taxas de incidência inclinam-se a baixar. Actualmente existem descritos casos de microrganismos produtores de ESBLs por todo o continente europeu, verificando-se diferenças geográficas significativas na ocorrência de ESBLs, nos vários países. Por outro lado, em cada país, ocorrência de hospital para hospital, também pode ser variável. Entre 1997 e 1998, num estudo de 433 estirpes provenientes de 24 unidades de cuidados intensivos (UCI), do sul e do oeste europeus, 25% de *Klebsiellae* possuíam ESBLs (46). Um estudo idêntico foi realizado pelo mesmo grupo em 1994 e verificou-se que a percentagem de *Klebsiellae* não aumentou significativamente, mas a taxa de UCIs “infectadas” subiu dos 74% a 90% (51).

Um outro importante estudo, englobando mais de 100 UCIs de toda a Europa, concluiu que a prevalência de *Klebsiellae* produtoras de ESBLs foi desde os 3%



na Suécia, aos 34%, em Portugal (21). Apesar da problemática das ESBLs não ser claramente conhecida, em Portugal, um estudo realizado em 2004, revelou que a prevalência de estirpes produtoras de ESBLs era de 24% e 6% para estirpes de *K. pneumoniae* e de *E. coli*, respectivamente (48). Noutro estudo, foi pela primeira vez reportada a ESBL CTX-M-15 no Hospital de Santa Maria, em Lisboa, numa estirpe de *K. pneumoniae*, e mais recentemente, nos Hospitais da Universidade de Coimbra, uma ESBL do mesmo tipo mas num isolado de *E. coli* (26,49,50).

Um estudo sobre *Klebsiella* spp. oriundas de oito UCIs, de oito hospitais turcos, concluiu que 58% das 193 estirpes isoladas, eram produtoras de ESBLs (21).

Em 1989, Quinn e colegas referiram infecções por *K. pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamases TEM-10, nos Estados Unidos (51). Outros estudos, mais recentes, revelaram importantes infecções principalmente devidas a ESBLs do tipo TEM e SHV (52,53). Um estudo sobre a prevalência de microrganismos produtores de ESBLs examinou a resistência destes, às cefalosporinas de terceira geração (onde a resistência era considerada para uma CIM de  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$  para a ceftazidima; ou  $\geq 64$   $\mu\text{g/ml}$  para a cefotaxima e ceftriaxona), e como muitos destes microrganismos apresentam CIMs, para as cefalosporinas de terceira geração, entre os 2 e os 16  $\mu\text{g/ml}$ , verificou-se que a taxa de prevalência, nos Estados Unidos, estava sobrestimada (21). O *National Nosocomial Infection Surveillance* (NNIS), revelou que, num período de 4 anos, 6,1% das 101 estirpes de *K. pneumoniae* isoladas de 110 UCIs eram resistentes às cefalosporinas de terceira geração, e que pelo menos 10% das UCIs, as taxas de resistência excederam os 25% (54).

Trinta a 60% das estirpes *Klebsiellae* isoladas em UCIs brasileiras, venezuelanas e colombianas revelaram ser ESBLs, e estudos realizados confirmam a existência deste tipo de microrganismos, na América Central e nas Ilhas das Caraíbas (21).

Em 1988 e 1989, estirpes de *K. pneumoniae* isoladas de doentes do Chile e da Argentina, foram descritas como ESBLs SHV-2 e SHV-5. No entanto, já em 1982 se falava numa estirpe estudada que revelou ser uma produtora de ESBL SHV-5 (55,56).

Por outro lado, em 1989, ocorreu um surto de multiresistências entre estirpes de *S. enterica* serovar Typhimurium em 12 das 14 províncias Argentinas. Esta ESBL que não revelou ser do tipo SHV ou TEM, acabou por ser identificada e nomeada como CTX-M-2 e propagou-se por numerosas zonas da América do Sul. Também outros tipos de enzimas CTX-M foram identificadas no Brasil, mas ESBLs do tipo TEM raramente foram referidas (21).

Recentemente, foram descobertas as ESBLs GES-1 e BES-1, a primeira, na Guiana Francesa, proveniente de uma criança anteriormente hospitalizada, e a segunda, isolada de uma estirpe produtora de ESBLs de um doente hospitalizado no Rio de Janeiro (56).

Existe notícia de vários casos de infecções por *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs, na África do Sul (59). Determinou-se que 36.1% de estirpes deste microrganismo, isolado em hospitais sul-africanos, entre 1998 e 1999, revelaram ser produtoras de ESBLs. Também em Israel, Arábia Saudita e em vários países do norte africano foram encontradas ESBLs (58). No Kenya e na Nigéria, foram identificadas infecções por estirpes de *K. pneumoniae* resistentes às cefalosporinas de terceira geração, sem informação acerca da produção de ESBLs. A nova enzima CTX-M-12 foi encontrada no Kenya, e a na África do Sul, os tipos predominantes revelaram ser TEM e SHV (SHV-2 e SHV-5). Igualmente na África do Sul, encontra-se descrita uma estirpe de *P. aeruginosa* que expressa a ESBL GES-2, e que foi responsável por um surto de infecções nosocomiais graves (21).

A primeira ESBL detectada na Austrália foi isolada de um conjunto de estirpes de *Klebsiella* spp. resistentes à gentamicina, num estudo realizado em Perth, entre 1986 e 1988, e foram caracterizadas como sendo derivadas do tipo SHV. Ao longo do tempo, outras infecções provocadas por microrganismos produtores de ESBLs foram reportadas por toda a Austrália, em crianças e adultos (21).

Em 1988, estirpes de *K. pneumoniae* provenientes da China revelaram ser ESBLs SHV-2, e posteriormente, em 1994, novos casos de infecções por microrganismos deste tipo, foram estudadas e declaradas. Estudos realizados entre 1998 e 1999, revelaram que 30,7% e 24,5% de estirpes de *K. pneumoniae* e *E. coli*, respectivamente, eram produtoras de ESBLs. Também noutras zonas da Ásia,

foram isoladas e caracterizadas estirpes destes microrganismos, que revelaram percentagens idênticas. É de salientar que no Japão a taxa de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs era só de 5%, em comparação com os 20 a 50% apresentados na Ásia. No entanto é de referir a existência de claras diferenças entre hospitais, ou seja, estudos revelaram que um quarto de todas as estirpes de *K. pneumoniae* isoladas, num hospital no Japão, era produtora de ESBLs (61,62,63).

Inicialmente, as ESBLs dos tipos SHV-2, SHV-5 e SHV-12, eram os dominantes no Japão. No entanto, o aparecimento de ESBLs CTX-M, na Índia e na China, e de estudos referindo casos de infecções por microrganismos produtores do tipo CTX-M no Japão, na Coreia e em Taiwan, levantou a suspeita de que este realmente seria o tipo de ESBLs dominante, na Ásia (61).

Finalmente, é de referir que os tipos Toho-1 e Toho-2, homólogos das  $\beta$ -lactamases cromossómicas de *K. pneumoniae*, foram detectados no Japão, e que a nova ESBL, VEB-1, foi descrita na Tailândia e no Vietname (64).

## 1.7. Factores de risco

Não existe unanimidade quanto aos factores de risco de colonização e infecção por microrganismos produtores de ESBLs. Apesar disso, algumas generalizações podem fazer-se (8).

Indivíduos em risco de adquirir colonização ou infecção por microrganismos produtores de ESBLs, exibem habitualmente quadros clínicos graves com internamentos prolongados e sujeitos à presença de dispositivos médicos invasivos (cateteres urinários, tubos endotraqueais, cateteres venosos), por um período prolongado. Para além destes, a presença de tubos nasogástricos, tubos de gastrostomia ou jejunostomia, administração da nutrição parenteral, cirurgia recente, úlceras de decúbito e deficitário estado de nutrição também são tidos em conta (8,10).

O abuso de antibióticos é também um factor de risco de aquisição de microrganismos produtores de ESBLs e vários estudos provaram a relação entre o uso de cefalosporinas de terceira geração e a aquisição de uma estirpe produtora de ESBLs (8,10,11,21).

## 1.8. Infecções nosocomiais *versus* infecções da comunidade

Os membros da família *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs têm vindo a ser isolados com maior frequência de doentes hospitalizados, no entanto, também estão descritos casos ocorridos na comunidade. Tais isolados podem sobrevir de forma esporádica, sem qualquer relação epidemiológica, ou provocar surtos nosocomiais (4,10,21).

Na maioria das vezes, os surtos nosocomiais resultam do uso de utensílios invasivos, tais como, tubos endotraqueais, dispositivos intravenosos ou cateteres urinários, ou dão-se após actos cirúrgicos ou outros procedimentos invasivos (8). Patologias como a pneumonia associada ao ventilador, infecções do tracto urinário, cirurgias dos mais variados tipos, entre outros, demandam o recurso a variados tipos de utensílios invasivos e habitualmente encontram-se associadas a

microrganismos tais como *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* MR, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia marcescens* e *Acinetobacter spp.* (4,8,10,11,21).

As instituições hospitalares albergam maioritariamente doentes imunocomprometidos que exigem muitas vezes no seu tratamento o recurso a elevadas cargas de antibioterapia, o que resulta numa maior prevalência de multiresistências a nível hospitalar, nomeadamente às cefalosporinas, às quinolonas, aos aminoglicosídeos, entre outros (4,12).

Torna-se, por isso, importante conhecer o mecanismo de resistência para que ocorra a caracterização fenotípica e genotípica do microrganismo, para posterior relevância do surto. Além de permitir definir se é a mesma estirpe a responsável pelo surto ou se são estirpes diferentes do mesmo microrganismo (12).

A maior parte das bactérias responsáveis por infecções na comunidade são menos resistentes aos antibióticos que as responsáveis por infecções nosocomiais, ou melhor dizendo, desenvolvem resistência mais lentamente (8). Estirpes de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*, encontram-se entre os principais microrganismos causadores de infecções do tracto respiratório, na comunidade. Enquanto que 80% das infecções do tracto urinário, são devidas a estirpes de *E. coli*. Um estudo realizado em Espanha (65) concluiu que a diabetes *mellitus*, o uso preferencial de quinolonas, as infecções do tracto urinário repetidas e a idade avançada eram factores de risco para as infecções por *E. coli* produtoras de ESBLs, em doentes não hospitalizados. Outro estudo comprovou que 22 casos de infecção por *E. coli* produtoras de ESBLs ocorreram por ano e por uma população de 1000 000 indivíduos com mais de 65 anos de idade (66).

Paralelamente, verifica-se que ao contrário das infecções hospitalares, na comunidade, as infecções por *Acinetobacter spp.* e *Pseudomonas spp.*, são raras (8). No entanto, é de referir que o limiar entre comunidade e hospital se encontra cada vez mais atenuado, a partir do momento em que indivíduos com estados de saúde precários e vulneráveis à infecção se encontram internados em instituições não hospitalares. Frequentemente, a infecção hospitalar só se manifesta após o regresso do doente à comunidade. Nestes casos, os microrganismos nosocomiais

podem ocorrer nas infecções comunitárias (8). A causa deste súbito aumento das infecções adquiridas na comunidade por microrganismos produtores de ESBLs, não está totalmente explicado, no entanto, o tratamento de alimentos, a administração de antibióticos aos animais e o contacto frequente dos indivíduos doentes com as instituições de saúde são temas a estudar (10,21).

## 1.9. Detecção laboratorial de ESBLs

A detecção laboratorial destas enzimas é ambígua e problemática dado que estas podem apresentar baixo nível de expressão e adicionalmente, podem-lhes estar associados outros mecanismos de resistência (AmpC e alteração de porinas), camuflando a sua presença (1,67).

Os métodos para testar a susceptibilidade bacteriana variam de país para país, bem como, a sua interpretação (*breakpoints* recomendados). No entanto, os princípios da detecção de ESBLs são comuns a todos os métodos e incluem a determinação da redução de susceptibilidade, com testes de *screening* com cefalosporinas, para a identificação de isolados potenciais portadores de ESBLs. Paralelamente, o estudo da presença de sinergismo entre as oximinocefalosporinas e o ácido clavulânico, permite distinguir entre isolados portadores de ESBLs (sinergismo positivo) daqueles que apresentam resistência por outras razões (sinergismo negativo) (8). Segundo o CLSI (*Clinical Laboratories Standards Institute*) estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentando, nos métodos de difusão, halos de sensibilidade <22mm, <27mm, <27mm, e <25mm para CAZ, ATM, CTX e CRO respectivamente, ou, que em testes de diluição, apresentem CIM > 2µg/ml para as oximinocefalosporinas, ou que exibam sinergismo entre as cefalosporinas e o ácido clavulânico, podem ser portadoras de ESBLs (1,4,10,21,68).

### Testes de Screening

Quanto maior for o número de cefalosporinas testadas, maior sensibilidade na detecção de resistência (1,4,8,10,21). Assim, nalguns caso é recomendado testar todas as *Enterobacteriaceae* com cefotaxima (CTX), ceftriaxona (CRO), ceftazidima (CAZ), cefpodoxima (CDP) e aztreonamo (ATM) e proceder a testes confirmatórios no caso de resistência ou redução de susceptibilidade a qualquer um destes agentes. Na generalidade, é recomendado o uso de CTX, que é

sensível às enzimas CTX-M e de CAZ, excelente substrato para as variantes TEM e SHV (8).

Estudos revelam que a aplicação de cefoxitina, nestes testes, também tem a sua utilidade já que estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* portadores de ESBLs Ihe são sensíveis, enquanto que as que expressam uma  $\beta$ -lactamase plasmídica do tipo AmpC Ihe são resistentes (21).

### **Testes confirmatórios**

Os testes confirmatórios para a presença de ESBLs baseiam-se na detecção de sinergismo entre as cefalosporinas e o ácido clavulânico. Assim, as recomendações para estirpes de *E. coli*, *Klebsiella* spp. e outros, indicam que nestes testes devem ser avaliadas as cefalosporinas para as quais o isolado apresentou resistência no *screening* inicial (1,8,21,68).

### **Teste de Sinergismo de Duplo-disco**

Neste teste (concebido por Jarlier *et al*) (69) uma suspensão bacteriana do microrganismo suspeito é inoculada numa placa de agar Mueller-Hinton e os discos das oximinocefalosporinas são posicionados a 30 mm do disco de AMC, inicialmente, colocado no centro da placa. O “alargamento” da zona de inibição da oximinocefalosporina provocado pelo sinergismo com o ácido clavulânico é considerado como um resultado positivo (21).

A avaliação deste teste em estirpes produtoras ou não de ESBLs, revelou taxas de sensibilidade de 79% a 97% e de especificidade de 94% a 100% (110, 119). Resultados falsos-negativos foram observados em microrganismos produtores de ESBLs dos tipos SHV-2, SHV-3 e TEM-12. Em estirpes com suspeita da produção de ESBLs, mas que são negativas para este teste quando a distância entre os discos é de 30mm, é recomendada a repetição do teste usando maior proximidade (ex.: 20mm) ou maior distância (ex.: 40mm), entre os mesmos (8,10,11,21). A grande vantagem deste teste encontra-se na simplicidade da sua



execução. No entanto, a sua interpretação é subjectiva. A sua sensibilidade pode, inclusive, estar reduzida quando a ESBL apresenta baixa actividade, implicando largas zonas de inibição à volta dos discos das cefalosporinas e do aztreonamo (21).

A utilização de cefpodoxima (CDP) nos testes de duplo-disco, foi entretanto amplamente sugerida, principalmente quando estudos verificaram que a sua utilização permite discriminar com confiança as estirpes de *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de ESBLs das estirpes não produtoras (70).

Para além deste teste, encontram-se descritos outros métodos, desenvolvidos por numerosos estudos ao longo dos anos, na procura do método ideal e de acordo com as realidades específicas de cada laboratório. Entre eles, podem referir-se o teste tridimensional e o teste de adição de ácido clavulânico. O primeiro foi desenvolvido por Thompson e Sanders (71), consistindo na introdução de uma suspensão bacteriana numa fissura realizada num meio de cultura onde discos de antibiótico são colocados na sua proximidade. Uma distorção ou descontinuidade na zona de inibição circular esperada é vista como um resultado positivo. No entanto, este teste revelou-se muito trabalhoso na detecção de ESBLs (21).

O teste de adição de ácido clavulânico, por sua vez, baseia-se no processo de adição de ácido clavulânico, às oximinocefalosporinas. Utilizando discos mistos, um aumento do diâmetro dos halos de inibição  $\geq 5$  mm com inibidor, em comparação com os halos dos discos de cefalosporina sem adição de ácido clavulânico, comprova presuntivamente a produção de ESBLs (11,21). Comparando, por testes de diluição, as CIM das cefalosporinas sem e com 2  $\mu$ g de ácido clavulânico, a produção de ESBLs é indicada por uma diminuição  $\geq 3$  diluições na presença do ácido clavulânico (11).

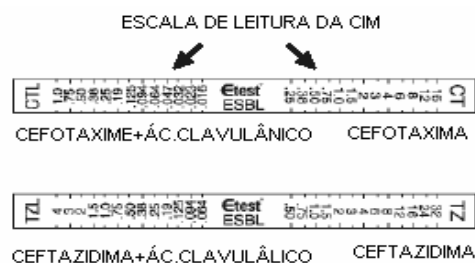
É de salientar que todos os testes que utilizam variações de uma técnica de difusão em disco requerem cuidadosa interpretação, na sua leitura, e portanto devem ser realizados por profissionais experientes (10,21).

## Método quantitativo E-test®

Várias fabricantes comerciais desenvolveram testes de detecção de ESBLs que podem ser usados juntamente com os métodos de determinação da CIM, já implementados na rotina laboratorial. As tiras de E-test ESBL (AB Biodisk, Solna, Suécia) consistem em tiras de plástico com dois lados, contendo um gradiente de ceftazidima (TZ, 0.5-32µg/ml), ou cefotaxima (CT, 0.25-16 µg/ml) numa ponta da tira e ceftazidima ou cefotaxima mais ácido clavulânico (TZL, 0.064-4 µg/ml) (CTL, 0.016-1.0 µg/ml) respectivamente, na outra ponta (figura 3) (1,10,21).

Um teste positivo para uma ESBL consiste numa redução de > 3 diluições no MIC da ceftazidima ou da cefotaxima, na presença de ácido clavulânico (70).

Este teste mostrou ser mais sensível que o teste de aproximação de duplo-disco, na detecção de ESBLs. É um método conveniente e fácil de por em prática, mas uma grande parte das vezes é de leitura difícil, principalmente quando as CIMs de ceftazidima ou cefotaxima são baixas, devido á difusão do ácido clavulânico para além do lado da tira que contem a cefalosporina sozinha (21).



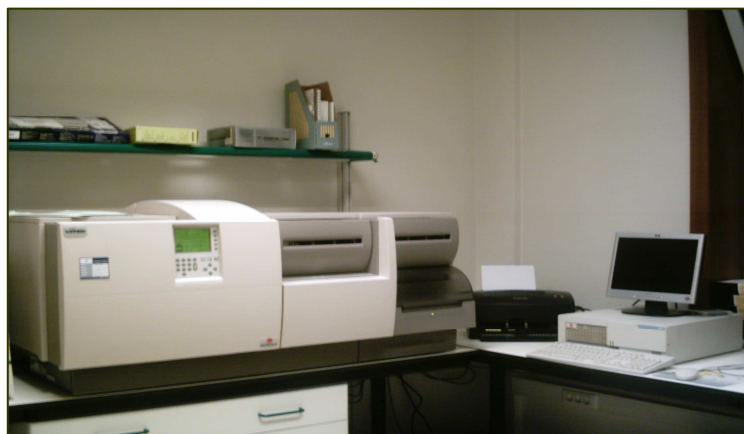
**Figura 3** – Tiras E-test® ESBL

Como teste fenotípico confirmatório de ESBLs apresenta uma sensibilidade de 87 a 100% e uma especificidade de 95 a 100%, dependendo ambas do rácio das CIMs da cefalosporina *versus* a combinação cefalosporina/ácido clavulânico usado. Habitualmente é recomendado uma redução  $\geq 8$  µg/ml na CIM da cefalosporina na presença do ácido clavulânico. A conjugação das duas tiras de cefepima e ceftazidima, no mesmo teste, melhora a capacidade de detecção dos

tipos de ESBLs que preferencialmente hidrolisam a cefotaxima, nomeadamente o tipo CTX-M (21,72).

### **Sistema automático VITEK2<sup>®</sup> AES (Teste VITEK2 ESBL)**

O teste confirmatório VITEK2 ESBL (BioMerieux, Marcy L'Étoile, França) consiste em “cartas” (ASTNO60) de seis poços contendo cefepima, cefotaxima e ceftazidima a concentrações individuais de 1.0, 0.5 e 0.5 µg/ml, e em combinação com 10, 4 e 4 µg/ml de ácido clavulânico, respectivamente. As estirpes em estudo são submetidas a esta tecnologia de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante. Dentro de um período de uma hora, o inóculo bacteriano e a carta ESBL associada, devem ser colocados no aparelho automático VITEK2. No aparelho, nenhum outro manuseamento é necessário. Diluições são realizadas e as “cartas” são inoculadas através de um processo de enchimento por vácuo. Após o qual, são seladas e colocadas automaticamente num leitor/incubador (1,21,70,71).



**Figura 4** – Sistema automático VITEK2 AES

O computador determina quando um poço revela crescimento baseado na atenuação da luz medida por um *scanner* óptico e após uma média de sete horas e meia de incubação, gera um relatório, tendo em conta o VITEK2 *Advanced Expert System* (AES), indicando se o teste é ESBL positivo ou negativo. Uma

redução predeterminada do crescimento bacteriano nos poços contendo ácido clavulânico, em comparação com aqueles que contêm a droga sozinha é um indicador da presença de uma ESBL. Foi demonstrado que o sistema de algoritmos do VITEK2 categoriza as  $\beta$ -lactamases baseando-se no padrão fenotípico de susceptibilidade, dos bacilos gram negativos a vários  $\beta$ -lactâmicos (10,21,71).

A principal vantagem deste teste é que facilmente pode ser integrado na rotina laboratorial já familiarizada com o sistema VITEK2. Num estudo realizado sobre estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamases identificadas e caracterizadas, Sanders *et al.* (71) determinou taxas de 99% de sensibilidade e especificidade na detecção de ESBLs, para o teste confirmatório VITEK2 ESBL.

### **Outros sistemas automáticos**

A Dade Behring MicroScan (Sacramento, Califórnia) produz painéis desidratados para realização de teste de susceptibilidade aos antibióticos por microdiluição. O sistema Walkaway<sup>®</sup> faz a leitura dos painéis MicroScan MIC 7 e MIC *plus* 2, específicos para microrganismos gram negativos e detecta a presença ou ausência de produção de ESBLs (10,21,75,77).

Paralelamente, a Becton Dickinson Biosciences (Sparks, Md), desenvolveu um sistema de incubação rápida – BD Phoenix<sup>®</sup> – para a identificação e teste de susceptibilidade bacterianas. Este sistema permite executar testes de detecção de ESBLs comparando a resposta do crescimento bacteriano em relação às cefalosporinas, tais como, cefpodoxima, cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona, com ou sem ácido clavulânico. Este sistema tem a capacidade de detectar a produção de ESBLs em mais de 90% de estirpes com fenótipos e genótipos anteriormente caracterizados e conhecidos (76).

Todos os testes descritos apresentam as suas vantagens, embora nenhum deles tenha a capacidade de detectar todas as estirpes produtoras de ESBLs. Estudos realizados comprovaram que o E-test confirmatório ESBL com ceftazidima, só detectava 81% das ESBLs estudadas, em comparação com os 97 e 91% obtidos

para os testes de duplo-disco e tridimensional, respectivamente (74). Encontra-se descrito que só 18% dos laboratórios de microbiologia detectam correctamente potenciais microrganismos produtores de ESBLs, aplicando como método de detecção, a susceptibilidade a um ou mais  $\beta$ -lactâmicos de espectro expandido. Foi inclusive provado, num estudo Europeu, que 37% de microrganismos produtores de ESBLs foram dados erradamente como susceptíveis aos referidos antibióticos (10,21). É de salientar, como anteriormente referido, que a interpretação dos testes de detecção de ESBLs deve ser executada com extrema precaução e sensibilidade (1,4,8,12,21,70).

### **1.10. Métodos de caracterização genótipica**

Os métodos fenótipicos só identificam presuntivamente a presença de uma ESBL, sendo a identificação do tipo específico da ESBL, mais difícil. O método mais simples e mais frequentemente praticado na detecção de uma  $\beta$ -lactamase pertencente a uma determinada família de enzimas é o da PCR (*Polimerase Chain Reaction*), que utiliza *primers* oligonucleotídicos específicos para um dado gene. No entanto, a PCR não permite discriminar entre diferentes variantes de TEM e SHV. Consequentemente, vários métodos moleculares que permitem a detecção e diferenciação das ESBLs, sem o auxílio da sequenciação, foram desenvolvidos (1,10,21).

Com o método de oligotipagem novas variantes TEM foram identificadas, bem como o recurso à adição à PCR, de uma análise de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (PCR-RFLP), e assim, os tamanhos dos fragmentos gerados pela acção de cada enzima de restrição indicavam pontos de mutação dentro do gene estrutural *bla*<sub>TEM</sub> (10,21).

Vários testes diferentes foram desenvolvidos para a detecção e identificação das mutações de SHV. O mais simples emprega uma técnica de PCR-RFLP. Apesar deste método não detectar o tipo de SHV presente, detecta a mutação específica na posição 238 (21). A análise de PCR-SSCP (*single-strand conformational polymorphism*) foi outro dos métodos desenvolvidos para caracterizar este tipo de ESBLs. Este método foi usado para detectar uma mutação de uma única base em

locais específicos do gene *bla*<sub>SHV</sub>. Com a identificação de novos genes SHV, a PCR-RFLP foi desenvolvida como auxílio na identificação das novas variantes deste tipo (10). Outro método proposto para a identificação dos genes SHV foi a aplicação da LCR (*Ligase Chain Reaction*). Esta permite a discriminação das sequências de ADN que diferem num único par de bases a partir do uso de uma ligase termoestável, com quatro *primers* de oligonucleótidos que são complementares à sequência alvo e se hibridizam adjacientemente um ao outro. Um *mismatch* de uma única base na junção oligonucleotídica não será amplificado. Neste teste, o ADN alvo contendo o gene *bla*<sub>SHV</sub> é desnaturado num termociclador e sujeito a *annealing* com *primers* de oligonucleótidos marcados com biotina que detectam mutações em quatro posições. De seguida o produto da PCR é detectado por uma reacção enzimática usando uma fosfatase NADPH-alcalina. Com este método foi possível detectar sete variantes SHV (10,21). A sequenciação nucleotídica permanece como método molecular *standard* para a determinação do gene específico que codifica uma  $\beta$ -lactamase, numa dada estirpe. No entanto, este também pode fornecer resultados variáveis de acordo com o método usado (21).

### 1.11. Significado clínico da detecção de ESBLs

A maioria dos  $\beta$ -lactâmicos não é eficaz no tratamento de infecção por microrganismos produtores de ESBLs (1,8,21). Por isso, o CLSI recomenda que um microrganismo produtor de ESBLs seja reportado como resistente a todos os  $\beta$ -lactâmicos de espectro alargado, à excepção dos carbapenemos, independentemente dos resultados obtidos nos testes susceptibilidade (68). Esta circunstância decorreu do facto de que, enquanto algumas estirpes apresentam total resistência aos  $\beta$ -lactâmicos de largo espectro, muitas outras podem não ser fenotipicamente resistentes. Sendo assim, torna-se importante que no diagnóstico laboratorial se tenha em conta que algumas estirpes podem apresentar susceptibilidade reduzida às oximinocefalosporinas em níveis, que embora não sejam considerados como de resistência, sugerem a presença de ESBLs. Torna-se igualmente importante que laboratorialmente sejam implementados um ou mais métodos para detectar a presença de ESBLs nestas estirpes (4,10,12,21). Outros motivos que são a favor da detecção deste tipo de enzimas relacionam-se com o aumento da sua prevalência a nível mundial, a alta transmissibilidade de plasmídeos onde se encontram as ESBLs e principalmente, a letalidade das infecções causadas por este tipo de microrganismos (21). Assim, quando o doente é tratado com o antibiótico adequado, não existe diferença significativa na taxa de mortalidade por infecções causadas por produtores e não produtores de ESBLs (1).

### 1.12. Terapêutica

A escolha mais adequada do tratamento das infecções provocadas por microrganismos produtores de ESBLs depende de vários factores, nomeadamente, a sua susceptibilidade *in vitro*, os resultados do seu efeito em animais, de estudos observacionais acerca da aplicação dos antimicrobianos e a subanálise de grupos randomizados (8).

Anteriormente, o tratamento destas infecções fazia-se com o recurso às cefamicinas (12). Porém, encontra-se descrito que estirpes de *K. pneumoniae*

podem apresentar resistência após tratamentos prolongados com esta classe de antimicrobianos (74).

Por outro lado, se o microrganismo produtor lhes for susceptível, o tratamento também pode ser feito com recurso aos aminoglicosídeos. Porém, devido à transmissão dos genes que codificam as ESBLs fazer-se por plasmídeos, existe a possibilidade de ocorrer resistência. Também, as cefalosporinas de quarta geração demonstraram ser eficazes contra estes microrganismos *in vitro*. No entanto, tal como verificado com outros fármacos, também com estes pode ocorrer aumento da CIM proporcional ao aumento do inóculo (12). Apesar de já terem sido descritos mecanismos de resistência aos carbapenemos, pela produção de carbapenemases (8,12) ou por perda de proteínas da membrana externa (12,74), estes fármacos apresentam ainda estabilidade elevada à actividade hidrolítica das ESBLs, apresentam boa penetração através da membrana externa bacteriana e a sua acção é eficaz quer *in vitro* quer *in vivo* (8,12,21,23).

### **1.13. Objectivo**

O objectivo deste trabalho consistiu na caracterização fenotípica de isolados de *E. coli* e de *K. pneumoniae* produtores de ESBLs, bem como, na avaliação da sua incidência nos vários tipos de infecções, nomeadamente nosocomiais e da comunidade. Para além disso, procedeu-se à comparação de três metodologias de detecção da produção de ESBLs, estudando as respectivas sensibilidades, especificidades e valores preditivos positivo e negativo.



## 2. Material e Métodos

### Identificação dos isolados bacterianos

Foram incluídas neste trabalho 209 estirpes bacterianas, 137 *E. coli* e 72 *K. pneumoniae*, recolhidas durante um período de 42 meses (Janeiro de 2004 a Julho de 2007), no serviço de Microbiologia do Hospital Geral de Santo António, E.P.E. Destas, 159 foram classificadas como ESBL positivas e 50 como ESBL negativas, baseado nos resultados de identificação (GNI) e susceptibilidade (ASTNO20) obtidos no sistema automático VITEK 2 AES (BioMerieux, Marcy L'Étoile, França), e pelo teste de sinergismo de duplo-disco. Estes isolados eram provenientes de amostras biológicas, nomeadamente, urinas (n=150), secreções brônquicas (n=20), exsudatos purulentos (n=24) e sangue (n=15). As amostras provieram de 168 doentes internados e de 41 doentes em regime de ambulatório. Todas estas estirpes foram congeladas até processamento a -70° C, em caldo trypticase-soja com 15% de glicerol (Oxoid, Hampshire, Inglaterra).

As amostras em estudo foram descongeladas e subcultivadas em Gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro (BioMerieux, Marcy L'Étoile, França), e incubadas a 35°-37°C durante 18 a 24 horas. Das culturas bacterianas puras foram preparadas, em soro fisiológico estéril 0.45%, suspensões bacterianas com uma turvação de 0.5 na escala de McFarland. Esta suspensão foi utilizada em todas as metodologias testadas, nomeadamente, teste de sinergismo, método quantitativo E-test e teste VITEK2 ESBL.

### Teste de Sinergismo de Duplo-disco

Este teste foi executado como se de um método de difusão em disco se tratasse. Os agentes antimicrobianos utilizados foram aztreonamo (ATM) (30 µg), cefotaxima (CTX) (30 µg), ceftazidima (CAZ) (30 µg) e amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) (10µg) (Oxoid, Basingstoke, UK). A suspensão bacteriana inoculou-se em placas de Petri com Gelose de Mueller – Hinton (Biogerm, Porto, Portugal), semeando com zaragatoa em três planos diferentes. Os discos foram

aplicados com uma pinça, na superfície do meio inoculado, a uma distância máxima de 20 mm em relação ao disco de AMC, e as placas foram incubadas a 35<sup>o</sup>-37<sup>o</sup>C durante 18-24 horas.

Foi considerado resultado positivo quando se verificou aumento da zona de inibição à volta de cada disco de CTX, ATM e CAZ do lado mais próximo ao disco contendo AMC. O resultado foi considerado negativo, quando se verificou ausência de aumento da zona de inibição à volta de cada disco de CTX, ATM e CAZ do lado mais próximo ao disco contendo AMC.

### **Método quantitativo E-test**

Neste método, o meio de cultura e o método de inoculação foram os mesmos do teste de sinergismo. Sendo neste caso, aplicadas à superfície do meio, tiras de E-test CT/CTL e TZ/TZL, posicionadas lado a lado, invertidas, e as placas foram incubadas a 35<sup>o</sup>-37<sup>o</sup>C durante 18-24 horas.

O resultado foi considerado positivo quando  $CT \geq 0.5 \mu\text{g/ml}$  e  $CT/CTL \geq 8 \mu\text{g/ml}$  ou quando  $TZ \geq 1 \mu\text{g/ml}$  e  $TZ/TZL \geq 8 \mu\text{g/ml}$  ou zona “fantasma” ou deformação na elipse TZ ou CT.

O resultado foi considerado negativo quando  $CT < 0.5 \mu\text{g/ml}$  ou  $CT/CTL < 8 \mu\text{g/ml}$  e  $TZ < 1 \mu\text{g/ml}$  ou  $TZ/TZL < 8 \mu\text{g/ml}$ .

O resultado foi considerado indeterminável quando  $CT > 16 \mu\text{g/ml}$  e  $CTL > 1 \mu\text{g/ml}$  ou  $TZ > 32 \mu\text{g/ml}$  e  $TZL > 4 \mu\text{g/ml}$  ou quando uma tira é negativa e a outra indeterminável.

### **Teste VITEK2 ESBL**

As estirpes em estudo foram submetidas a este método semi-automático seguindo os procedimentos recomendados pelo fabricante. O inoculo bacteriano e a carta ESBL associada (ASTNO 60), foram colocados no sistema automático VITEK2 AES e num período de  $\pm 7,5\text{h}$  o resultado foi fornecido.

Os resultados foram considerados positivos quando foi detectada redução proporcional de crescimento nos poços contendo cefalosporinas e

amoxicilina/ácido clavulânico, em comparação com aqueles contendo a cefalosporina sozinha.

Quando foi detectada ausência de redução proporcional de crescimento nos poços contendo cefalosporinas e amoxicilina/ácido clavulânico, em comparação com aqueles contendo a cefalosporina sozinha, os resultados foram considerados negativos.

### **Controlo de qualidade**

Em cada série de estudos (11 séries) e por cada um dos métodos, foram testadas duas estirpes de referência ATCC – *Klebsiella pneumoniae* 700603 (ESBL positiva) e *E. coli* 25922 (ESBL negativa), como controlo de qualidade. Os resultados dos testes só foram aceites quando o resultado do controlo de qualidade se encontrava entre os limites aceitáveis, de acordo com os critérios do CLSI.

Todos os resultados discrepantes foram repetidos pelos três métodos. Procedeu-se também ao método quantitativo E-test, com uma tira de cefepime (PM) (0.25 - 16 µg/ml) e cefepime com amoxicilina/ácido clavulânico (PML) (0.064 – 4 µg/ml).

### **Tratamento estatístico**

Os resultados foram analisados recorrendo ao programa informático *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS; SPSS, version 12.0 for Windows, Inc. Chicago, IL, USA). Foi utilizado na análise dos resultados estatística descritiva, nomeadamente, média, moda, mediana, desvio padrão, quartis e frequências. Na avaliação de diferenças entre médias, foi inicialmente efectuado o teste de Kolmogorov-Smirnov, para determinar a normalidade das variáveis e utilizado o teste de t-Student caso a variável apresentasse uma distribuição normal ou o teste *U* de Mann-Whitney. Para determinar diferenças de proporções entre variáveis foi utilizado o teste de  $\chi^2$ . O nível de significância considerado foi de 0.05.

### 3. Resultados

Das 209 estirpes estudadas, 159 foram confirmadas positivas para o teste de sinergismo. Destas, 154 apresentaram resultado positivo para o método E-test e no teste VITEK2 ESBL. Em 151 estirpes foi verificada concordância de positividade, entre as três metodologias. As mesmas metodologias revelaram total concordância na detecção de 41 estirpes não produtoras de ESBLs (quadro XI).

**Quadro XI** – Relação de resultados entre as metodologias praticadas

| PROVA DE SINERGISMO |       |          | E-TEST   |          |                | Total |
|---------------------|-------|----------|----------|----------|----------------|-------|
|                     |       |          | NEGATIVO | POSITIVO | INDETERMINÁVEL |       |
| NEGATIVO (n=50)     | VITEK | NEGATIVO | 41       | 0        | 5              | 46    |
|                     |       | POSITIVO | 1        | 3        | 0              | 4     |
|                     | Total |          | 42       | 3        | 5              | 50    |
| POSITIVO (n=159)    | VITEK | NEGATIVO | 0        | 3        | 2              | 5     |
|                     |       | POSITIVO | 1        | 151      | 2              | 154   |
|                     | Total |          | 1        | 154      | 4              | 159   |

Entre os três testes efectuados, foram encontradas discrepâncias em 17 das estirpes estudadas (quadro XII). Destas, 4 relacionam-se com estirpes de *E. coli* e 13 com estirpes de *K. pneumoniae*, isoladas na sua maioria em amostras biológicas de urina.

**Quadro XII** – Principais discrepâncias entre testes

| Amostra | Produto      | Identificação        | Sinergismo | E-test | Vitek | PM/PML |
|---------|--------------|----------------------|------------|--------|-------|--------|
| 6451    | Urina        | <i>K. pneumoniae</i> | +          | +      | -     | +      |
| 20607   | Urina        | <i>K. pneumoniae</i> | +          | +      | -     | +      |
| 20618   | Urina        | <i>K. pneumoniae</i> | +          | +      | -     | +      |
| 522246  | Expectoração | <i>K. pneumoniae</i> | +          | -      | +     | +      |
| 9289    | Urina        | <i>K. pneumoniae</i> | +          | INDET  | -     | +      |
| 12406   | Sangue       | <i>K. pneumoniae</i> | +          | INDET  | +     | +      |
| 23068   | Expectoração | <i>K. pneumoniae</i> | +          | INDET  | -     | +      |
| 506781  | Urina        | <i>E. coli</i>       | +          | INDET  | +     | +      |
| 6560    | Urina        | <i>K. pneumoniae</i> | -          | +      | +     | -      |
| 6931    | Pús          | <i>K. pneumoniae</i> | -          | +      | +     | -      |
| 14686   | Urina        | <i>K. pneumoniae</i> | -          | +      | +     | -      |
| 529408  | Pús          | <i>E. coli</i>       | -          | -      | +     | -      |
| 604993  | Urina        | <i>E. coli</i>       | -          | INDET  | -     | -      |
| 623518  | Expectoração | <i>K. pneumoniae</i> | -          | INDET  | -     | -      |
| 633992  | Pús          | <i>K. pneumoniae</i> | -          | INDET  | -     | -      |
| 635623  | Pús          | <i>K. pneumoniae</i> | -          | INDET  | -     | -      |
| 642175  | Urina        | <i>E. coli</i>       | -          | INDET  | -     | -      |

(+) Positivo; (-) Negativo; INDET-Indeterminável; PM/PML-tira de E-test com cefepima e cefepima e ácido clavulânico

Nos dois microrganismos estudados, a proporção de discrepâncias, entre os testes, foi significativamente superior nas estirpes de *K. pneumoniae* (18.06 % versus 2.19%;  $\chi^2= 62.01$ ,  $p <0.0001$ ). Nos casos (n=10) em que se procedeu à confirmação do resultado do teste VITEK2 ESBL, em todos eles foi certificada a sua negatividade. Nas estirpes com sinergismo positivo e cujo E-test com CT/CTL e TZ/TZL revelou um resultado indeterminável (n=4) ou negativo (n=1), o E-test com tira de PM/PML revelou a presença de ESBLs em todas elas.

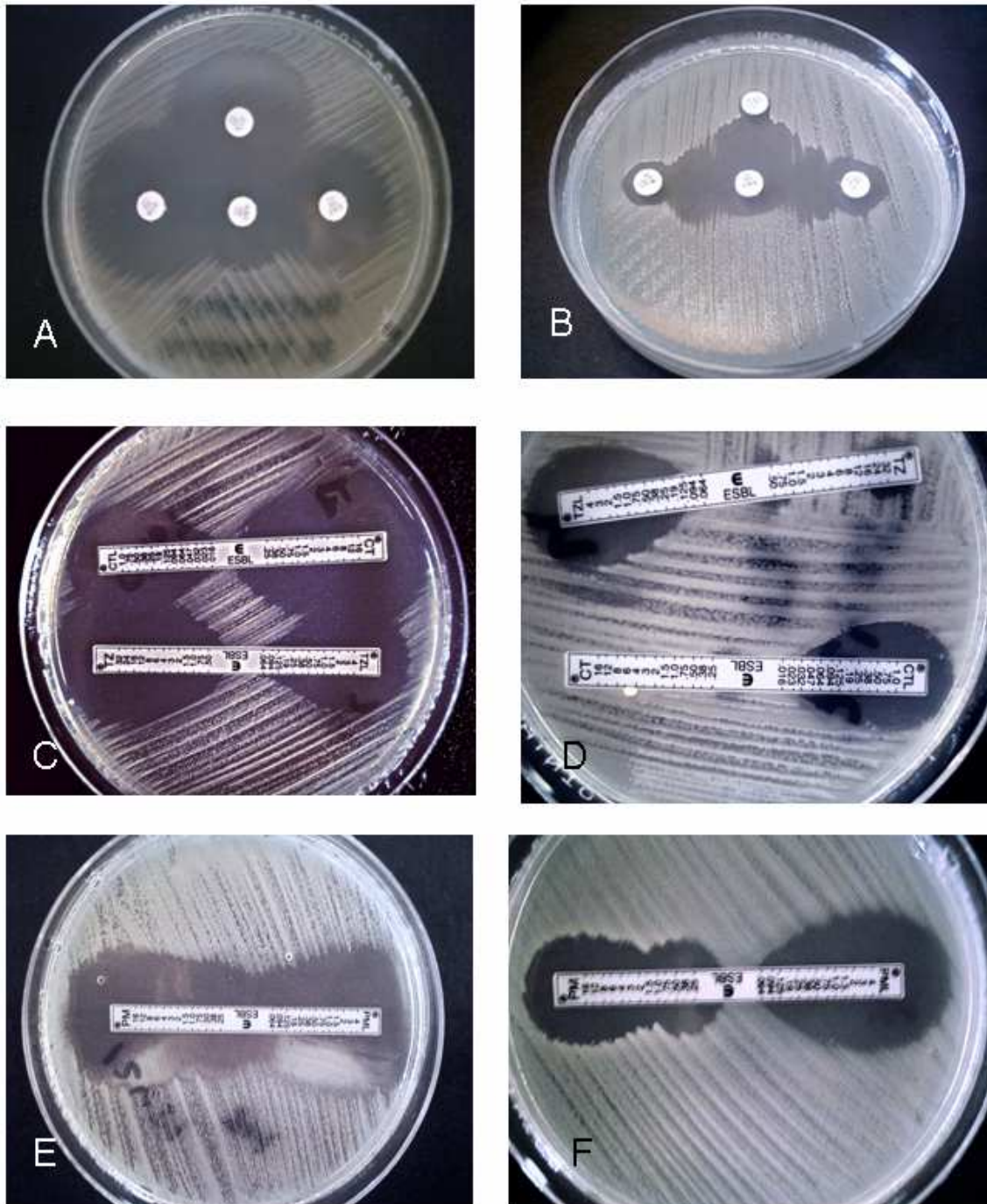
Nos três casos de falsa positividade para o E-test com CT/CTL e TZ/TZL, o E-test com tira de PM/PML revelou CIMs  $\leq 8$   $\mu\text{g/ml}$ . No único caso de falsa negatividade, a confirmação com tira de E-test com PM/PML revelou a presença de uma ESBL na amostra 522246. Nas figuras 5 e 6 encontram-se discriminados os principais resultados obtidos nos testes de sinergismo e E-test com CT/CTL, TZ/TZL e PM/PML.

A genotipagem de amostras referentes ao ano de 2004, foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e os seus resultados, incluídos neste trabalho, foram gentilmente fornecidos pela Prof. Luísa Peixe. Para as amostras 9289 e 23068 confirmou-se a presença de ESBLs do tipo SHV-11 e SHV-12, respectivamente (quadro XII). A maior parte das ESBLs caracterizadas foram do tipo TEM.

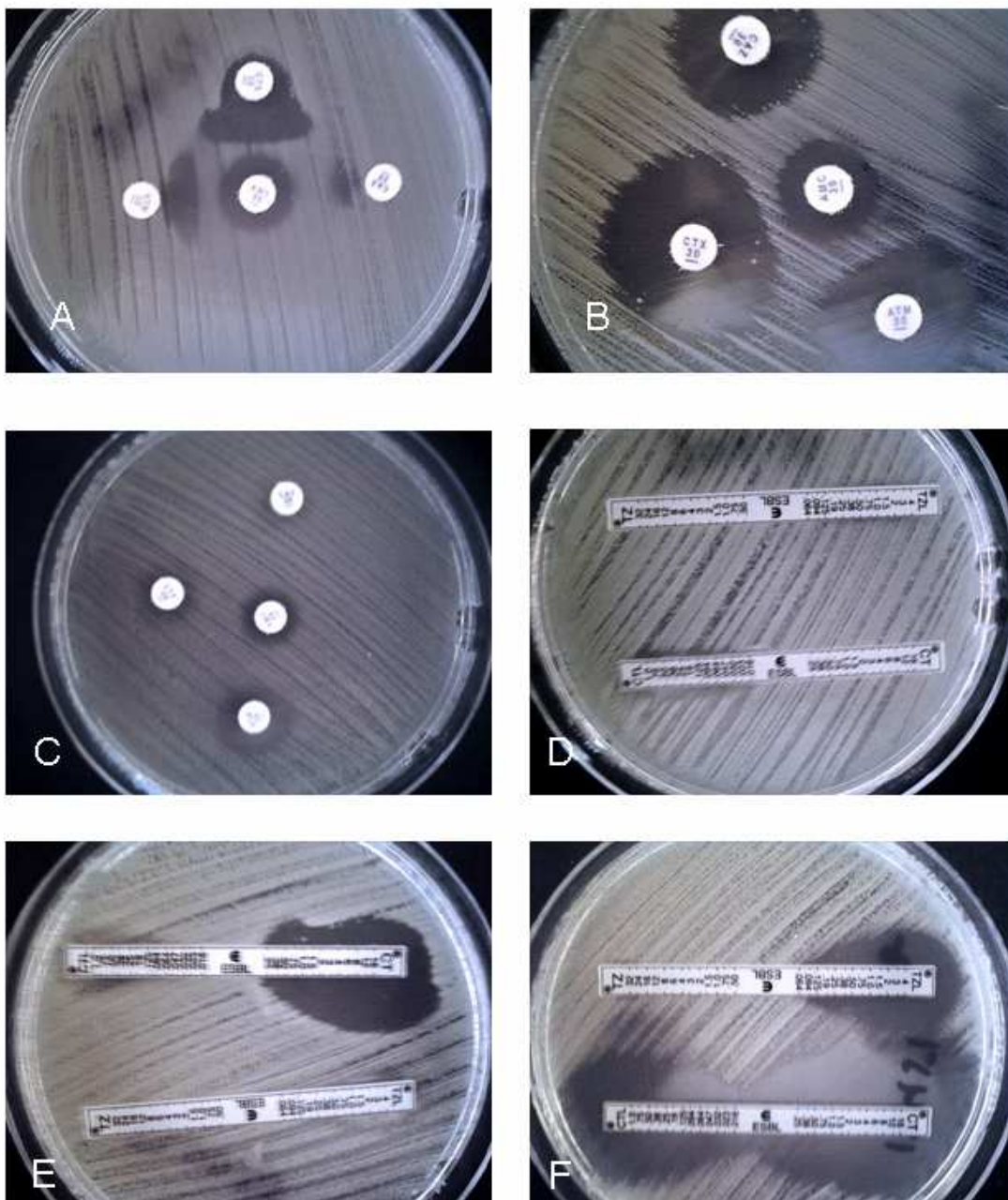
**Quadro XIII – Genótipos de amostras referentes ao ano de 2004**

| Amostra | Produto      | Identificação       | Regime       | Genótipo*      |
|---------|--------------|---------------------|--------------|----------------|
| 276     | Urina        | <i>K.pneumoniae</i> | Ambulatório  | TEM-24         |
| 4057    | Expectoração | <i>E.coli</i>       | Internamento | TEM-52         |
| 4297    | Urina        | <i>E.coli</i>       | Internamento | TEM-52         |
| 6198    | Urina        | <i>E.coli</i>       | Internamento | TEM-52         |
| 12451   | Urina        | <i>K.pneumoniae</i> | Internamento | TEM-24         |
| 12453   | Expectoração | <i>K.pneumoniae</i> | Ambulatório  | TEM-24         |
| 19908   | Urina        | <i>E.coli</i>       | Internamento | TEM-52         |
| 23739   | Urina        | <i>E.coli</i>       | Internamento | TEM-52         |
| 23716   | Urina        | <i>E.coli</i>       | Internamento | TEM-52         |
| 5239    | Sangue       | <i>K.pneumoniae</i> | Internamento | SHV-26         |
| 7173    | Urina        | <i>K.pneumoniae</i> | Ambulatório  | SHV-26         |
| 9289    | Urina        | <i>K.pneumoniae</i> | Internamento | SHV-11         |
| 11625   | Urina        | <i>K.pneumoniae</i> | Internamento | SHV-12         |
| 23068   | Expectoração | <i>K.pneumoniae</i> | Internamento | SHV-12         |
| 4742    | Urina        | <i>E.coli</i>       | Ambulatório  | CTX-M-15       |
| 17850   | Urina        | <i>E.coli</i>       | Internamento | CTX-M-14       |
| 6560    | Urina        | <i>K.pneumoniae</i> | Internamento | Indeterminável |
| 12406   | Sangue       | <i>K.pneumoniae</i> | Internamento | Indeterminável |
| 14686   | Urina        | <i>K.pneumoniae</i> | Internamento | Indeterminável |
| 20607   | Urina        | <i>K.pneumoniae</i> | Internamento | Indeterminável |

\*Prof.Doutora Luísa Peixe. Faculdade Farmácia Universidade Porto



**Figura 5** – Resultados das metodologias praticadas: A – Teste de Sinergismo negativo; B – Teste de Sinergismo positivo; C e E – Método quantitativo E-test negativo; D e F – Método quantitativo E-test positivo (padrões CAZ e CTX e presença de fenómeno “fantasma”).



**Figura 6** – Outros resultados relevantes: A – Presença de ESBL associada a outro mecanismo de resistência; B – Provável  $\beta$ -lactamase AmpC; C – Provável mecanismo de resistência não ESBL; D – Resultado E-test indeterminável (CIMS superiores ao limite de detecção); E – Efeito de indução; F – Microrganismo produtor de ESBLs com padrão hidrolítico CAZ.

As taxas de sensibilidade, especificidade, bem como, valores preditivos positivo e negativo, determinados para cada teste, encontram-se referidos no quadro XIV. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre proporções de resultados obtidos nos testes VITEK2 ESBL e E-test por espécie ( $\chi^2= 10.932$ ;  $p=0.01$ ;  $\chi^2= 7.902$ ;  $p=0.019$ ).

**Quadro XIV** – Validade e capacidade preditiva por teste e por microrganismo

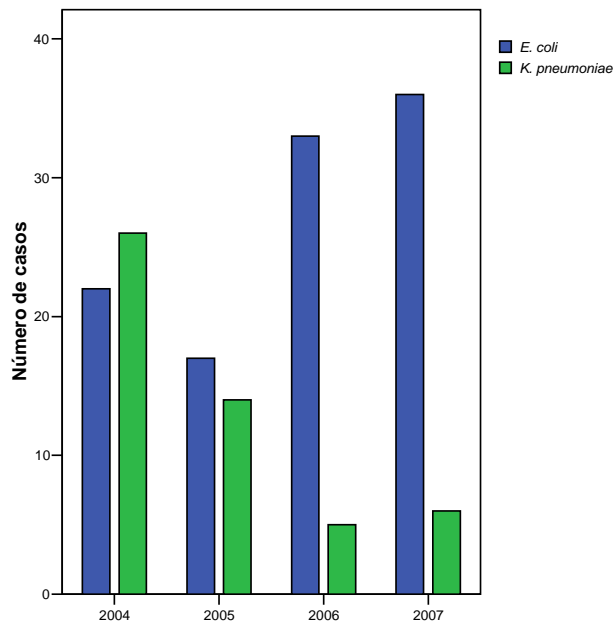
|                                     | E-test         |                     | VITEK 2        |                     |
|-------------------------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|
|                                     | <i>E. coli</i> | <i>K.pneumoniae</i> | <i>E. coli</i> | <i>K.pneumoniae</i> |
| <b>Sensibilidade (%)</b>            | 100            | 98                  | 100            | 90                  |
| <b>Especificidade (%)</b>           | 100            | 86                  | 96             | 86                  |
| <b>Valor preditivo positivo (%)</b> | 100            | 94                  | 99             | 90                  |
| <b>Valor preditivo negativo (%)</b> | 100            | 95                  | 100            | 86                  |

Nas estirpes em que foi encontrada discrepância, todas eram provenientes de produtos biológicos oriundos do internamento.

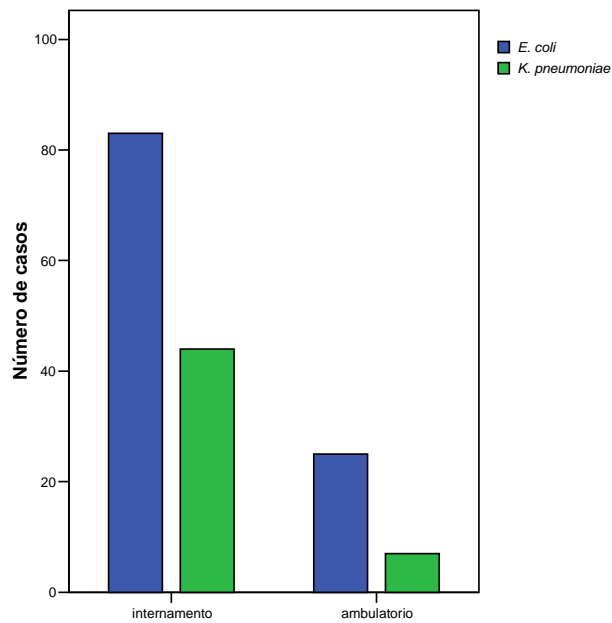
Em termos temporais, existiram diferenças estatisticamente significativas quanto à espécie de microrganismo produtor de ESBLs ( $\chi^2= 25.531$ ;  $p < 0.001$ ). Em 2004, foram detectadas percentagens de 46.8% e 52.2% de *E. coli* e *K. pneumoniae* ESBL positivas, respectivamente. Em 2006, registou-se uma taxa de 86.8% de *E. coli* produtoras de ESBL. No primeiro semestre de 2007, 85.7% de estirpes de *E. coli* foram detectadas como ESBL positivas contra 14.3% de *K. pneumoniae* (fig.7).

No que se refere à condição do doente, constatou-se não existirem diferenças estatisticamente significativas entre espécie produtora de ESBLs e os regimes de internamento e ambulatório ( $\chi^2=1.913$ ;  $p=0.167$ ) (fig. 8).





**Figura 7** – Frequência de estirpes produtoras de ESBLs detectadas em 42 meses



**Figura 8** – Frequência de estirpes isoladas em regime de internamento e ambulatório

No quadro XV, pode verificar-se que 77% das estirpes de *E. coli* produtoras de ESBLs provieram do internamento e 23% do ambulatório. Enquanto que 86% das estirpes de *K. pneumoniae* foram provenientes do internamento e só 14% provieram do ambulatório.

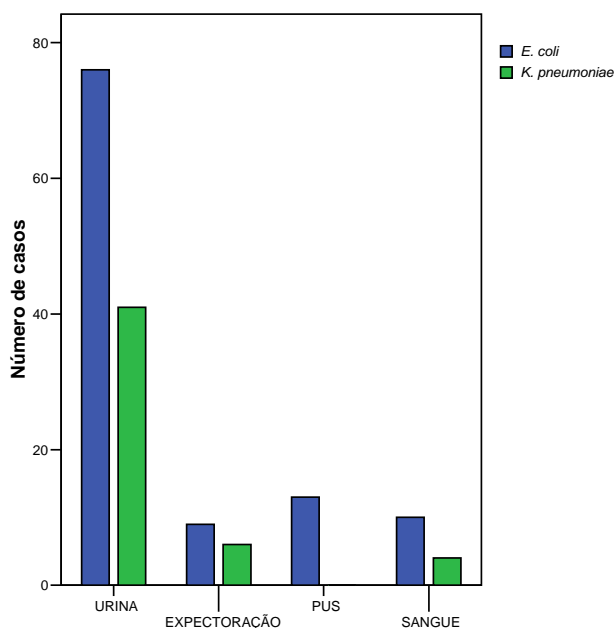
**Quadro XV** – Perfis hidrolíticos bacterianos mais comuns no internamento e no ambulatório

| HIDRÓLISE | <i>E.coli</i> ESBL+ (n=108) |                    | <i>K.pneumoniae</i> ESBL+ (n=51) |                   |
|-----------|-----------------------------|--------------------|----------------------------------|-------------------|
|           | Internamento (n=83)         | Ambulatório (n=25) | Internamento (n=44)              | Ambulatório (n=7) |
| CTX       | 7%                          | 24%                | 9%                               | 14%               |
| CAZ       | 2%                          | 0%                 | 18%                              | 0%                |
| CTX+CAZ   | 91%                         | 76%                | 73%                              | 86%               |

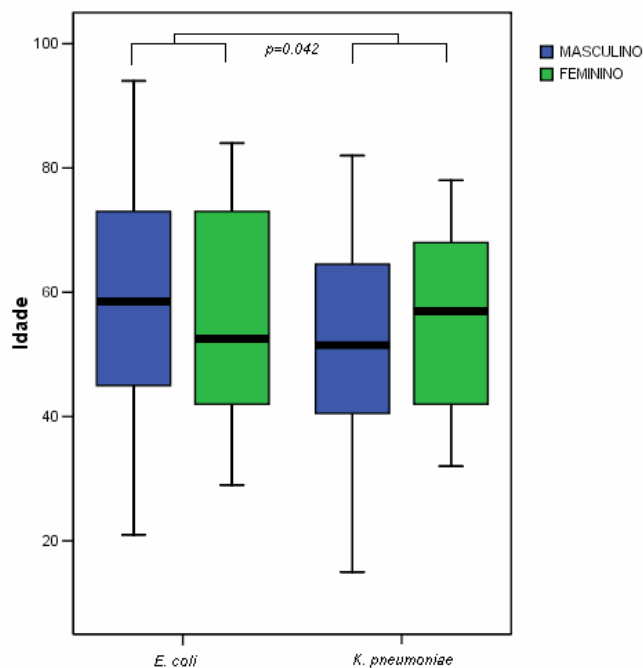
CTX – cefotaxima; CAZ – ceftazidima

Ambos os géneros revelaram igual afinidade para a cefotaxima e para a ceftazidima. A nível do ambulatório, 24% e 14% das estirpes de *E. coli* e *K pneumoniae*, respectivamente, revelam preferência única para hidrolisar a CTX.

Nas amostras biológicas de urinas foram detectadas 66% de estirpes de *E.coli* ESBL positivas. Em relação aos isolados de *K. pneumoniae*, pode verificar-se que 34% foram isoladas em urinas (fig. 9). No conjunto, existe uma tendência significativa para diferenças nas proporções de microrganismos produtores de ESBLs e produtos biológicos rastreados ( $\chi^2= 7.123$ ;  $p=0.068$ ).



**Figura 9** – Frequência de estirpes ESBL positivas por produto biológico



**Figura 10** – Relação entre idade, sexo e microrganismo produtor de ESBLs

Relativamente à mediana das idades, ela apresenta-se significativamente superior nos indivíduos cuja estirpe identificada como produtora de ESBLs foi a *E. coli*. Não foram encontradas diferenças em termos de idades, entre indivíduos do sexo masculino e feminino (fig.10).

**Quadro XVI** – Controlo de Qualidade

| Microrganismo ATCC          | Resultado Esperado | VITEK2 |    | E-test |    | Sinergismo |    |
|-----------------------------|--------------------|--------|----|--------|----|------------|----|
|                             |                    | +      | -  | +      | -  | +          | -  |
| <i>E. coli</i> 25922        | Negativo           |        | 11 |        | 11 |            | 11 |
| <i>K. pneumoniae</i> 700603 | Positivo           | 11     |    | 11     |    | 11         |    |

(+) positivo; (-) negativo.

No quadro XVI encontram-se sistematizados os resultados referentes ao controlo de qualidade dos métodos estudados, com dois microrganismos ATCC. O padrão de resultados obtidos em cada série de testes foi de encontro ao definido pelo CLSI.

#### 4. Discussão

As infecções devidas a microrganismos produtores de ESBLs têm um impacto claro nas taxas de mortalidade e de custos, a nível hospitalar. Os atrasos na atempada administração da terapia não representam efeitos graves neste tipo de infecções, se a terapia for adequadamente ajustada de acordo com a informação da susceptibilidade *in vitro*. Essa informação deverá ser reportada ao clínico o mais prontamente possível, especialmente em casos de alto risco.

Tendo em conta o carácter disseminativo dos microrganismos produtores de ESBLs, deve o seu diagnóstico laboratorial ser efectuado de acordo com protocolos rigorosos para a sua detecção e fenotipagem, recorrendo-se idealmente para isso à associação de metodologias de alta sensibilidade e especificidade (21,66).

Na globalidade dos estudos realizados nos últimos anos, e nomeadamente segundo Vercauteren *et al* (74), o teste de difusão em disco recomendado pelo CLSI não é suficientemente sensível para confirmar um microrganismo como produtor de ESBLs. Cabe pois a cada laboratório de Microbiologia a escolha dos métodos de *screening* e de confirmação que ofereçam melhores resultados.

Neste estudo verificou-se que os testes de sinergismo de duplo-disco, E-test e VITEK2 ESBL apresentaram 95% de concordância total na detecção de estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs.

O teste de sinergismo de duplo-disco revelou-se uma metodologia muito sensível na detecção de ESBLs. A escolha na associação de AMC com duas cefalosporinas (CTX e CAZ) e o monobactamo potenciou a detecção de sinergismo e permitiu antever o tipo de enzimas presentes.

Num estudo realizado por Machanda *et al.* (67), considerou-se que o uso adicional de discos de ceftriaxona seria recomendado, pois por vezes esta e a cefotaxima são mais eficientes na detecção de ESBLs que o ATM e a CAZ. Por outro lado, Rodriguez-Baño no seu trabalho sugere a inclusão de cefepima, pela sua relativa indiferença à expressão elevada de  $\beta$ -lactamases cromossomicas AmpC (65).

Os resultados obtidos neste teste permitiram concluir que uma distância de 20 mm, entre os antimicrobianos, não compromete a interpretação, facilita a leitura

dos sinergismos presentes e faculta a visualização da acção de outros mecanismos de resistência associados. Machanda (67) comprovou que a redução da distância para 16 mm entre os discos, aumenta significativamente a sensibilidade do teste de sinergismo.

Outros trabalhos, que aferiram a sensibilidade deste teste com distâncias diferentes entre antibióticos concluíram que distâncias superiores a 30 mm e inferiores a 16mm comprometem os resultados ao não detectarem a presença de ESBLs ou dificultam a sua leitura (70,71,72).

Em relação à metodologia E-test, que neste estudo detectou 96,9% de ESBLs positivas, concluiu-se que a aplicação das tiras de CT/CTL e TZ/TZL, na mesma placa de agar Mueller-Hinton em paralelo e invertidas, facilitou a interpretação dos resultados e a identificação presuntiva do tipo de ESBLs presentes pela visualização dos diferentes perfis hidrolíticos, bem como, a presença de hiperprodução de enzimas indutíveis AmpC cromossómicas ou  $\beta$ -lactamases IRT. Trabalhos similares descreveram dificuldades na interpretação dos resultados quando o método quantitativo E-test foi realizado apenas com tiras de TZ/TZL, apresentando 23% de resultados indetermináveis em estirpes de *E.coli* e 6% em estirpes de *K. pneumoniae* (70). Com o recurso a tiras de TZ/TZL e CT/CTL, um outro trabalho revelou só 4% de resultados indetermináveis no método quantitativo E-test (78).

No presente estudo, a metodologia E-test apresentou 9 resultados indetermináveis, seis em estirpes de *K. pneumoniae* e 3 em estirpes de *E. coli*.

O recurso ao E-test com tira de PM/PML, para comprovação destes resultados permitiu confirmar a presença de ESBLs, em 4 casos, já que, como foi anteriormente referido, a cefepima é alheia à presença de enzimas AmpC. Os restantes 5 casos foram confirmados como negativos para a presença de ESBLs. O método quantitativo E-test apresentou 100% de especificidade e sensibilidade para detectar estirpes de *E. coli* produtoras de ESBLs e mostrou-se uma metodologia menos sensível (98%) e específica (86%) para detectar estirpes de *K. pneumoniae* ESBLs positivas.

O teste VITEK2 ESBL foi igualmente capaz de detectar 96,9% de produtores de ESBLs, corroborando a opinião de Spanu *et al* (73), de que este é um instrumento

de confiança para a detecção de rotina de microrganismos produtores de ESBLs. Num estudo acerca de estirpes de *K. pneumoniae* e *E. coli* expressando  $\beta$ -lactamases bem caracterizadas, Sanders *et al.* (71), demonstraram que o teste VITEK2 ESBL apresentava 99% de sensibilidade e especificidade na detecção de ESBLs, enquanto outro estudo sugeria taxas superiores a 90% (66).

No actual estudo, este método apresentou uma sensibilidade de 100% para a detecção de estirpes de *E. coli* produtoras de ESBLs, em comparação com taxas ligeiramente mais baixas (90%) para estirpes de *K. pneumoniae*. Este facto poderá estar relacionado com a ocorrência mais frequente, em isolados de *K. pneumoniae*, de outros mecanismos de resistência associados, capazes de camuflar a presença de ESBLs e dificultar a sua detecção.

Nos quatro casos em que o teste VITEK2 ESBL se mostrou falsamente positivo, três revelaram estar relacionados com estirpes de *K. pneumoniae* e o outro com uma estirpe *E. coli*. Em relação ao E-test, os três resultados falsos positivos também se encontravam relacionados com estirpes de *K. pneumoniae*.

Segundo Bradford e Spanu, deve empregar-se grande cuidado na interpretação destes métodos pois têm vindo a ser reportados resultados falsos-positivos nos testes de screening fenotípico de ESBLs em estirpes não possuidoras de ESBLs (21, 73). Vários estudos concluíram que altos níveis de expressão de SHV-1 em estirpes de *K. pneumoniae* podem provocar a subida da CIM da ceftazidima (CIM  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$ ) a níveis nos quais existe a suspeita da presença de uma ESBL (21,33,73).

Paralelamente, outros estudos, reportaram que a produção de SHV-1 numa estirpe de *K. pneumoniae*, apresentando adicionalmente a ausência de uma porina da membrana externa, provocou um resultado falso-positivo nos testes de detecção de ESBLs baseados no diferencial entre as CIMs dos oximino- $\beta$ -lactâmicos com e sem ácido clavulânico (21, 73).

Por outro lado, os resultados falsos-negativos encontrados poderão dever-se a estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de uma ESBL e de uma  $\beta$ -lactamase AmpC, simultaneamente. A coexistência de ambos os tipos enzimáticos numa mesma estirpe poderá resultar em CIMs elevadas para as cefalosporinas, mas resultar em falsos-negativos nos testes de detecção de ESBLs. A explicação mais

plausível refere-se à capacidade que as  $\beta$ -lactamases AmpC têm em resistir ao ácido clavulânico e conseqüentemente camuflar a acção sinérgica que possa existir entre este e as cefalosporinas contra as ESBLs (73).

Quanto à avaliação da eficiência dos substratos utilizados nos testes praticados verificamos que tanto a cefotaxima como a ceftazidima apresentaram elevada sensibilidade para a detecção de ESBLs, em ambos os géneros. Sendo de ressaltar que os resultados da genótipagem de algumas das estirpes em estudo revelou ESBLs maioritariamente do tipo TEM, isoladas de produtos oriundos de doentes em regime de internamento. Tal como noutros estudos realizados em Portugal (26,48,49,50), este estudo também detectou duas estirpes de *E. coli* produtoras de ESBLs dos tipos CTX-M-14 e CTX-M-15. No entanto, estes resultados mostram-se reduzidos para que através deles mais se possa inferir acerca dos principais tipos de enzimas presentes e como se disseminam, no ambiente hospitalar em estudo.

Podemos verificar neste trabalho, que no Hospital Geral de Santo António, em relação ao ano de 2004 foram detectadas percentagens similares de estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae*, produtoras de ESBLs, sendo no entanto de ressaltar que a incidência de *K. pneumoniae* era ligeiramente superior. Temporalmente assistiu-se a um declínio nos isolados de *K. pneumoniae* e um acréscimo significativo de estirpes produtoras de ESBLs entre isolados de *E. coli*, só no primeiro semestre de 2007.

Epidemiologicamente confirma-se o aumento significativo de isolados destas *Enterobacteriaceae* neste hospital, prevalentemente em doentes internados podendo este facto ser um indicador de focos de disseminação nosocomial. A maior frequência de isolados de *E. coli* ESBL positivas em detrimento de isolados de *K. pneumoniae* verificou-se, provavelmente devido à eficaz acção da comissão de controlo da infecção, mas também porque o limiar entre hospital e comunidade se encontra cada vez mais atenuado, verificando-se actualmente o aumento preocupante da frequência de estirpes produtoras de ESBLs na comunidade. Bisson *et al* (80), refere como factores de risco de infecção nosocomial, entre outros, os internamentos prolongados e sujeitos à presença de dispositivos médicos invasivos (cateteres urinários, tubos endotraqueais, cateteres venosos),

por um período prolongado, a idade, o estado clínico do doente, bem como, o abuso de antibióticos, estando comprovada por vários estudos (81) a relação entre o uso de cefalosporinas de terceira geração e a aquisição de uma estirpe produtora de ESBLs. Por outro lado, outros estudos (65) concluíram que a diabetes *mellitus*, o uso abusivo de quinolonas, as infecções do tracto urinário repetidas, a idade avançada e os internamentos hospitalares intermitentes, são os principais factores de risco das infecções por *E. coli* produtoras de ESBLs, em doentes não hospitalizados.

Finalmente, com este estudo foi possível concluir que sendo o Hospital Geral de Santo António, EPE, uma instituição de cariz central, em que a rotatividade de doentes é elevada, abarcando uma miríade de especialidades clínicas, torna-se premente encontrar uma metodologia de diagnóstico laboratorial eficaz na detecção de estirpes produtoras de ESBLs, como auxílio rápido no tratamento, na prevenção da infecção nosocomial e controlo da disseminação destas estirpes. Os resultados obtidos sugerem que a aplicação do teste VITEK2 ESBL como teste confirmatório da presença de isolados produtores de ESBLs, é uma metodologia segura e de alta sensibilidade na rotina laboratorial do laboratório de Microbiologia. Apesar do teste de sinergismo ser uma metodologia de fácil execução e pouco oneroso, apresenta o sério inconveniente de requerer execução e interpretação por pessoal especializado e experiente, e de nem sempre detectar a presença de ESBLs, quando associadas a outros mecanismos de resistência. Por outro lado, a metodologia E-test apesar de apresentar boa sensibilidade na detecção destes microrganismos, continua a ser altamente onerosa e também sujeita às interferências mencionadas anteriormente. Os resultados sugerem por isso, que a aplicação do teste VITEK2 ESBL na rotina laboratorial do Serviço de Microbiologia do HGSA, EPE, seria de adoptar, pela sua rapidez nos resultados, e integração rápida na actual rotina de trabalho sem implicar custos acrescidos e a mobilização extraordinária de recursos materiais e humanos.



## **5. Perspectivas futuras**

Em futuros estudos seria pertinente a criação de protocolo de intercâmbio entre especialidades clínicas, laboratório de Microbiologia e comissão de infecção no sentido de estudar a incidência e a prevalência do fenómeno ESBL entre outros isolados bacterianos, para além dos contemplados neste estudo. Paralelamente, seria de extrema relevância o investimento na implementação de metodologias de caracterização genotípica desses isolados, pois se a fenotipagem não substitui a informação adquirida pela genotipagem e vice-versa, ambas complementam-se e facultam as ferramentas para refrear a disseminação destas estirpes.

## 6. Bibliografia

1. Sousa JC. 2005. *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Ed. Universidade Fernando Pessoa, Porto
2. Jawetz, Melnick, Adelberg. *Microbiologia Médica*. 15.<sup>a</sup> Ed. Guanabara. Rio Janeiro
3. Strohl WA, Rouse H, Fisher BD. *Microbiologia Ilustrada*. Ed. Artmed.
4. Júnior MAS, Ferreira ES, Conceição GC. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): Um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. *NewsLab* 2004; **63**:152-174.
5. Bayles KW. The bacterial action of penicillin: new clues to an unsolved mystery. *Trends Microbiol* 2000; **8**: 78-274.
6. Robinson GN. Historical Perspective. Forty years of  $\beta$  – lactam research. *J Ant Chemother* 1998; **41**: 589-603.
7. Sousa, JC *et al.* 1988. *Antibióticos inibidores de biosíntese do peptidoglicano*. Ed. Ordem Farm.
8. Livermore DM, Paterson DL. 2006. *Pocket Guide to Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in Resistance*. Ed. CMG
9. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 1940; **146**:837.
10. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev* 2005; **18**:657-686

11. Nogueira KS. *Ocorrência de beta-lactamases de espectro ampliado em Enterobactérias isoladas em dois hospitais universitários*. Tese de mestrado. Universidade Federal do Paraná. 2005. [www.ufpr.br](http://www.ufpr.br)
12. Dalmarco EM, Blatt SL, Córdova CM. Identificação Laboratorial de  $\beta$ -lactamases de Espectro Expandido (ESBLs) – revisão. *RBAC* 2006; **38(3)**: 171-177.
13. Livermore DM. Bacterial Resistance, origins, epidemiology and impact. *Clin Infect Dis* 2003; **36**: 811-823.
14. Richmond MH, Sykes RB. The beta-lactamases of Gram negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol* 1973; **9**:31-88.
15. Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, and Waley SG. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biomech J* 1999; **276**:269-270.
16. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**:1211-1233.
17. Barthélémy M, Péduzzi J, and Labia R. Distinction entre les structures primaires des betalactamases TEM-1 et TEM-2. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1985; **136A**:311-321.
18. Bret L, Chanel C, Sirot D, Labi R, and sirot J. Characterization of an inhibitor-resistant enzyme IRT-2 derived from TEM-2 beta-lactamase produced by *P. mirabilis* strains. *J Antimicrob Chemother* 1996; **38**:183-191.

19. Lemozy J, Sirot D, Chanal C, Hue C, Labia R, Dabernat H, and Sirot J. First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) beta-lactamases in *K. pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **33**:2580-2582.
20. Chaibi EB, Sirot D, Paul G, Labia R. Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J Antimicrob Chemother* 1999; **43**:447-58.
21. Bradford P. Extended-spectrum  $\beta$  – lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**: 933-51.
22. Hemalatha V, Padma M, Sekar U, Vinodh TM, Arunkumar AS. Detection of AmpC beta-lactamases production in *Escherichia coli* & *Klebsiellae* by an inhibitor based method. *Indian J Med Res* 2007; 126: 220-223
23. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(3): 440-458.
24. Babini GS and Livermore DM. Are SHV beta-lactamases universal in *K. pneumoniae*? *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**:2230.
25. Pujol M, Peña C. El significado clínico de las betalactamases de espectro extendido. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21: 67-71.
26. Machado E, Coque TM, Canton R, Sousa JC, Peixe L. Emergence of CTX-M beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Portugal: report of na *E. coli* isolate harboring *bla*<sub>CTX-M-14</sub>. *Clin Microbiol Infect* 2004; **10**:755-7.

27. Sabaté M, Tarragó R, Navarro F, Miro E, Vergés C, *et al.* Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *E. coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**:1970-1973.
28. Tzouvelekis L, Tzelepi E, Tassios PT, and Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* 2000; **14**:137-143.
29. Doucet-Populaire F, Ghnassia JC, Bonnet R, Sirot J. First isolation of CTX-M-3-producing *Enterobacter cloacae* in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**:3239-3240.
30. Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo M, and Matsuzawa H. Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaximase-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *E. coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**:2269-2275.
31. Hall L, Livermore DM, Gur D, Akova M, and Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *P. aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**:1637-1644.
32. Danel FL, Hall MC, Gur D, Livermore DM. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *P. aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**:1362-1366.
33. Philippon LN, Naas T, Bouthours AT, Barekett V, and Nordmann P. OXA-18, a classe D clavulanic-acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *P. aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**:2188-2195.

34. Vila J, Navia M, Ruiz J, and Casals C. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding OXA-derived beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; **41**:2757-2759.
35. Afazal-Shah M, Woodford N, and Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26 and OXA-27, molecular classe D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**:583-588.
36. Naas T, Sougakoff A, Casetta A, and Nordman P. Molecular characterization of OXA-20, a novel classe D beta-lactamase, and its Integron from *P. aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**:2074-2083.
37. Nordmann P, Poirel L, Kubina M, Casetta A, and Naas T. Biochemical-genetic characterization and distribution of OXA-22, a chromosomal and inducible class D beta-lactamase from *Rolstonia (Pseudomonas) pickettii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**:2201-2204.
38. Vohaboglu H, Dodanli S, Eroglu C, *et al.* Characterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* strains: molecular epidemiology of PER-1-producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone. *J Clin Microbiol* 1996; **34**:2942-2946.
39. Nordman P, Ronco E, Naas T, Duport C, *et al.* Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **37**:962-969.
40. Vohaboglu H, Hall MC, Mulazimoglu L, Dodanli S, Livermore DM. Resistance to extended-spectrum cephalosporins caused by PER-1 beta-

- lactamase in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. *J Clin Microbiol* 1995; **43**:294-299.
41. Vohaboglu H, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, *et al.* Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**:2265-2269.
  42. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E, *et al.* Characterization of beta-lactamase gene *bla*<sub>PER-2</sub> which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**:616-620.
  43. Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada Ma, Garza-Ramos U, Lara-Lemos R, Ledezma L. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase from *E. coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**:997-1003.
  44. Matsumoto Y, and Inoue M. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A beta-lactamase from *E. cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **43**:307-313.
  45. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the classe 1 integron In52 from *K. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**:622-32.
  46. Albertini MT, Benoit C, Berrouane Y, Boisivon A, Cahen P, Cattoen C, *et al.* Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in Northern France: a five year multicentre incidence study. *J Hosp Infect* 2002; **52**:107-113.

47. Babini GS and Livermore DM. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. Collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. *J Antimicrob Chemother* 2000; **45**:183-189.
48. Melo-Cristino J, Alves AF, Amorim JM, Diogo J, Lito LM, Lopes P *et al.* Estudo multicêntrico de resistência aos antimicrobianos em nove hospitais portugueses. Comparação de resultados num intervalo de uma década. *RPDI* 2006; 2(3): 7-15.
49. Conceição T, Brízio A, Duarte A, Lito LM, Melo Cristino J, Salgado MJ. First description of CTX-M-15 producing *K.pneumoniae* in Portugal. *Ant Ag Chemother* 2005; **49**: 477-478.
50. Simões AT, Ribeiro G, Silva GJ. Detecção  $\beta$  – lactamases de Espectro Alargado do tipo CTX-M nos Hospitais da Universidade de Coimbra. *Bioanálise* 2006; **1**:12-16.
51. Quinn JP, Miiyashiro D, Sahm D, Flamm R, Bush K. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *K. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; **33**:1451-1456.
52. Meyer KS, Urban C, Eagan JA, Berger BJ, and Rahal JJ. Nosocomial outbreak of *Klebsiellae* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Ann Intern Med* 1993; **119**:353-358.
53. Naumovski L, Quinn JP, Miyashiro, D, Patel M, Bush K *et al.* Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended-spectrum beta-lactamase in isolates from cancer patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**:1991-1996.



54. National Nosocomial Infections Surveillance. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002. *Am J infect Control* 2002; **30**:458-475.
55. Caselas JM, and Goldberg M. Incidence of strains producing extended spectrum beta-lactamases in Argentina. *Infection* 1989; **17**:434-436.
56. Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, Labia R *et al.* A novel classe A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brasil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 3061-3068.
57. Cotton MF, Wasserman E, Pieper CH, Theron DC, Fang FC, Campbell G. Invasive disease due to extended spectrum beta-lactamase-producing *K. pneumoniae* in a neonatal unit. *J Hosp Infect* 2000; **44**:13-17.
58. Sompolinsky D, Nitzan Y, Tetry S, Wolk M, Vulikh I, Kern MB *et al.* Integron-mediated ESBL resistance in rare serotypes of *E.coli* causing infections in an elderly population of Israel. *J Antimicrob Chemother* 2005; **55**:119-22.
59. Bell JM, Turnidge JD, Gales AC, Pfaller MA, and Jones RN. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; **42**:193-198.
60. Cheng Y, Li Y, and Chen M. A plasmid-mediated SHV-type extended-spectrum beta-lactamase in Beijing isolate of *E. gergoviae*. *Wei Sheng Wu Xu Bao* 1994; **34**:106-112.
61. Girlich D, Naas T, Leelaporn A, Poirel L, *et al.* Nosocomial spread of the Integron-located VEB-1-like cassette encoding an extended-spectrum

- beta-lactamase in *P aeruginosa* in Thailand. *Clin Infect Dis* 2002; **34**:603-611.
62. Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, *et al.* Molecular epidemiology of the Integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol* 2001; **39**:175-182.
63. Kim J, Lim YM, Young-Sook J, Seol SY. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14 and CTX-M-9 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates in Korea. *Ant Ag Chemother* 2005; **49**: 1572-1575.
64. Ma L, Ishii Y, Ishiguro M, Matsuzawa H, and Yamaguchi K. Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a classe A beta-lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**:1181-1186.
65. Rodrigues-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martinez-Martinez L, Muniain MA, Perea EJ *et al.* Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *E. coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 1089-94.
66. Paterson DL. Looking for risk factors for the acquisition of antibiotic resistance: a 21<sup>st</sup>-century approach. *Clin Infect Dis* 2002; **34**:1564-1567.
67. Machanda V, Singh NP, Kumar A, and Thukral SS. Phenotypic characteristics of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and evaluation of available phenotypic techniques for detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Indian J Med Res* 2005; **122**:330-337.

68. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fourteenth information supplement. January 2004; **24** Number 1.
69. Jarlier V, Nicolas H, Fournier G, and Philippon A. Extended-broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; **10**:867-878.
70. D'Azevedo PA, Gonçalves AL, Musskopf MI, Ramos CG, Dias CA. Laboratory tests in the detection of extended-spectrum beta-lactamase-production: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) *screening* test, the E-test, the double-disk confirmatory test, and cefoxitin susceptibility testing. *Braz J Infect Dis* 2004; **8**:372-7.
71. Sanders CC, Peyret M, Moland ES, Cavalieri SJ, Schubert C, Thompson K *et al.* Potential impact of the VITEK2 System and the advanced expert system on the clinical laboratory of a university-based hospital. *J Clin Microbiol* 2001; **39**:2379-2380.
72. Arbeit RD. *Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms*. In P R Murray (ed), *Manual of Clinical Microbiology*, 7<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington, DC.
73. Spanu T, Sanguinetti M, Tumbarello M, D'Inzeo T, Fiori B, *et al.* Evaluation of the VITEK 2 Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Test for rapid detection of ESBL production in *Enterobacteriaceae* isolates. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 3257-3262.
74. Vercauteren E, Descheemaeker P, Leven M, Sanders CC, and Goossens H. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia*

- coli* and *Klebsiella spp.* In a Belgian teaching hospital. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 2191-2197.
75. Sanders CC, Barry AL, Washington JA, Shubert C, Moland ES, and Traczewski MM *et al.* Detection of extended-spectrum beta-lactamase producing members of the family Enterobacteriaceae with the VITEK ESBL test. *J Clin Microbiol* 1996; **34**:2997-3001.
76. Sanguinetti M, Posteraro B, Spanu T, Ciccaglione D, Romano L, Fiori B *et al.* Characterization of clinical isolates of Enterobacteriaceae from Italy by the BD Phoenix extended-spectrum beta-lactamase detection method. *J Clin Microbiol* 2003; **41**:1463-8.
77. Tenover FC, Mohamed MJ, Gorton TS, and Dembek ZF. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: survey of laboratories in Connecticut. *J Clin Microbiol* 2003; **41**:1463-8.
78. Leverstein-van Hall MA, Fluit AC, Paauw A, *et al.* Evaluation of the E-test ESBL and the BD Phoenix, Vitek1 and Vitek2 automated instruments for detection of extended-spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella sp.* *J Clin Microbiol* 2002; **40**:3703-11.
79. Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, Alberti S, Tomas JM, Benedi VJ, Jacoby GA. Roles of Beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**(7):7669-73.
80. Bisson G, Fishman NO, Patel JB, Edelstein PH *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase producing *E. coli* and *K. pneumoniae* species: risk factors for colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; **23**:254-260.

81. Goldstein FW, Pean Y, and Gertner J. Resistance to ceftriaxone and other beta-lactams in bacteria isolated in the community. The Vigil'Roc Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**:2516-2519.