

Frequência de Isolados Clínicos de *Escherichia coli* Produtores de β -Lactamases de Largo Espectro

*FRANCISCO FREITAS, JOSÉ MIGUEL RIBEIRO, ANA MARIA QUEIRÓS, MANUELA SILVA

*Laboratório de Microbiologia, Serviço de Patologia Clínica,
Hospital S. Teotónio, Viseu*

RESUMO

Foi objectivo deste estudo determinar a frequência de isolados de *E. coli* produtores de β -lactamases de largo espectro (ESBLs) tanto em infecções nosocomiais como da comunidade, e avaliar a susceptibilidade aos antibióticos entre as estirpes produtoras e não produtoras de ESBLs. Dos 131 isolados investigados apenas 9 (6.8%) se enquadraram nos critérios definidos pelo CLSI para screening de ESBLs, e a sua presença foi confirmada por Etest ESBL. Estes isolados provieram maioritariamente de infecções da comunidade em doentes com idade avançada e história de hospitalização prévia. A maioria (66.6%) mostrou resistência simultânea aos β -lactâmicos estudados, às quinolonas e aos aminoglicosídeos.

Palavras chave: *E. coli* • ESBL • Etest ESBL

Aceite para publicação: 8 de Maio de 2006

ABSTRACT

It was the purpose of this study to determine the frequency of extended-spectrum β -Lactamases (ESBLs) producing isolates in *E. coli*, from hospital acquired and community infections, and to evaluate antibiotic susceptibility between ESBL producing and non-producing strains. Of 131 isolates investigated only 9 (6.8%) fulfil CLSI screening criteria for ESBL, and its production was confirmed by ESBL Etest. This strains were mainly recovered from community infections in old aged patients, with an history of previous hospitalisation. The majority (66.6%) showed simultaneous resistance to the studied β -lactams, the quinolones and aminoglycosides.

Key words: *E. coli* • ESBL • Etest ESBL

Accepted for publication: 8 May 2006

*Correspondência:

Laboratório de Microbiologia, Hospital S. Teotónio, Viseu,
Av. Rei D. Duarte, 3500 Viseu.
e-mail: francyske@portugalmail.pt

A produção de β -lactamases de largo espectro (ESBLs) é o principal mecanismo de resistência aos antibióticos entre a família das *Enterobacteriaceae*, nomeadamente em *E. coli* e *K. pneumoniae* (1). Estas enzimas têm a particularidade de hidrolizar as oximinocefalosporinas (cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime e ceftipiroma) e os monobactams. Não são activas contra as cefamicinas (cefexitina e cefotetan) e os carbapenemos, e apresentam como característica serem inibidas pelo ácido clavulânico (2). A maioria deriva de mutações pontuais das enzimas parentais TEM-1, TEM-2 e SHV-1, sendo codificadas principalmente em genes de localização plasmídica, mas também cromossómica (3,4).

Actualmente o Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - anteriormente NCCLS) recomenda o screening de ESBLs em todos os isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* que apresentem CMI $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ frente aos antibióticos cefpodoxima, ceftazidima, aztreonamo, cefotaxima ou ceftriaxona (5). Dado não existirem dados recentes sobre a ocorrência de ESBLs em isolados clínicos de *E. coli* em hospitais portugueses, mas apenas a caracterização de enzimas isoladas em estirpes muito resistentes (6,7), foi nosso objectivo determinar a frequência de estirpes produtoras de ESBLs tanto em infecções nosocomiais como da comunidade, e avaliar a susceptibilidade aos antibióticos entre as estirpes produtoras e não produtoras de ESBLs.

Durante um período de três meses (Janeiro a Março de 2006) 131 isolados de *E. coli* foram investigados no Laboratório de Microbiologia do Hospital S. Teotónio, Viseu. Não se incluíram isolados duplica-

dos, sendo todos de pacientes diferentes. A identificação das estirpes e os testes de susceptibilidade aos antibióticos (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, aztreonamo, ceftazidima, ceftriaxona, ciprofloxacina, gentamicina, imipenemo, nitrofurantoína, cotrimoxazol) foram realizados no aparelho BD Phoenix® (Becton Dickinson, Sparks, USA) com recurso à galeria UNMIC/ID-62 utilizando as *guidelines* do CLSI. Foi usada como controlo a estirpe *E. coli* ATCC 25922.

Para a confirmação da produção de ESBLs utilizámos tiras de Etest ESBL® (AB Biodisk, Solna, Sweden) contendo num dos lados um gradiente de cefotaxima (0.25-16 µg/mL) e no outro lado cefotaxima+ácido clavulânico (0.016-1.0 µg/mL). A interpretação dos resultados foi efectuada segundo a relação CMI da cefotaxima/CMI cefalosporina+ácido clavulânico ≥ 8 , pela aparição duma zona “fantasma” redonda (Fig. 1) ou pela deformação da elipse do lado da cefalosporina. Como controlo positivo e negativo foram usadas as estirpes H50FFUP (produtora de TEM-24) e H6FFUP cedidas pela Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Dos 131 isolados investigados apenas 9 se enquadraram nos critérios definidos pelo CLSI para screening de ESBLs. Estes isolados provieram maioritariamente de infecções da comunidade em doentes com idade avançada e história de hospitalização prévia (Tabela I). Após a execução do Etest confirmatório todos se revelaram produtores de ESBLs, sendo portanto a frequência de 6.8%. No

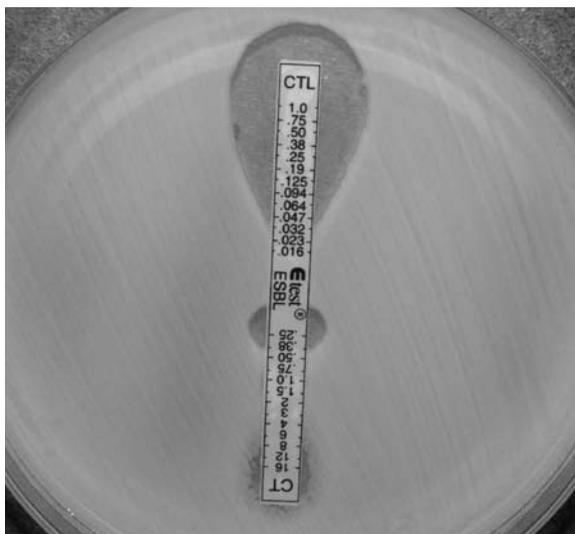


Fig.1 – Exemplo de um Etest ESBL confirmatório positivo (notar a zona “fantasma”).

entanto, se considerarmos a frequência por origem da infecção verificamos que, na infecção nosocomial por *E. coli* 12.5% (3/24) são produtores de ESBLs e na infecção da comunidade 5.6% (6/107). Verificou-se resistência simultânea aos β -lactâmicos estudados, às quinolonas (ciprofloxacina) e aos aminoglicosídeos (gentamicina) em 6 (66.6%) dos 9 isolados.

Quanto à susceptibilidade aos antibióticos nas estirpes não produtoras de ESBLs, verificámos que 54.9% (67/122) foram susceptíveis a todos os antibióticos testados, não se registando resistências ao aztreonamo, ceftriaxona, ceftazidima e imipenemo. A susceptibilidade à ampicilina, cotrimoxazol, amoxicilina/ácido clavulânico, ciprofloxacina, gentamicina e nitrofurantoína foi respectivamente de 57.4%, 77.9%, 81.1%, 89.4 %, 95.9% e 96.5%.

Recentemente, Winokur *et al.* verificaram que a prevalência de ESBLs é maior na América Latina e predominantemente em *K. pneumoniae* (45.4%). A prevalência em *E. coli* variava entre 4.2-8.5% em vários continentes, sendo de 5.3% na Europa (3). Em Espanha vários estudos reportaram prevalências relativamente baixas, variando de 1.55% a 3%, verificando-se também um elevado número de isolados produtores de ESBLs na comunidade. A resistência a antibióticos não β -lactâmicos (cotrimoxazol, ciprofloxacina e gentamicina) foi mais prevalente em isolados resistentes à ampicilina (8-11). Rodriguez-Baño *et al.* identificaram como factores de risco da infecção na comunidade por *E. coli* produtora de ESBLs, a diabetes, o uso de fluoroquinolonas, infecções recorrentes do tracto urinário, admissão hospitalar prévia e idade avançada (12).

Embora no nosso estudo tenhamos sido capazes de detectar a produção de ESBLs em *E. coli* apenas com a cefotaxima como teste confirmatório, relembramos que nem sempre isso é possível devido ao diferente perfil hidrolítico das ESBLs (as famílias TEM e SHV hidrolizam preferencialmente a ceftazidima, e a família CTX-M a cefotaxima), à hiperprodução da enzima indutível AmpC cromossómica e alteração de porinas, especialmente em isolados resistentes à cefoxitina. A presença de β -lactamases resistentes aos inibidores (IRT- β -lactamases) que apresentam mutações na sequência codificante é também uma possibilidade (2,13-16). Daí que o CLSI recomende o

Tabela I - Caracterização das 9 estirpes produtoras de ESBLs.

Caracterização das estirpes				CMIs no BD Phoenix (µg/mL)					CMIs Etest (µg/mL)		
Estirpe	Produto	O. I.	H. P.	AZT	CAZ	CRO	FOX	CIP	GEN	CT	CT/CTL
0676889	Urina	C	Sim	>16	>16	>32	≤4	>2	>8	>16	0.032
0676949	Urina	C	Sim	>16	>16	>32	≤4	>2	>8	>16	0.064
06139319	Urina	C	Sim	>16	>16	>32	≤4	>2	>8	>16	0.094
06157079	Ex.Vaginal	C	Não	16	2	>32	≤4	≤0.125	≤2	>16	0.023
06167119	Sangue	C	Não	8	≤1	>32	≤4	>2	≤2	>16	0.064
06197679	Urina	N	Sim	>16	>16	>32	≤4	>2	>8	>16	0.125
06278439	Pus	N	Sim	>16	>16	>32	≤4	>2	>8	>16	0.064
06287419	Expectoração	N	Sim	>16	>16	>32	≤4	>2	>8	>16	0.094
06361479	Urina	C	Não	8	>16	>32	8	>2	≤2	>16	0.047

Legenda: O. I. – Origem da Infecção; C – Comunidade; N – Nosocomial; H.P. – Hospitalização Prévia; AZT – Aztreonam; CAZ – Ceftazidima; CRO – Ceftriaxona; FOX – Cefoxitina; CIP – Ciprofloxacina; GEN – Gentamicina; CT – Cefotaxima; CT/CTL – Cefotaxima/Cefotaxima+Ácido Clavulânico.

uso simultâneo de pelo menos duas cefalosporinas, a cefotaxima e a ceftazidima (5).

Os genes que codificam as ESBLs são usualmente encontrados em plasmídeos conjugativos, contudo, têm também sido descritos em integroes, que são estruturas genéticas altamente eficientes na captura de cassetes de genes que conferem resistência a vários grupos de antibióticos (aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclina, trimetoprim, sulfonamidas), diminuindo fortemente as opções terapêuticas (17-19).

O controlo e prevenção da infecção (lavagem das mãos) são portanto, altamente prioritários perante pacientes infectados com *E. coli* produtoras de

ESBLs, devendo ser isolados dos restantes doentes de modo a evitar a ocorrência de surtos em enfermarias. A informação do laboratório também é fundamental, pelo que a ficha de resultados deve reportar a presença de ESBL, e resistência a todos os β-lactâmicos excepto aos carbapenemos (15,20).

A frequência encontrada no nosso estudo (6.8%) é semelhante à encontrada para a generalidade da Europa. No entanto, tendo em conta o carácter disseminativo deste tipo de estirpes, deve perspectivar-se uma monitorização subsequente, incluindo a caracterização das enzimas produzidas.

REFERÊNCIAS

- Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**:933-51.
- Steward CD, Rasheed JK, Hubert SK, Biddle JW, Raney PM, Anderson GJ, *et al.* Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum beta-lactamase detection methods. *J Clin Microbiol* 2001; **39**:2864-72.
- Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis* 2001; **32** Suppl 2:S94-103.
- Tolun V, Kucukbasmaci O, Torumkuney-Akbulut D, Catal C, Ang-Kucuker M, Ang O. Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clin Microbiol Infect* 2004; **10**:72-5.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S10. Wayne, PA: NCCLS, 2000.
- Romero L, Lopez L, Rodriguez-Bano J, Ramon Hernandez J, Martinez-Martinez L, Pascual A. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2005; **11**:625-31.

7. Machado E, Coque TM, Canton R, Sousa JC, Peixe L. Emergence of CTX-M beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Portugal: report of an *Escherichia coli* isolate harbouring blaCTX-M-14. *Clin Microbiol Infect* 2004; **10**:755-7.
8. Simões AT, Ribeiro G, da Silva GJ. Detecção de β -Lactamases de Espectro Alargado do tipo CTX-M nos Hospitais da Universidade de Coimbra. *Bioanálise* 2006. *In press*.
9. Yague A, Cebrian L, Rodriguez-Diaz JC, Gonzalo-Jimenez N, Royo G, Campillos P, *et al*. Expanded-spectrum beta-lactamase-producing strains of *E. coli*: origin, characteristics and incidence in Southern Alicante (Spain) in the period 1999-2003. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; **23**:76-9.
10. Hernandez JR, Pascual A, Canton R, Martinez-Martinez L; Grupo de Estudio de Infeccion Hospitalaria. GEIH [Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; **21**:77-82.
11. Oteo J, Campos J, Baquero F; Spanish members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Antibiotic resistance in 1962 invasive isolates of *Escherichia coli* in 27 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2001). *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**:945-52.
12. Rodriguez-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 *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2004; **42**:1089-94.
13. d'Azevedo PA, Goncalves 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.
14. 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.
15. Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother* 2001; **48 Suppl 1**:87-102.
16. 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.
17. Sompolinsky D, Nitzan Y, Tetry S, Wolk M, Vulikh I, Kern MB, *et al*. Integron-mediated ESBL resistance in rare serotypes of *Escherichia coli* causing infections in an elderly population of Israel. *J Antimicrob Chemother* 2005; **55**:119-22.
18. 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 class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**:622-32.
19. Machado E, Canton R, Baquero F, Galan JC, Rollan A, Peixe L, *et al*. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**:1823-9.
20. Pujol M, Peña C. El significado clínico de las betalactamasas de espectro extendido. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; **21**:69-71.