

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Escherichia coli*  
E *Klebsiella* spp PRODUTORAS DE  
BETA-LACTAMASE DE ESPECTRO AMPLIADO**

**CLÁUDIA WOLLHEIM**

**Caxias do Sul**

**2009**

**CLÁUDIA WOLLHEIM**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Escherichia coli***

**E *Klebsiella* spp PRODUTORAS DE**

**BETA-LACTAMASE DE ESPECTRO AMPLIADO**

Tese apresentada ao Programa da Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia

**Orientador:**

Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa

**Co-Orientadores:**

Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray

Prof. Dr. Afonso Luis Barth

**Caxias do Sul**

**2009**

**CLÁUDIA WOLLHEIM**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Escherichia coli***

**E *Klebsiella* spp PRODUTORAS DE**

**BETA-LACTAMASE DE ESPECTRO AMPLIADO**

Tese apresentada ao Programa da Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia.

**Orientador:**

Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa

**Co-Orientadores:**

Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray

Prof. Dr. Afonso Luis Barth

TESE APROVADA EM DOIS DE MARÇO DE DOIS MIL E NOVE

**Orientador:**

---

Prof. Dr. Sergio Olavo Pinto da Costa

**Banca examinadora**

---

Prof. Dra Rita de Cássia Café Ferreira

---

Prof. Dra Ana Paula L. Delamare

---

Prof. Dr. Bernardo Erdtmann

*Aos meus pais, Frank Peter (in memoriam) e Oyara,  
pelo carinho, compreensão e estímulo*

*A minha avó Irma (in memoriam) pelos longos  
anos de amizade que dedicou a mim*

*Ao meu irmão Bob, pelo apoio e amizade*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa, pela eterna disposição de mestre, sabedoria e amor à pesquisa, agradeço pela orientação e amizade desenvolvida durante a realização desse trabalho.

Ao Dr. Sérgio Echeverrigaray, co-orientador, por todo o apoio, amizade, disposição e confiança durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Afonso L. Barth, co-orientador, do Hospital de Clínica de Porto Alegre (UFRGS), pelo apoio e modo particular de transmitir seus conhecimentos de microbiologia clínica e pela amizade de vários anos.

À Dra. Ana Paula L. Delamare e Dr. Bernardo Erdtmann pelas correções e sugestões recebidas.

À Ivani M. F. Guerra e Fernando J. Schreiner, eternos amigos e colegas da Universidade de Caxias do Sul (UCS), pela parceria criada ao longo desses anos. Ao Fernando, meu mestre, desde os tempos da Medicina, pelo exemplo profissional e contribuição importante na minha formação como microbiologista.

Às microbiologistas Patrícia R. Araújo, Dirce S. H. Giovana, Michele Lahude, Ana Paula Diefenthaler e Cristiane Boff, pelo profissionalismo e apoio no encaminhamento das amostras para a execução deste trabalho.

Ao Alfa Laboratório, em especial à Eunice Duarte, supervisora técnica, por disponibilizar as amostras e pela parceria desenvolvida durante a realização desse trabalho.

Às acadêmicas dos cursos de Farmácia, Sheila Hoffmann, Vânia D. Conte, Juliana C. dos Santos, Cláudia Pissaia e Graziella Mazzarolo do curso de Ciências Biológicas, bolsistas, estagiárias, hoje profissionais de primeira, agradeço a colaboração na execução deste trabalho.

À Dra. Larissa Lutz, do Hospital de Clínicas de POA e Dra. Sílvia Costa, da Universidade de São Paulo, pelo apoio na implantação da técnica de PFGE.

A Luciana Bavaresco Touguinha, ao Jucimar Zacaria e a equipe do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada, pela atenção recebida. Ao Jucimar, pelo apoio na técnica de PCR, fotos dos géis e entusiasmo com a ciência.

Às funcionárias do Laboratório de Microbiologia Médica Humana, Simone Pereira Cechinatto e Jaqueline L. da Silva, pelo grande apoio técnico recebido.

Às funcionárias do Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Hospital Geral, Maria de Fátima S. Manique, Roberta M. Gabrielli e Jennifer Schwantes, pela presteza no atendimento.

Às funcionárias do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Cláudia Marques e Lucimara Serafini, por todo o auxílio recebido durante a realização do trabalho.

Aos meus colegas da Unidade de Ensino Médico: Micro-Imunológica e Disciplinas de Microbiologia e Imunologia, Bárbara A. Zoppas, Rita C. Basso, Patrícia R. de Araújo, Liliana Weber, Daniza H. Coelho e Manuel M. Pereira pelo incentivo recebido e amizade.

À Rute T. Ribeiro e ao Aldo Dilon, amigos e colegas, pelo apoio e empréstimo de equipamentos durante o desenvolvimento desse trabalho.

A Universidade de Caxias do Sul e ao Hospital Geral, por terem possibilitado a realização desse trabalho.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL.....	4
2.1. Agentes etiológicos de importância clínica da família <i>Enterobacteriaceae</i> .....	4
2.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.1.2. <i>Klebsiella spp</i> .....	8
2.2. Beta-lactamases .....	13
2.2.1. Nomenclatura das beta-lactamases .....	19
2.2.2. Classificação das beta-lactamases .....	21
2.2.3. Beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL).....	26
2.2.3.1. Definição de ESBL .....	26
2.2.3.2. Diversidade das ESBL .....	30
2.2.3.2.1 Grupo SHV .....	30
2.2.3.2.2 Grupo TEM .....	30
2.2.3.2.3 Grupo CTX-M .....	32
2.2.3.2.4 Outras ESBLs .....	33
2.2.3.3 Epidemiologia global das ESBL .....	35
2.2.3.4 Importância clínica das ESBL.....	38
2.2.3.5 Métodos de detecção laboratorial de ESBL.....	41
2.3 Monitoramento e prevenção da resistência microbiana.....	44
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	50
3.1. Isolamento bacteriano.....	51
3.2. Identificação e caracterização dos pacientes .....	52
3.3. Detecção fenotípica dos isolados de <i>E.coli</i> e <i>Klebsiella spp</i> produtores de ESBL.....	53
3.4. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos .....	54
3.5. Detecção dos genes de beta-lactamases por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	55
3.6. Tipagem molecular por eletroforese em campo elétrico pulsado (PFGE).....	57
3.7. Transferência do gene codificador de ESBL por conjugação .....	58

3.8. Questões éticas .....	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
4.1. Capítulo 1. Prevalence of extended spectrum $\beta$ -lactamase (ESBL) in <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella</i> spp originating in the community and in hospitals in Caxias do Sul, RS, Brazil .....	61
4.1.1. Abstract.....	62
4.1.2. Resumo.....	63
4.1.3. Introdução.....	64
4.1.4. Material e Métodos .....	66
4.1.5. Resultados .....	68
4.1.6. Discussão.....	75
4.1.7. Referencias bibliográficas .....	78
4.2. Capítulo 2. Assessment of screening and confirmatory tests in the detection of extended spectrum $\beta$ -lactamases (ESBL) in clinical isolates of <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella</i> spp.....	83
4.2.1. Abstract.....	84
4.2.2. Introdução.....	85
4.2.3. Material e Métodos .....	86
4.2.4. Resultados .....	88
4.2.5. Discussão.....	95
4.2.6. Referencias bibliográficas .....	99
4.3. Capítulo 3. Disseminação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL) num hospital de ensino situado na região Sul do Brasil.....	101
4.3.1. Resumo.....	102
4.3.2. Introdução.....	103
4.3.3. Material e Métodos .....	105
4.3.4. Resultados .....	109
4.3.5. Discussão.....	118
4.3.6. Referencias bibliográficas .....	122
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	129
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
7. ANEXOS.....	153



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Mecanismo de ação da serina de uma beta-lactamase	17
-----------	---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Tribos, gêneros e espécies da família <i>Enterobacteriaceae</i> associadas às infecções nos seres humanos	6
Tabela 2:	Antimicrobianos beta-lactâmicos	15
Tabela 3:	Origem dos nomes de algumas beta-lactamases	20
Tabela 4:	Classificação funcional e molecular das beta-lactamases	24
Tabela 5:	Sequências iniciadoras utilizadas nas reações de ampliações	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AHA</b>	<i>American Hospital Association</i>
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ASM</b>	Sociedade Americana de Microbiologia
<b>ASM-TFAR</b>	<i>American Society Task Force on Antibiotic Resistance</i>
<b>ATM</b>	Aztreonam
<b>BASC</b>	<i>The British Society for Antimicrobial Chemotherapy Resistance Surveillance Project</i>
<b>CAZ</b>	Ceftazidima
<b>CCIH</b>	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CESP</b>	<i>Citrobacter, Enterobacter, Serratia e Providência</i>
<b>CLSI/NCCLS</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
<b>CPD</b>	Cefpodoxima
<b>CRO</b>	Ceftriaxona
<b>CTX</b>	Cefotaxima
<b>CTX-M</b>	Ativa contra cefotaxima primeiro isolamento em Munique
<b>DAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EaggEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<b>EDTA</b>	Ácido etilnodiaminotetracético
<b>EHEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
<b>EIEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
<b>EPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica; <i>Escherichia coli</i> uropatogênica
<b>EMB</b>	Ágar eosina-azul de metileno
<b>ESBL</b>	Beta-lactamase de espectro ampliado

<b>ETEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>HGCS</b>	Hospital Geral de Caxias do Sul
<b>ITU</b>	Infecção do trato urinário
<b>LB</b>	Meio Luria Bertani
<b>MICRO</b>	Laboratório de Microbiologia Médica Humana
<b>MYSTIC</b>	<i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>ONPG</b>	O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana de Saúde
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PBP</b>	Proteína ligadora de penicilina
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PFGE</b>	Eletroforese em campo elétrico pulsado
<b>Rede RM</b>	Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana
<b>RFLP</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<b>SAME</b>	Serviço de Arquivo Médico
<b>SENTRY</b>	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
<b>SHEA</b>	<i>Society for Healthcare Epidemiology of America</i>
<b>SHV</b>	<i>Sulfhydryl reagent variable</i>
<b>TEM</b>	Temoneira (nome da paciente)
<b>TEST</b>	<i>Tigeciclina Evaluation Surveillance Trial</i>
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

## RESUMO

As beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) representam um importante mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos. Essas enzimas disseminaram-se entre membros da família *Enterobacteriaceae* que causam infecções relacionadas à assistência à saúde, especialmente as nosocomiais. **Objetivos:** (a) Determinar a prevalência de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp produtores de ESBL de origem hospitalar e comunitária; (b) Verificar a origem dos isolados (amostra clínica e unidade de internação); (c) Avaliar a acurácia dos testes fenotípicos de detecção de ESBL; (d) Determinar os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos; (e) Determinar os genes de beta-lactamase; (f) Avaliar o modo de disseminação e; (g) Realizar experimentos de transferência de resistência. **Material e métodos:** Foram avaliados 1346 isolados (1162 *E. coli*, 180 *K. pneumoniae* e 4 *K. oxytoca*), de pacientes internados e ambulatoriais, entre abril de 2003 a maio de 2006, em Caxias do Sul. Um isolado/paciente foi incluído e a infecção hospitalar definida pelo CDC (*Centers for Diseases Control and Prevention*). Pelo método disco-difusão, conforme CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) identificou-se os produtores de ESBL (triagem: aztreonam, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona e cefpodoxima e confirmatório: cefpodoxima, ceftazidima, cefotaxima, com e sem ác. clavulânico). A cefepima foi incluída nos testes. Os isolados foram submetidos a testes de sensibilidade aos antimicrobianos, por disco-difusão, segundo a CLSI; ao método de PCR para detecção dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> e; à tipagem por PGFE. A cepa *E. coli*  $\alpha$ DH, como receptora, foi usada na conjugação e os transconjugantes pesquisados para produção de ESBL e perfil de sensibilidade. **Resultados:** As prevalências de ESBL em nível hospitalar foram: *K. pneumoniae* (43,7%) e *E. coli* (6,7%) e a comunidade, respectivamente, de 2,6% e 0,4%. As vias aéreas (escarro, aspirado traqueal, lavado broncoalveolar), sangue e urina, e as UTIs e Clínica-Cirúrgicas foram as amostras clínicas e unidades de internação com os maiores percentuais de isolados produtores de ESBL. Independente da bactéria analisada, a ceftazidima foi o substrato com o pior desempenho nos testes. Já a cefpodoxima, a cefotaxima, a ceftriaxona e o aztreonam apresentaram sensibilidade de 100% e especificidade >94,0% para isolados de *Klebsiella* spp. Para *E. coli* a cefpodoxima foi o melhor substrato (sensibilidade de 100,0% e especificidade de 75,0%). A cepefima apresentou excelente desempenho. Os isolados de *Klebsiella* spp produtores de ESBL apresentaram taxas de resistência superiores àqueles apresentados pelos isolados não

produtores de ESBL, para vários antimicrobianos beta-lactâmicos e não beta-lactâmicos. Independente da produção de ESBL esses isolados foram sensíveis aos carbapenêmicos e tigeciclina. Foram detectados em *E. coli* e *Klebsiella* spp com fenótipo ESBL os genes de beta-lactamase *bla*<sub>TEM</sub> (89,0%), *bla*<sub>CTX-M</sub> (75,6%) e *bla*<sub>SHV</sub> (35,4%). Foram identificados 22 padrões de PFGE, sendo 11 com mais de um isolado. Esses padrões envolveram 50 isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL, com alta disseminação intra-hospitalar entre as unidades de internação do hospital e por período superior a um ano. Os transconjugantes apresentaram fenótipo de ESBL e resistência aos aminoglicosídeos. **Conclusões:** Nossos resultados mostraram que a produção de ESBL constitui um problema essencialmente nosocomial. Concluimos que a adição da cefepima nos testes de detecção de ESBL leva a um aumento significativo na acurácia para *E. coli*. No entanto, os isolados produtores de ESBL do gênero *Klebsiella* representam o maior problema no hospital. Esses apresentaram ampla variabilidade genômica, indicando forte pressão seletiva de antimicrobianos, mas também disseminação multiclonal, indicando transmissão cruzada e uma situação de endemia dessas bactérias no hospital. Por fim, nossos resultados indicaram uma fácil disseminação de plasmídeos multirresistentes, o que pode representar um impacto importante nas opções terapêuticas para o tratamento de infecções por bactérias produtoras de ESBL.

## ABSTRACT

The extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) represent an important mechanism of resistance to beta-lactam antibiotics. Such enzymes have spread among members of the *Enterobacteriaceae* family, which are responsible for infections related to health care, particularly nosocomial infections. **Objectives:** (a) To determine the prevalence of ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp of hospital and community origin; (b) To verify the origin of the isolates (clinical sample and internment unit); (c) To evaluate the accuracy of the phenotypic tests for ESBL detection; (d) To determine the sensitivity profiles to antimicrobial drugs; (e) To identify the beta-lactamase genes; (f) To evaluate the dissemination way and; (g) To perform experiments of resistance transfer. **Materials and Methods:** 1,346 isolates were evaluated (1,162 *E. coli*, 180 *K. pneumoniae* and 4 *K. oxytoca*), from inpatient and outpatients, between April 2003 and May 2006, in Caxias do Sul. One isolate/patient was included and the nosocomial infection defined by the CDC (*Centers for Diseases Control and Prevention*). By means of the disc-diffusion method, according to the CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), the ESBL producers were identified (screening: aztreonam, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, and cefpodoxime and confirmation: cefpodoxime, ceftazidime, cefotaxime, with and without clavulanic acid). Cefepime was included in the tests. The isolates were submitted to sensitivity tests to antimicrobial drugs, using disc-diffusion, defined by CLSI; to PCR for detecting the *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> genes, and; to PGFE typification. The *E. coli*  $\alpha$ -DH strain was used as the receptor in conjugation experiments and the transconjugants were analyzed with regards to ESBL production and sensitivity profile. **Results:** The ESBL prevalences at the hospital level were: *K. pneumoniae* (43.7%) and *E. coli* (6.7%) and at the community, 2.6% and 0.4%, respectively. The airways (sputum, traqueal aspiration and broncoalveolar lavage), blood, and urine, and the ICUs and surgical units were the clinical samples and the internment units presenting the largest percentages of ESBL producing isolates. Independently of the bacterium, ceftazidime was the substrate which provided the poorest results in the tests. On the other hand, cefpodoxime, cefotaxime, ceftriaxone, and aztreonam showed 100% sensitivity and specificity >94.0% for *Klebsiella* spp isolates. For *E. coli*, the best substrate was cefpodoxime (100% sensitivity and 75.0% specificity).

Cefepime presented excellent performance. The ESBL producing *Klebsiella* spp isolates showed higher resistance rates than the ESBL non-producing strain, for several antimicrobial drugs, either beta-lactamic or not. Irrespectively of ESBL production, these isolates showed sensitivity to carbapenems and tigecyclin. In the *E. coli* and *Klebsiella* spp with the ESBL phenotype, the beta-lactamase genes *bla*<sub>TEM</sub> (89.0%), *bla*<sub>CTX-M</sub> (75.6%) e *bla*<sub>SHV</sub> (35.4 %). Were detected. 22 PFGE patterns were identified, 11 with more than one isolate. These clones comprised 50 isolates of ESBL producing *K. pneumoniae*, with high intra-hospital dissemination among the internment units and for times longer than one year. The transconjugants presented the ESBL phenotype and resistance to aminoglycosides.

**Conclusions:** Our results have shown that ESBL production constitutes an essentially nosocomial problem. We conclude that the addition of cefepime to the ESBL detection tests significantly enhances the accuracy of the test when applied to *E. coli*. However, the ESBL producing isolates of the genus *Klebsiella* represent the main problem in the hospital. These isolates presented great genomic variability, indicating strong selective pressure by antimicrobial drugs, but also multiclonal dissemination, which indicates cross-transmission and an endemic situation of these bacteria in the hospital. Finally, our results indicate an easy spreading of multi-resistant plasmids, what can represent an important impact on the therapeutic options for the treatment of ESBL producing bacteria.

## 1. INTRODUÇÃO

A assistência à saúde é constantemente desafiada por complicações infecciosas relacionadas ao manejo de pacientes. O acentuado avanço tecnológico, na área da saúde, provocou um aumento significativo na aquisição de infecções em grupos de pacientes de alto risco. Como consequência, as infecções nosocomiais tornaram-se cada vez mais frequentes e representam importante problema de saúde pública. Agravando essa situação, a resistência microbiana aos antimicrobianos disponíveis está aumentando rapidamente em todo o mundo, sobretudo no ambiente hospitalar. Hoje, as infecções causadas por bactérias multirresistentes são apontadas como uma das complicações mais frequentes na geração do prolongamento de internação, no aumento da morbidade, na mortalidade e nos custos. Cerca de 70% das bactérias de origem hospitalar apresentam resistência a pelo menos um dos antimicrobianos usualmente administrados; e muitos patógenos de importância clínica apresentam resistência a duas ou mais classes de antimicrobianos.

Devido à gravidade do problema, o combate à resistência microbiana é uma das metas definidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o século XXI. Para o desenvolvimento de ações de controle e prevenção da resistência são necessários esforços direcionados às áreas de educação, incluindo o uso racional de antimicrobianos, de pesquisa e de estudos de vigilância. Os programas de vigilância têm permitido delinear um panorama mundial sobre o perfil da resistência bacteriana tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade. Aqueles que utilizam técnicas de biologia molecular auxiliam nos Programas de Controle de Infecção ao oferecer perspectivas para o melhor conhecimento da resistência aos antimicrobianos e às epidemias.

As principais bactérias multirresistentes que causam infecções nosocomiais no nosso meio incluem tanto cocos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e *Enterococcus* resistentes à vancomicina) quanto bacilos Gram-negativos. Entre



os bacilos Gram-negativos, três são particularmente considerados problemáticos, também em nível mundial: *Acinetobacter* spp e *Pseudomonas aeruginosa*, resistentes aos carbapenêmicos e às bactérias da família *Enterobacteriaceae*, produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado.

As espécies de *Klebsiella* e a *Escherichia coli* estão entre as enterobactérias mais isoladas nos laboratórios clínicos e são uma importante causa de infecções comunitárias e nosocomiais. Como a maioria dos bacilos Gram-negativos hospitalares, essas espécies têm sido resistentes a múltiplos antimicrobianos, devido à produção de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL).

As beta-lactamases representam o principal mecanismo de resistência dos bacilos Gram-negativos à numerosa classe de antimicrobianos, amplamente utilizada, que constitui os beta-lactâmicos. As beta-lactamases de espectro ampliado, pela crescente disseminação entre patógenos e pelo amplo espectro de ação, assumem significativa importância clínica e terapêutica. As infecções causadas por produtores de ESBL impedem o uso de todas as penicilinas, cefalosporinas de primeira a quarta gerações, as combinações com os inibidores de beta-lactamase e o monobactâmico. Somados aos problemas clínicos e terapêuticos, existem aqueles de ordem laboratorial. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos de rotina pode não revelar os isolados produtores da enzima ESBL e liberar um resultado considerado “erro muito grave”, qual seja, de falsa-sensibilidade, predizendo falha terapêutica. E dessa maneira, esse teste perderia as suas funções primordiais que são a de orientar na escolha mais adequada da terapia antimicrobiana, a de monitorizar a evolução da resistência bacteriana e a de auxiliar na implantação de medidas efetivas que controlem a disseminação de bactérias multirresistentes.

Dados nacionais sobre a resistência bacteriana assim como sobre o uso de antimicrobianos ainda são escassos. Todavia, com a implantação, em 2004, da Rede

Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde, em parceria com a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública, certamente teremos um significativo aumento no conhecimento sobre o comportamento das infecções relacionadas à assistência à saúde no Brasil.

Nesse contexto, no presente trabalho, as bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp foram estudadas com o objetivo geral de contribuir para o conhecimento da epidemiologia dessas bactérias, produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL), e os objetivos específicos de: determinar a prevalência de isolados de *E. coli* e *Klebsiella* spp, produtores de beta-lactamase de espectro ampliado, de origem hospitalar e comunitária; verificar a origem desses isolados, produtores de ESBL, quanto ao material clínico e à unidade de internação do paciente; avaliar a acurácia dos testes fenotípicos de detecção de isolados, produtores de ESBL; determinar os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados, produtores de ESBL; determinar os genes de beta-lactamase presentes nos isolados, produtores de ESBL; avaliar o modo de disseminação dos isolados, produtores de ESBL, pelo estudo da similaridade genética e realizar experimentos de transferência de resistência por conjugação.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL**

### **2.1 Agentes etiológicos de importância clínica da família *Enterobacteriaceae***

A família *Enterobacteriaceae* é composta por um grupo grande e heterogêneo de bacilos Gram-negativos de importância médica e científica que se caracterizam por serem anaeróbios facultativos, fermentadores, reduzem o nitrato a nitrito, não apresentam citocromo oxidase e crescem rapidamente numa variedade de meios de cultura seletivos ou não. São bactérias não esporuladas, imóveis ou, quando móveis, dotadas de flagelos peritríquios (Farmer, 2003; Winn *et al.* 2006).

Antes do advento dos antimicrobianos, da quimioterapia e das medidas imunossupressoras, as doenças infecciosas de etiologia por enterobactérias estavam relativamente bem definidas. Entretanto, hoje essas bactérias são consideradas potenciais patógenos associados a infecções virtualmente em qualquer topografia e correspondem a cerca de 80% dos isolados significativos de bactérias Gram-negativas em laboratórios clínicos (Eisenstein & Zaleznik, 2000).

De acordo com a clínica, as enterobactérias podem ser divididas em patógenos intestinais primários e patógenos oportunistas, sendo consideradas os principais agentes de infecções comunitárias do trato urinário. Estão entre os mais importantes agentes causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde, em especial às nosocomiais, incluindo pneumonias, infecções do trato urinário, infecções da corrente sanguínea e infecção de sítio cirúrgico (Ronald *et al.* 2001).

Os membros da família *Enterobacteriaceae* são amplamente distribuídos no solo, em vegetais, na água e encontrados como componentes da microbiota do trato digestório de animais e seres humanos. Com poucas exceções, podem também colonizar sítios extra-intestinais, incluindo pele e nasofaringe, especialmente em indivíduos hospitalizados (Eisenstein & Zaleznik, 2000).

A classificação da família *Enterobacteriaceae* em sete tribos é um método conveniente para agrupar, dentro de uma família, os gêneros principais que compartilham reações bioquímicas e importância diagnóstica semelhantes. Segundo Farmer *et al.* (1985), até 95% de todas as enterobactérias isoladas nos laboratórios clínicos são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Mais de 99% desses isolados relacionados às infecções em seres humanos pertencem a apenas 23 espécies, e menos de 1% representam o isolamento de novos gêneros e espécies advindos de estudos que avaliam a similaridade genética, como se pode observar, na **Tabela 1**.

Vários gêneros da família *Enterobacteriaceae*, incluindo as espécies *E. coli* e *Klebsiella*, objeto deste estudo, e de bacilos Gram-negativos não-fermentadores (*Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*) têm sido considerados problemáticos devido ao aumento nas taxas de resistência aos antimicrobianos, em especial quando relacionados a infecções adquiridas no ambiente hospitalar (Paterson & Bonomo, 2005; Slama, 2008).

**Tabela 1:** Tribos, gêneros e espécies da família *Enterobacteriaceae* associadas às infecções nos seres humanos.

<b>Tribo</b>	<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>	
I	Escherichieae	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
		<i>Shigella</i>	Grupos A, B, C <i>S. sonnei</i>
II	Edwardsielleae	<i>Edwardsiella</i>	<i>E. tarda</i>
III	Salmonelleae	<i>Salmonella</i>	<i>S. enterica</i> (grupos I, II, IIIa, IV, V) <i>S. sorogrupo Typhi</i>
IV	Citrobactereae	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i> <i>C. koseri</i>
V	Klebsielleae	<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i> <i>K. oxytoca</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes</i> <i>E. cloacae</i>
		<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>
		<i>Pantoea</i>	<i>P. agglomerans</i>
		<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>
VI	Proteeae	<i>Proteus</i>	<i>P. vulgaris</i> <i>P. mirabilis</i>
		<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>
		<i>Providencia</i>	<i>P. rettgeri</i> <i>P. alcalifaciens</i> <i>P. stuartii</i>
VII	Yersinieae	<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
--	Não definida	<i>Buttiauxella</i> , <i>Cedecea</i> , <i>Ewingella</i> , <i>Kluyvera</i> , <i>Leclercia</i> , <i>Leminorella</i> , <i>Moellerella</i> , <i>Photorhabdus</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Tatumella</i>	

**Fonte:** Adaptado de Winn *et al.* 2006.

### 2.1.1 *Escherichia coli*

Das cinco espécies do gênero *Escherichia*, a *E. coli* é a mais frequentemente isolada em amostras clínicas humanas, tendo sido descoberta em 1895 pelo pediatra alemão Theodore Escherich. De grande interesse científico, deve-se aos estudos da *E. coli* K12 (e seus derivados) parte dos conhecimentos sobre metabolismo intermediário, recombinação

genética, replicação do DNA, transcrição do RNA, síntese e exportação de proteínas e da patogenicidade das bactérias. Representa um importante agente patogênico de infecções tanto adquiridas na comunidade quanto hospitalares (Eisenstein & Zaleznik, 2000; Campos, *et al.* 2005).

A *E. coli* faz parte da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis, causando infecções extra-intestinais e intestinais (cepas diarréicas não constituintes da microbiota), tanto em pessoas saudáveis como em imunocomprometidos. Há pelo menos seis variedades de *E. coli* diarréicas denominadas: (1) ETEC - *E. coli* enterotoxigênica; (2) EHEC - *E. coli* enterohemorrágica (O157:H7); (3) EIEC - *E. coli* enteroinvasiva; *E. coli* enteroaderente com três subtipos distintos: (4) EPEC - *E. coli* enteropatogênica; (5) EaggEC - *E. coli* enteroagregativa e ; (6) DAEC - *E. coli* difusamente aderente (Procop & Cockerill III, 2004).

Embora virtualmente todos os microrganismos sejam capazes de causar ITU, a *E. coli* é responsável pela maioria das infecções. As cepas uropatogênicas de *E. coli* (UPEC) são selecionadas da microbiota fecal pela presença de fatores de virulência, que aumentam a colonização das células vaginais e periuretais, a fixação ao uroepitélio e a invasão dos tecidos (Wilson & Henry, 2004). A *E. coli* é o patógeno mais isolado (80 a 85%) nas infecções do trato urinário (ITU) adquiridas na comunidade (Ronald *et al.* 2001) e em menor grau (50%) a nível hospitalar ou associado com anormalidades estruturais do trato urinário (Stamm & Norrby, 2001). As bacteremias, infecções respiratórias e meningite neonatal causadas por *E. coli* são mais frequentemente observadas em pacientes neonatos ou idosos, naqueles com doenças que comprometem a resposta imunológica e ITUs em pacientes hospitalizados ou institucionalizados, em geral associadas à presença de sonda vesical (Eisenstein & Zaleznik, 2000).

No estudo realizado pelo Programa de Vigilância SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*), os bacilos Gram-negativos foram responsáveis por mais de 53,8 % das infecções hospitalares no Brasil. A *E. coli* foi a espécie Gram-negativa mais frequentemente isolada, correspondendo a 13,8 % do total de isolamentos, seguida por *Pseudomonas aeruginosa* (13,3%), *Klebsiella pneumoniae* (8,5%), *Enterobacter* spp (7,9%) e *Acinetobacter* spp (6,7%) (Sader *et al.* 2001).

Em meios de cultura seletivos e diferenciais, a *E. coli* apresenta distintas características coloniais, produzindo colônias negras esverdeadas com brilho metálico em ágar eosina-azul de metileno (EMB) ou colônias rosadas (lactose positivas) em ágar MacConkey. Caracteristicamente as cepas de *E. coli* estão associadas com as propriedades bioquímicas de fermentação de lactose, produção de indol a partir do triptofano, fermentação de glicose pela via de ácidos mistos (prova de vermelho de metila positiva) e Voges-Proskauer negativo. Não produzem H<sub>2</sub>S, DNase, urease ou fenilalanina desaminase e não utilizam citrato como fonte de carbono (Bopp *et al.* 2003; Winn *et al.* 2006).

A maioria das cepas de *E. coli* é móvel, em geral possui adesinas fimbriais, pili sexual, toxinas e antígenos O (lipopolissacarídeo), H (flagelo) e K (cápsula). Os antígenos do grupo O mostram acentuada reação cruzada com os das espécies de *Shigella*, razão pela qual foram agrupados na mesma tribo Escherichieae conforme mostrado na **Tabela 1** (Bopp *et al.* 2003; Winn *et al.* 2006).

### **2.1.2 *Klebsiella* spp**

O gênero *Klebsiella*, nome dado em homenagem ao bacteriologista alemão Edwin Klebs em 1885, pertencente à tribo Klebsielleae conjuntamente com outros gêneros (*Enterobacter*, *Hafnia*, *Pantoea* e *Serratia*). Como bactérias ubíquitas, a Tribo Klebsielleae é composta por gêneros amplamente distribuídos na natureza, isolados no solo,

em vegetais, na água e como colonizadores de mucosas em animais e seres humanos. A esse respeito, o gênero *Klebsiella* é semelhante ao *Enterobacter* e ao *Citrobacter*, mas difere das espécies de *Shigella* e da *E. coli*, as quais são comuns em humanos, mas não são ambientais (Podschun & Ullmann, 1998).

O gênero *Klebsiella* vem sofrendo profundas modificações quanto a sua taxonomia. Originalmente, foi dividido em três espécies correspondentes às doenças por elas causadas: *K. pneumoniae* (pneumonia), *K. ozaenae* (rinite atrófica) e *K. rhinoscleromatis* (rinoscleroma). O rinoscleroma e a rinite atrófica são infecções de origem comunitárias, crônicas e granulomatosas do trato respiratório superior mais frequentes em regiões tropicais (Abbott, 2003).

O desenvolvimento das metodologias moleculares para identificar e classificar as bactérias tem conduzido no caso do gênero *Klebsiella*, a frequentes revisões taxonômicas (Martínez *et al.* 2004). Uma das primeiras modificações foi a reclassificação das espécies de *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis* como subespécies de *K. pneumoniae* (Brenner, *et al.* 1972). Na década de 1980, novas espécies foram descritas incluindo *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* e *K. trevisanii* (Bagley *et al.* 1981; Izard *et al.* 1981; Sagasaki *et al.* 1989). Na última década, a estrutura filogenética do gênero *Klebsiella* tem sido constantemente reanalisada. São exemplos de algumas das alterações que ocorreram: (1) A *Calymmatobacterium granulomatis*, agente etiológico de úlcera genital de caráter crônico e predominante em países tropicais, foi renomeada de *K. granulomatis*; (2) Um novo gênero (*Raoultella*) foi proposto para acomodar as espécies *K. ornithinolytica* e *K. planticola* (anteriormente designada *K. trevisanii* e *K. terrigena*); (3) Uma nova espécie de *Klebsiella* foi descrita: *K. variicola* (mais adaptada ao ambiente e ocasionalmente relacionada à infecção em humanos) e; (4) A determinação de quatro subgrupos dentro da espécie de *K. pneumoniae* e de cinco para *K. oxytoca*, baseados na variação nucleotídica de



vários genes, incluindo o sequenciamento do gene *bla<sub>OXY</sub>*, no caso da *K. oxytoca* (Podschun & Ullmann, 1998; Brisse *et al.* 2004; Martínez *et al.* 2004; Fevre *et al.* 2005).

A *K. pneumoniae* foi o patógeno classicamente descrito por Friedländer (bacilo de Friedländer) como causa de pneumonia lobar adquirida na comunidade, particularmente em pessoas com alcoolismo crônico. Essa pneumonia é caracterizada por uma grave infecção piogênica e por apresentar altas taxas de mortalidade. Como agente de infecções comunitárias, a *K. pneumoniae*, é um patógeno com potencial de ocasionar ITUs, pneumonia, bacteremia e infecções supurativas focais, incluindo abscesso hepático e suas graves complicações, como meningite e endoftalmite. Algumas manifestações das infecções adquiridas na comunidade, especialmente pneumonia, bacteremia e abscesso hepático, são geograficamente restritas. Embora a razão dessa diversidade não tenha sido totalmente esclarecida, estudos são dirigidos às características de virulência da *K. pneumoniae* e a interação com variáveis do hospedeiro (Eisenstein & Zaleznik, 2000; Yeh *et al.* 2007; Yu *et al.* 2007).

Entretanto, as *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* são patógenos muito mais relacionados a infecções nosocomiais, causando infecções como ITUs, da corrente sanguínea, trato respiratório baixo, intra-abdominais, trato biliar, meningite neonatal e infecção de ferida operatória, em especial a *K. pneumoniae* e menos frequentemente a *K. oxytoca* (Winn *et al.* 2006).

Como patógenos oportunistas, atingem frequentemente pacientes nos extremos da faixa etária e com doenças de base, como *diabete mellitus*, doença pulmonar obstrutiva crônica ou doença neoplásica que levam ao comprometimento da resposta imunológica (Eisenstein & Zaleznik, 2000). A *K. pneumoniae* é responsável por cerca de 5% das ITUs comunitárias, sendo significativamente mais comum em pacientes diabéticos e hospitalizados (Ronald & Ludwig, 2001)

Na Europa, América Latina e do Norte, as *Klebsiella* spp foram responsáveis por 7 a 10% das bacteremias adquiridas no hospital, segundo dados reportados, no período de 1997 e 2002 pelo Programa SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*) (Biedenbach *et al.* 2004). Na América Latina, segundo dados publicados por Gales *et al.* (1997), a *K. pneumoniae* representou o terceiro patógeno mais prevalente do trato respiratório de pacientes hospitalizados com pneumonia, correspondendo a 12% do total de patógenos isolados.

A espécie *K. pneumoniae* está presente nos seres humanos colonizando a nasofaringe e o trato digestório em taxas que variam conforme o estudo. No entanto os índices aumentam drasticamente no ambiente hospitalar, apresentando uma razão direta com o tempo de internação do paciente e o uso de antimicrobianos (Gupta, 2002). Em um trabalho de revisão, Podschun & Ullmann (1998), encontraram relatos de elevadas taxas de portadores em pacientes internados, assim distribuídos: 77% (fezes), 19% (orofaringe) e 42% (mãos), incluindo altos valores de contaminação nas mãos dos profissionais da saúde. O trato digestório dos pacientes e as mãos do profissional de saúde representam os principais reservatórios de transmissão a nível hospitalar, além da contaminação de diversos equipamentos médicos.

Em meios de cultura seletivos e diferenciais, como ágar MacConkey, as colônias de *Klebsiella* spp são tipicamente grandes, brilhantes, quase sempre de aspecto mucóide (presença de cápsula) e rosadas pela fermentação da lactose. São imóveis, ornitina descarboxilase negativas, utilizam citrato com fonte de carbono e a maioria hidrolisa uréia e produz acetoina como produto final da fermentação de glicose (reação de Voges-Proskauer positivo). A produção de indol é a prova mais utilizada para separar as duas espécies principais, *K. pneumoniae* é indol-negativa e *K. oxytoca* é indol-positiva, no entanto, outras espécies, incluindo espécies do gênero *Raoultella* podem compartilhar essas mesmas

características evidenciando a complexidade da taxonomia do gênero *Klebsiella* (Abbott, 2003; Winn *et al.* 2006). Essa complexidade taxonômica torna necessária a utilização de testes fenotípicos, assim como genotípicos (Alves *et al.* 2006).

As cepas de *Klebsiella* spp não mucóides podem ter aparência semelhante a colônias de espécies de *Enterobacter*, entretanto, essas últimas são móveis e possuem ornitina descarboxilase. No entanto, foram observadas cepas de *Enterobacter* spp cuja mobilidade e a presença de ornitina descarboxilase foram evidenciados somente após 24h de incubação (Claeys *et al.* 2004). Além disso, o gênero *Enterobacter* apresenta resistência intrínseca a cefamicinas, ainda pouco comum entre o gênero *Klebsiella* que, por outro lado, são resistentes à ampicilina (Abbott, 2003; Winn *et al.* 2006).

A *K. pneumoniae* produz um grande número de fatores de virulência, incluindo adesinas fimbriais, sideróforos, antígenos O e K ou capsulares. A cápsula é considerada a principal propriedade de virulência, sendo reportados pelo menos 77 distintos tipos capsulares polissacarídicos que contribuem para a patogênese através da resistência à fagocitose e à ação de fatores bactericidas no soro, além de proteção contra dessecação e aderência (Schembri *et al.* 2005; Rosen *et al.* 2008). Estudos de prevalência de tipos capsulares têm como objetivo verificar a viabilidade de opção terapêutica de imunoprofilaxia por meio de vacinas (Jenney *et al.* 2006).

Como a maioria dos bacilos Gram-negativos hospitalares, os isolados de *Klebsiella* spp podem ser multirresistentes, e eles representam uma importante fonte de disseminação de resistência bacteriana no ambiente hospitalar. Essa condição tem sido observada mundialmente nos últimos 25 anos, especialmente àquelas produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado que conferem resistência a muitos antimicrobianos beta-lactâmicos (Archibald, 2004).

## 2.2 Beta-lactamases

O grupo dos antimicrobianos beta-lactâmicos reúne as drogas mais frequentemente utilizadas na prática clínica para o tratamento de infecções hospitalares e comunitárias. Essas drogas cujo mecanismo de ação apresenta efeitos sobre a integridade da parede celular bacteriana, interferem na síntese de peptidoglicano e consequente destruição da bactéria. Pertencem a esse grande grupo quatro classes de antimicrobianos: as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenêmicos, conforme mostrado na **Tabela 2** (Tavares, 2002).

Paralelamente à disponibilização de novas classes de agentes antimicrobianos que ocorreu por muitos anos, mas que atualmente vem diminuindo drasticamente, o ritmo do desenvolvimento de resistência em patógenos clinicamente importantes tem crescido de forma inexorável, tanto em Gram-positivos como Gram-negativos. Esse crescimento representa um constante desafio terapêutico em termos mundiais (Rossi & Andreazzi, 2005; Sader, 2005).

Pesquisas sobre o assunto apontam quatro mecanismos de resistência bacteriana aos beta-lactâmicos: (1) alteração do sítio de ação do antimicrobiano ou das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs); (2) Alteração da permeabilidade da membrana externa; (3) Efluxo ativo e; (4) Inativação enzimática principalmente mediante a produção de beta-lactamases (McManus, 1997; Depardieu, *et al.* 2007).

Ao se ligarem às PBPs, os antimicrobianos beta-lactâmicos inibem as enzimas envolvidas nas etapas finais da constituição e do arranjo da parede celular das bactérias em multiplicação. Isso leva à formação de um peptidoglicano imaturo e, como consequência, ocorre a lise bacteriana. No entanto, se esse sítio for alterado, a droga não poderá efetivar a ligação e tornar-se-á ineficiente contra a bactéria. Esse representa o principal mecanismo de resistência em cocos Gram-positivos (gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e

*Enterococcus*) e em algumas bactérias Gram-negativas fastidiosas (*Neisseria gonorrhoeae*) (Sanders & Sanders, 1992; Depardieu, *et al.* 2007).

**Tabela 2:** Antimicrobianos beta-lactâmicos

<b>Classe de beta-lactâmico</b>	<b>Subclasse</b>	<b>Discriminação do agente</b>	<b>Data aproximada uso clínico</b>
Penicilinas naturais	Benzilpenicilina (Penicilina G)		1943
	Fenoximetilpenicilina (Penicilina V)		1948
Penicilinas de largo espectro	Aminopenicilinas	Ampicilina	1961
	Penicilinas de 2ª geração	Amoxicilina	1970
	Carboxipenicilinas	Carbenicilina	1967
	Penicilinas de 3ª geração	Ticarcilina	1970
Penicilinas de largo espectro	Ureidopenicilinas	Azlocilina	1976
	Penicilinas de 4º geração	Piperacilina	1976
		Mezlocilina	1977
Penicilinas semi-sintética	Penicilinas estáveis Oxacilina, metecilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina		1ºs anos 1960
Penicilinas associadas a inibidores de beta-lactamases	Ticarcilina/ác.clavulânico Piperacilina/tazobactam	Amoxicilina/ác.clavulânico Ampicilina/sulbactam	1ºs anos 1980
Cefalosporinas	1ª geração	Cefazolina Cefalotina Cefapirina Cefadroxil	1ºs anos 1960
	2ª geração	Cefomandol	1972
		Cefuroxima	1975
		Cefaclor	1975
		Cefonicida	1978
Cefamicinas	Cefoxitina Cefotetan	1972 1980	
3ª geração	Cefotaxima	1981	
	Cefoperazona	1979	
	Ceftriaxona	1980	
	Ceftazidima	1982	
	Cefpodoxima	1986	
4ª geração	Cefpiroma	1983	
	Cefepime	1984	
Monobactâmico	Aztreonam		1981
Carbapenêmicos	Imipenem		1979
	Meropenem		1987
	Ertapenem		1996

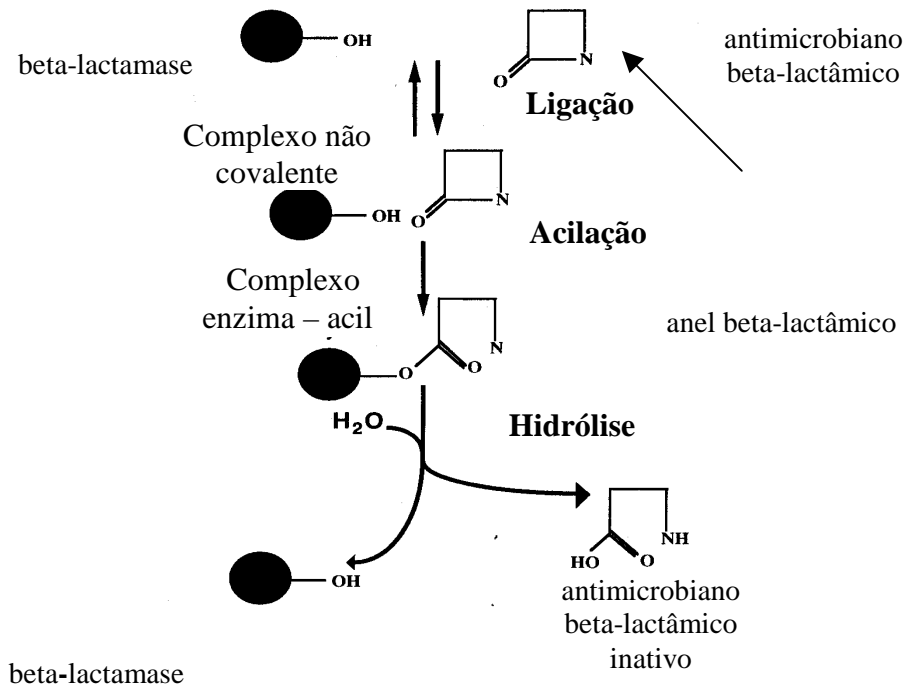
**Fonte:** Adaptado de Rossi & Andreazzi (2005); Tavares (2002).

A alteração da permeabilidade da membrana externa constitui um mecanismo de resistência nas bactérias Gram-negativas que ocorre quando há perda ou alteração das proteínas de membrana ou porinas, modificando assim a penetração e conseqüentemente a ação dos beta-lactâmicos. Esse mecanismo via porinas é restrito às bactérias Gram-negativas, devido à inexistência de membrana externa nas Gram-positivas. Os compostos beta-lactâmicos passam facilmente pela camada de peptidoglicano nas células Gram-positivas, enquanto que, nas Gram-negativas são transportados para o interior da célula principalmente através das porinas (Winn *et al.* 2006). Esse mecanismo tem sido descrito em *Pseudomonas aeruginosa*, mas também entre membros da família *Enterobacteriaceae*.

A propriedade de expulsar ativamente os antimicrobianos para fora da célula diminuindo, assim a sua concentração intracelular, tem sido observada em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Podem levar a resistência a uma variedade de antimicrobianos, incluindo beta-lactâmicos. A resistência aos carbapenêmicos em Gram-negativos, em particular, pode ser devido a bomba de efluxo, a redução da permeabilidade e a síntese de beta-lactamases (Depardieu, *et al.* 2007; Rahal, 2008).

O principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas aos beta-lactâmicos é decorrente da produção de beta-lactamases (Livermore, 1995; McManus, 1997). As beta-lactamases são enzimas que catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico, impossibilitando, desta maneira, a sua atividade antimicrobiana através de dois possíveis mecanismos de ação: (1) aquele que utiliza o zinco como co-fator para a atividade enzimática e, (2) aquele que atua via éster de serina. Poucas beta-lactamases possuem o primeiro tipo de mecanismo, e são chamadas de metalo-beta-lactamases (classe B de Ambler). A maioria apresenta a via serina como o mecanismo de ação (classes A, C e D de Ambler). Nesse caso, o anel beta-lactâmico é atacado pela hidroxila livre da cadeia lateral do resíduo de serina localizado no sítio ativo da enzima, produzindo um éster acil covalente,

que sofre uma hidrólise e libera a enzima ativa e o hidrolizado, que é a droga inativada (**Figura 1**) (Waley, 1987).



**Figura 1:** Mecanismo de ação da serina de uma beta-lactamase (Waley, 1987).

Vários fatores podem ser determinantes para que uma beta-lactamase confira resistência a um antimicrobiano beta-lactâmico. Entre eles estão: (1) a localização celular da beta-lactamase; (2) a taxa de hidrólise da enzima, dependente da concentração da droga e da velocidade com que o antimicrobiano penetra pela membrana externa das Gram-negativas; (3) a afinidade do beta-lactâmico pela beta-lactamase; (4) o tipo de beta-lactamase e; (5) as condições físico-químicas laboratoriais (pH, concentrações de Zn e  $CO_2$ ) (Livermore, 1991; Sanders & Sanders, 1992; Livermore, 1995; Medeiros, 1997).

Nas bactérias Gram-positivas, as beta-lactamases são secretadas para o meio extracelular, diluindo-se no meio. Já nas bactérias Gram-negativas as beta-lactamases por estarem localizadas no espaço periplasmático da parede celular, podem alcançar altas concentrações e maior eficácia, e por essa razão representam o principal mecanismo de



resistência das bactérias Gram-negativas aos antimicrobianos beta-lactâmicos (Livermore, 1995; McManus, 1997).

Os genes que codificam as beta-lactamases, variam de acordo com a localização, o modo de expressão e o tipo de transferência. A localização desses genes pode ser no DNA cromossômico, ou no extracromossômico bacteriano. As beta-lactamases podem ser constitutivas quando produzidas independentemente da presença do antimicrobiano ou induzíveis quando determinados agentes antimicrobianos estimulam, inclusive em graus variáveis, a produção da enzima pela bactéria (Livermore, 1991; Livermore, 1995).

Nas beta-lactamases mediadas por elementos extracromossômicos, os genes podem estar em elementos móveis como plasmídios que são de replicação independente do cromossomo ou podem estar em transposons que são segmentos de DNA que se movem pelo genoma. Esses transposons podem conter integrons ou elementos que capturam e mobilizam genes contidos em cassetes. Os plasmídios podem conter informações que confiram vantagens seletivas à bactéria (plasmídios virulentos), bem como resistência a muitos agentes antimicrobianos (plasmídios ou fatores R = resistência) ou confiram habilidade de dirigir a sua transferência de uma célula para outra (plasmídios conjugativos) (Coque *et al.* 2002; Padilha & Costa, 2004).

Os genes de localização extracromossomal podem ser transferidos horizontalmente entre as diferentes espécies de bactérias, e dessa forma, determinados fenótipos resistentes ou multirresistentes são capazes de se expandir rapidamente. Esse é um dos motivos pelo quais as beta-lactamases mediadas por plasmídio ou transposons representam um problema clínico (Nijssen *et al.* 2005).

O mecanismo mais comum pelo qual ocorre a transferência gênica nas bactérias Gram-negativas é a conjugação que ocorre pelo contato físico entre duas células realizado pela pili sexual. A bactéria doadora é portadora de um plasmídio conjugativo F (fator de

fertilidade) o qual possui genes que codificam o pili sexual. Esses genes podem, também, efetuar a transferência de outros plasmídios não-conjugativos corresidentes na mesma célula, assim como, são capazes de integrar-se no cromossomo, o que tornaria possível a mobilização do cromossomo bacteriano durante a conjugação (Padilha & Costa, 2004).

Outros mecanismos de transferência genética incomuns em Gram-negativos são a transdução e a transformação. A primeira se caracteriza por uma troca genética via bacteriófago e a segunda por transferência direta de DNA livre entre espécies compatíveis (Padilha & Costa, 2004).

Considerando que as beta-lactamases representam o principal mecanismo de resistência dos bacilos Gram-negativos aos antimicrobianos beta-lactâmicos, diversas nomenclaturas foram utilizadas ao longo dos anos para nomeá-las. Essa diversidade na nomenclatura, em parte, dificultou a sistematização do seu estudo.

### **2.2.1 Nomenclatura das beta-lactamases**

Inicialmente as beta-lactamases foram nomeadas segundo a cepa de origem ou plasmídio, entretanto, a partir da década de 1970, com a aplicação da técnica de focalização isoelétrica, um grande número de beta-lactamases foram descobertas, surgindo, assim, uma diversidade de formas de nomeá-las. Como se pode observar, na **Tabela 3**, existem beta-lactamases denominadas segundo a preferência de substrato, as propriedades bioquímicas, as peculiaridades na sequência, a localidade ou nome do hospital cuja bactéria foi isolada, a localização do gene no cromossomo, a cepa ou o nome do paciente de origem, incluindo o nome do investigador (Bush & Jacoby, 1997; Jacoby, 2006; <http://www.lahey.org/studies>).

**Tabela 3:** Origem dos nomes de algumas beta-lactamases

Beta-lactamase	Origem	Beta-lactamase	Origem
ACT	<u>AmpC</u> <i>type</i>	Mbl	<u>Metallo-β</u> -lactamase
BES	<u>Brasil</u> <i>extended spectrum</i>	MIR	Descoberta no Hospital <u>Miriam</u>
CAZ	Ativa contra <u>ceftazidime</u>	Nme, NMC	<u>Not metalloenzyme</u> <u>carbapenemase</u>
CcrA	<u>Cefoxitin</u> e <u>carbapenem</u> <i>resistant</i>	OXA	Ativa contra <u>oxacilin</u>
CTX	Ativa contra <u>cefotaxime</u>	PER	<u>Pseudomonas</u> <i>extended resistant</i> e também as iniciais dos investigadores: <u>Patrice</u> , <u>Esthel</u> e <u>Roger</u>
CTX-M	Ativa contra <u>cefotaxime</u> , primeiro isolamento em <u>Munique</u>	PSE	<u>Pseudomonas-specific</u> <u>enzyme</u>
GES	<u>Guiana</u> <i>extended spectrum</i>	SHV	<u>Sulphydryl reagent</u> <u>variable</u>
IMP	Ativa contra <u>imipenem</u>	Sme, SME	<u>Serratia</u> <u>marcescens</u> <u>enzyme</u>
IRT	<i>Inhibitor resistant</i> <u>TEM</u> <u>β-lactamase</u>	TEM	<u>Temoneira</u> (nome da paciente)
K1, KOXY	De <u>Klebsiella</u> <u>oxytoca</u>	Toho	De <u>Toho</u> University School of Medicine
KPC	<u>K. pneumoniae</u> <u>carbapenemase</u>	VEB	<u>Vietnam</u> <i>extended-spectrum</i> <u>β-lactamase</u>
L-1, L1	<u>Labile enzyme</u> de <u>S. maltophilia</u>	VIM	<u>Verona</u> <i>integron-encoded</i> <u>metallo-β-lactamase</u>

**Fonte:** adaptado de Jacoby, 2006.

Só recentemente letras e não mais números de cepas têm sido consistentemente utilizados. Com o tempo, algumas beta-lactamases também se tornaram famílias com um número maior ou menor de enzimas relacionadas. Para poucas foram dados mais de um nome ou nomes provisórios até a realização de sequenciamento e alguns nomes perderam a lógica, entretanto continuam sendo usados. As beta-lactamases plasmídeo-mediadas foram designadas com letras maiúsculas, enquanto que para a designação das cromossômico-mediadas foi definida a utilização da primeira letra maiúscula, embora esta distinção não seja mais mantida (Jacoby, 2006; <http://www.lahey.org/studies>).

## 2.2.2 Classificação das beta-lactamases

Da mesma forma que a nomenclatura, a classificação das beta-lactamases segue uma variedade de aspectos em função da grande diversidade de enzimas existentes. Vários esquemas de classificação foram propostos baseados nos mais variados aspectos. Entre esses aspectos, pode-se citar: (1) o substrato de ação; (2) a inibição por diferentes substâncias e (3) a origem genética; ou seja, uma classificação baseada nas propriedades funcionais. Posteriormente, com o advento do sequenciamento, foi proposta uma classificação molecular baseada: (1) na sequência de aminoácidos; (2) no peso molecular e na (3) mobilidade eletroforética (Richmond & Sykes, 1973; Ambler, 1980; Bush, *et al.* 1995; Queenan & Bush, 2007).

A primeira classificação fenotípica, amplamente aceita, foi proposta por Richmond & Sykes (1973) que dividiram as beta-lactamases em grupos de acordo com o perfil do substrato enzimático. Na década de 1980, surgiram a classificação molecular de Ambler (1980) baseada na sequência de aminoácidos, agrupando as beta-lactamases em quatro classes (A, B, C e D) e a classificação funcional de Bush (1989). A classificação de Bush foi a primeira a relacionar o substrato preferencial e propriedades inibitórias com a estrutura molecular da enzima, classificando-as em quatro grupos (1, 2, 3 e 4).

As classificações mais utilizadas são a de Ambler (1980) e a de Bush *et al.* (1995), a qual representa uma modificação da anterior proposta por Bush, pela introdução dos subgrupos 2be, 2br e 2f. Devido ao aumento do número de beta-lactamases derivadas dos tipos TEM e SHV, as beta-lactamases de espectro ampliado foram classificadas no subgrupo 2be, recebendo a letra “e” para designar que essas enzimas possuíam espectro de atividade ampliado. Já as beta-lactamases, também derivadas dos tipos TEM e SHV e fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, foram classificadas no subgrupo 2br. Um

terceiro grupo de enzimas, 2f, foi adicionado e incluiu aquelas que hidrolisam os carbapenêmicos e são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico.

Como resultado da relativa facilidade em obter informações com base na estrutura molecular, novas beta-lactamases são rapidamente descobertas, em contraste com as pesquisas iniciais cujas enzimas eram classificadas principalmente com base nas características bioquímicas ou funcionais. Muitas das enzimas hoje conhecidas pertencem a famílias com graus de relacionamento e semelhanças funcionais. Em termos de epidemiologia e do efeito do uso de antimicrobianos em longo prazo, a identificação molecular das beta-lactamases desempenha importante papel. Entretanto, o impacto clínico das beta-lactamases está relacionado a uma combinação de fatores que diz respeito, em especial, às propriedades funcionais e não tanto às estruturais, assumindo importância a especificidade de hidrólise e o nível de expressão da atividade enzimática, bem como outros fatores próprios de cada bactéria (Bush, 2001).

As principais características funcionais e estruturais das beta-lactamases estão representadas de modo simplificado na **Tabela 4**, onde se pode observar que em cinco anos (1995 a 2000) houve um significativo aumento no número total de beta-lactamases (de 188 para 340). Considerando os dias atuais, esse número ainda é mais alto, chegando a aproximadamente 670 beta-lactamases (<http://www.lahey.org/studies/>, acesso em dezembro de 2008). Segundo Bush (2001), entre os anos de 1995 e 2000, cinco grupos de beta-lactamases (1, 2be, 2br, 2d e 3) dos onze já existentes, aumentaram em pelo menos 50%, sendo que, pelo menos três diferentes grupos tiveram um significativo aumento na prevalência mundial: as cefalosporinases do grupo funcional 1 plasmídeo codificadas, as metalo-beta-lactamases do grupo 3 e as beta-lactamases de espectro ampliado do grupo 2be, as quais representam o maior grupo dentre as beta-lactamases.

As beta-lactamases do tipo AmpC, do grupo 1 da classificação de Bush *et al.* (1995) ou na classe C de Ambler (1980), são enzimas mediadas por genes cromossomais, praticamente ubíquas entre os bacilos Gram-negativos (maioria das bactérias da família *Enterobacteriaceae* e em *Pseudomonas aeruginosa*). Apresentam graus variáveis de expressão entre espécies bacterianas, são resistentes à inibição pelo ácido clavulânico e sulbactam e podem ser induzidas por beta-lactâmicos. Essas enzimas podem conferir resistência a quase todos os beta-lactâmicos, incluindo às penicilinas de amplo espectro, às cefamicinas, às cefalosporinas de terceira geração, às combinações com inibidores de beta-lactâmicos e aos monobactâmicos, exceto aos carbapenêmicos e às cefalosporinas de quarta geração (Sanders & Sanders, 1988; Livermore, 1995).

O gene para a produção desta beta-lactamase não é normalmente expresso quando está sob o controle negativo de um repressor. O principal mecanismo de desrepressão é a exposição da bactéria a um indutor enzimático que geralmente é o próprio beta-lactâmico.

**Tabela 4:** Classificação funcional e molecular das beta-lactamases

Grupo funcional	Subgrupo	Classe molecular	Principais características	Exemplos de enzimas representativas	n° estimado de enzimas		
					1995	2000	2008
1		C	Em geral enzimas cromossômicas (constitutivas ou induzíveis) de bactérias Gram-negativas. No entanto, podem ser plasmídeo-mediadas. Conferem resistência a todas as classes de beta-lactâmicos, exceto carbapenêmicos (a menos quando associado a alteração de porinas). Não inibidas pelo ácido clavulânico.	Amp-C, MIR-1	32	51	
2		A, D	A maioria das enzimas é inibida pelo ácido clavulânico.		136	256	
	2a	A	Penicilinas de bactérias Gram-positivas. Conferem resistência à penicilinas.	Enzimas G. <i>Staphylococcus e Enterococcus</i>	20	23	
	2b	A	Beta-lactamases de amplo espectro, principalmente de bactérias Gram-negativas.	TEM-1, TEM-2, SHV-1	16	16	
	2be	A	Beta-lactamases de espectro ampliado. Conferem resistência às cefalosporinas de 3ª geração e ao monobactâmico.	TEM-3 a TEM-160, SHV-2 a SHV-101, K1 <i>Klebsiella oxytoca</i> , CTX-M	36	119	
	2br	A	Beta-lactamases TEM e uma beta-lactamase SHV não-contida pelos inibidores de beta-lactamase.	TEM-30 a TEM-36, IRT	9	24	
	2c	A	Enzimas que hidrolisam carbenicilina.	PSE-1, PSE-3, PSE-4	15	19	
	2d	D	Enzimas que hidrolisam cloxacilina-(oxacilina); Moderadamente inibidas pelo ácido clavulânico.	OXA-1 a OXA-11, PSE-2	18	31	
	2e	A	Cefalosporinas inibidas pelo ácido clavulânico.	Enzimas induzíveis de <i>P. vulgaris</i>	19	20	
	2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenêmicos com sítio ativo serina e inibidas pelo ácido clavulânico.	NMC-A <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 <i>Serratia marcescens</i> , KPC-1 e KPC-2 <i>K. pneumoniae</i> , GES-2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	4	
3	3a, 3b, 3c	B	Metalo-beta-lactamases que conferem resistência aos carbapenêmicos e às demais classes de beta-lactâmicos, exceto monobactâmico. Inibidas pelo EDTA <sup>a</sup> , mas não pelo ácido clavulânico.	L1 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , CcrA <i>Bacteroides fragilis</i> , grupos IMP e VIM	13	24	
4		? <sup>b</sup>	Enzimas não sequenciadas e não classificadas.		7	9	
<b>Total de beta-lactamases</b>					<b>188</b>	<b>340</b>	<b>670<sup>c</sup></b>

Tabela adaptada de Bush *et al.* 1995; Bush, 2001; Shah *et al.* 2004; Perez *et al.* 2007; <sup>a</sup> EDTA: ác. etilendiaminotetracético; <sup>b</sup> não determinada; <sup>c</sup> valor obtido em <http://www.lahey.org/studies/>

Na ausência de um indutor, a síntese pode voltar a baixos níveis ou permanecer elevada, desde que ocorram duas mutações pontuais, uma aumentando a eficiência do gene promotor e outra inativando o gene repressor, de tal modo, que a bactéria passará a produzir grandes quantidades de AmpC de forma constitutiva, ou seja, sem mais a necessidade do indutor (Lindberg & Normark, 1986; Livermore, 1991; Jones, 1998).

Embora praticamente todas as espécies de bacilos Gram-negativos produzam AmpC, muitas como, *Escherichia coli* produzem apenas pequenas quantidades de enzima, que não são suficientes para levar a resistência às cefalosporinas de terceira geração e não sofrem indução, devido a falta do sistema de indução completo. Por outro lado, espécies de *Klebsiella* e *Proteus mirabilis* não produzem AmpC devido a ausência do gene (Honoré *et al.* 1986; Thompson, 2001). Porém outras espécies, como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Providencia* (conhecidas como sendo do grupo CESP) e a *Pseudomonas aeruginosa* podem ser induzidas a produzir grandes quantidades de enzima, tornando-se resistentes às cefalosporinas de segunda e terceira gerações (Jones, 1998; Sader *et al.*, 2001).

Dessa maneira, um dos principais problemas que podem ser causados por esse grupo de enzimas é a ocorrência de falha terapêutica em pacientes infectados com isolados inicialmente suscetíveis que após o tratamento tornam-se resistentes. Essa resistência ocorre especialmente em infecções com alto inóculo bacteriano, como em abscessos, pneumonia e sepse, onde a possibilidade de ocorrer mutantes desreprimidos espontâneos pode ser mais elevada (Medeiros, 1997; Livermore, 1995).

Beta-lactamases plasmidiais desse grupo 1 já foram identificadas, mas são ainda relativamente incomuns. Estas em geral derivam do gene *bla*<sub>AmpC</sub> cromossomal de *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Em espécies bacterianas como *E. coli*, *Klebsiella* spp e *Proteus mirabilis* que não apresentam a beta-lactamase AmpC cromossomal induzível, a falta de inibição da atividade de cefamicinas



pelo ácido clavulânico pode ser uma evidência indireta da presença de uma AmpC mediada por plasmídio. No entanto, outros mecanismos podem produzir um fenótipo de resistência semelhante, como a perda de porinas na membrana externa da bactéria (Thompson, 2001; Philippon *et al.* 2002; Odeh *et al.* 2002; Alvarez *et al.* 2004).

O segundo grupo de beta-lactamases de relevância clínica diz respeito às beta-lactamases capazes de degradar carbapenêmicos que pertencem a dois grupos distintos: grupos 2 e 3 da classificação de Bush *et al.* (1995) e classe A e B da classificação de Ambler (1980), respectivamente.

As do grupo 2 são codificadas por genes cromossomais, encontradas principalmente em *Enterobacter* spp e *Serratia marcescens* e fracamente inibidas pelo ácido clavulânico. No grupo 3, encontram-se as metalo-beta-lactamases que são enzimas cromossômicas ou plasmidiais capazes de degradar praticamente todos os beta-lactâmicos, exceto os monobactâmicos, não sendo inibidas pelo ácido clavulânico ou tazobactam, mas pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e ácido 2-mercaptopropiônico. As enzimas do grupo 3 têm sido descritas em amostras de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas* spp, *Serratia marcescens*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp e *Pseudomonas aeruginosa* (Senda *et al.* 1996; Koh *et al.* 1999; Queenan & Bush, 2007).

### **2.2.3 Beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL)**

#### **2.2.3.1 Definição de ESBL**

O desenvolvimento das penicilinas de largo espectro e das cefalosporinas de primeira geração na década de 1960 rapidamente foi seguido pela emergência de resistência mediada por beta-lactamases e o reconhecimento de muitos tipos de beta-lactamases. Nesta época, surgiram as primeiras classificações baseadas em propriedades funcionais, que incluíam a atividade contra cefaloridina e benzilpenicilina, por isso as beta-lactamases

foram denominadas de cefalosporinases, penicilinases ou de largo espectro, quando ambos os substratos eram hidrolisados (Flemming *et al.* 1963; Rickmond & Sykes, 1973). Entre as enzimas de largo espectro estavam as TEM-1, TEM-2 e SHV-1 pertencentes ao grupo funcional 2b e classe molecular A, as quais rapidamente tornaram-se as principais responsáveis pela resistência às penicilinas de largo espectro e às cefalosporinas de espectro reduzido. Na década de 1970, a beta-lactamase TEM-1 encontrava-se presente em 30 a 50% dos isolados de *Escherichia coli* e outros membros da família *Enterobacteriaceae*, assim como em *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (Matthew, 1979).

A disseminação das enzimas plasmídeo-mediadas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 precipitaram o início da pesquisa dos antimicrobianos beta-lactâmicos estáveis a beta-lactamases, a partir da segunda metade da década de 1970 e culminaram na descoberta, em diferentes anos, das cefamicinas, das cefalosporinas de terceira e quarta gerações, dos monobactâmicos e dos carbapenêmicos. Por razões de conveniência, custo e benefício, as cefalosporinas de terceira e quarta geração, em especial a cefuroxima, a cefotaxima, a ceftriaxona, a ceftazidima e a cefepima tornaram-se drogas amplamente utilizadas, passando a ser consideradas tratamento padrão para pneumonias, infecções intra-abdominais e do trato urinário em muitos hospitais do mundo (Paterson & Bonomo, 2005; Livermore, 2008).

Entretanto, o uso das cefalosporinas de terceira geração, introduzidas no início dos anos de 1980, exerceu uma forte pressão seletiva, sendo descrita, em 1983, na Alemanha, uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* e de *Serratia marcescens* com a beta-lactamase SHV-2, uma mutante de SHV-1, capaz de hidrolisar esses novos compostos (Knothe *et al.* 1983). Posteriormente, na França, foi relatada uma série de diferentes cefotaximases e ceftazidimases, identificadas como mutantes de TEM e SHV (Sirot *et al.* 1987).

A ampliação do espectro de ação deu origem ao termo beta-lactamases de espectro ampliado (*Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase* – ESBL, inicialmente *extended-broad-spectrum*

*β-lactamase*) que foram classificadas por Bush *et al.* (1995) no grupo funcional 2be. O termo foi baseado no fato dessas enzimas terem ampliado o espectro de atividade comparado com as clássicas enzimas TEM e SHV de largo espectro que eram suas ancestrais, serem capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração 10% a mais do que hidrolisam as benzilpenicilinas, além de serem inibidas por compostos como ácido clavulânico. Na classe 2be também foi acomodada a beta-lactamase cromossômica K1 (KOXY) da *Klebsiella oxytoca* que possui uma atividade mais ampla em relação a SHV-1. Cerca de 20% das *K. oxytoca*, mutantes, hiperproduzem essa beta-lactamase e são resistentes à todas as penicilinas, a cefotaxima, a ceftriaxona, a cefuroxima e ao aztreonam, exceto aos carbapenêmicos, às cefamicinas (Bush *et al.* 1995; Rossi & Andreazzi, 2005).

As ESBL surgiram de mutações pontuais ocorridas nos genes estruturais, os quais codificam as beta-lactamases TEM-1, TEM-2 e SHV-1 em locais próximos a seus sítios ativos. Causam, assim, alterações suficientes na sequência de aminoácidos capazes de produzir novas enzimas com novos substratos preferenciais (Du Bois *et al.* 1995).

Em geral, as ESBL são enzimas que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta gerações e o monobactâmico aztreonam. No entanto não atuam em cefamicinas e carbapenêmicos. Em contraste, as ESBL são inibidas por inibidores de beta-lactamases comercialmente disponíveis, incluindo o ácido clavulânico, o tazobactam e o sulbactam (Perez *et al.* 2007).

À medida que novas beta-lactamases foram sendo catalogadas, a definição original do termo ESBL foi estendida para incluir: (1) aquelas enzimas com espectro similar aos mutantes TEM e SHV, derivadas de outras fontes, como os tipos CTX-M, PER, VEB e GES; (2) mutantes TEM e SHV com atividade ESBL *borderline*, ou seja, aumento de atividade contra cefalosporinas de terceira geração 10% a menos do que hidrolisam as benzilpenicilinas, como a enzima TEM-12; e (3) várias beta-lactamases que conferem uma

resistência ampliada em relação aos seus tipos parentais, entretanto, não se enquadram na definição do grupo 2be, como as derivadas de OXA da classe molecular D e mutantes AmpC com atividade aumentada contra cefepima da classe molecular C detectada em isolados clínicos de *Serratia* e *Enterobacter* (Livermore, 2008).

O termo ESBL foi criado quando relativamente poucas beta-lactamases eram conhecidas e, naquele momento, serviu bem para os mutantes TEM e SHV, pois tinham altas taxas de hidrólise para cefalosporinas de terceira geração e um espectro de ação ampliado comparado com os seus tipos parentais. Atualmente uma definição de ESBL que ainda serviria, embora não exista um consenso sobre a definição precisa de ESBL, seria de uma beta-lactamase geralmente adquirida, a qual é capaz de conferir resistência às cefalosporinas de terceira geração, mas não aos carbapenêmicos ou que tenha habilidade aumentada de hidrólise comparada aos seus ancestrais clássicos (Paterson & Bonomo, 2005; Livermore, 2008).

Segundo Livermore (2008), pareceria melhor que o termo ESBL continuasse com a ampla e moderna definição, mas deveria ser sempre acompanhado da menção da classe de ESBL, ou seja, ESBL TEM, ESBL OXA, ESBL CTX-M ou AmpC de espectro ampliado. Deve ser salientado que a grande maioria das ESBL, encontradas em isolados clínicos, pertencem às famílias TEM, SHV e CTX-M, permanecendo raros os tipos que complicam a classificação como as OXA, GES e AmpC de espectro ampliado (Livermore, 2008).

### **2.2.3.2. Diversidade das ESBL**

#### **2.2.3.2.1. Grupo SHV**

A enzima SHV-1, uma beta-lactamase não ESBL, é encontrada na maioria das *Klebsiella pneumoniae* como uma beta-lactamase cromossômica constitutiva conferindo resistência à ampicilina, à amoxicilina e às carboxipenicilinas. No entanto, é comumente uma enzima plasmídio-mediada que pode ocorrer em outras enterobactérias, conferindo resistência às carboxipenicilinas e num nível de resistência menor às ureidopenicilinas e cefalosporinas de primeira geração, conservando a sensibilidade às cefalosporinas de amplo espectro, as cefamicinas, aos monobactâmicos e aos carbapanêmicos (Rossi & Andreazzi, 2005).

A primeira enzima SHV com fenótipo de ESBL, a SHV-2, foi identificada em 1983, em isolados de *K. pneumoniae* e *Serratia marcescens*, se diferenciava da SHV-1 pela substituição de uma glicina por serina na posição 238. Atualmente há mais de 90 variantes da SHV-1, a maioria com fenótipo ESBL, sendo encontradas também em outras espécies da família *Enterobacteriaceae*, assim como em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp (Knothe *et al.* 1983; Paterson & Bonomo, 2005; <http://www.lahey.org/studies>, acesso em dezembro de 2008).

#### **2.2.3.2.2. Grupo TEM**

A presença da enzima TEM-1 foi relatada em 1965 em *E. coli*. Essa enzima é muito comum entre as bactérias Gram-negativas, inclusive em outros membros da família *Enterobacteriaceae*, em *Haemophilus influenzae* e em *Neisseria gonorrhoeae* (Matthew, 1979). A TEM-1 é uma beta-lactamase plasmídio-mediada, cujo alvo primário de atividade é o grupo das penicilinas, por isso é considerada uma penicilinase. Apresenta alta afinidade por carboxipenicilinas, ampicilina e amoxicilina e baixa afinidade por cefalosporinas de

primeira geração. Mais de 90% da resistência de *E. coli* à ampicilina deve-se à sua presença. A beta-lactamase SHV-1 compartilha 68% dos aminoácidos com a TEM-1 (Bradford, 2001; Paterson & Bonomo, 2005).

Já a beta-lactamase TEM-2, primeira derivada da TEM-1, apesar de ter sofrido substituição de um aminoácido, não sofreu modificações no seu perfil hidrolítico, mesmo com a alteração em seu ponto isoelétrico de 5,4 para 5,6. A TEM-13 também apresenta perfil de substrato semelhante à TEM-1, não sendo, portanto uma ESBL (Paterson & Bonomo, 2005).

Em 1987, foi relatado, em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, a beta-lactamase TEM-3, diferente da TEM-2 por substituição de dois aminoácidos e com expressão do fenótipo de ESBL. Entretanto, a primeira ESBL do tipo TEM foi relatada, em 1982, em um isolado de *K. oxytoca*, responsável por um surto ocorrido em uma unidade neonatal na Inglaterra, após tratamento com ceftazidima. Posteriormente foi catalogada como a ESBL TEM-12 (Du Bois, *et al.* 1995).

Mais de 150 derivadas TEM foram descritas, algumas delas resistentes aos inibidores de beta-lactamases mas, a grande maioria, apresenta fenótipo ESBL e pontos isoelétricos que variam de 5,2 a 6,5 (Bradford, 2001; Paterson & Bonomo, 2005; <http://www.lahey.org/studies>, acesso em dezembro de 2008).

As TEM beta-lactamases, resistentes a inibidores de beta-lactamases, foram descobertas nos anos de 1990, em alguns países da Europa (Chaibi *et al.* 1999). Inicialmente, foram designadas de IRT e posteriormente renomeadas com a designação TEM numérica. São conhecidas pelo menos 22 distintas beta-lactamases resistentes a inibidores de beta-lactamases (<http://www.lahey.org/studies>, acesso em dezembro de 2008).

Essas enzimas têm sido encontradas, principalmente, em isolados clínicos de *E. coli*, mas também ocorrem em *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Proteus mirabilis* e

*Citrobacter freundii* (Lemozy *et al.* 1995; Bret *et al.* 1996). Caracteristicamente, bactérias produtoras de beta-lactamases desse tipo resistem às combinações de beta-lactâmicos com ácido clavulânico e sulbactam. No entanto, permanecem suscetíveis à tazobactam, e, por isso à combinação de piperacilina-tazobactam (Chaibi *et al.* 1999).

#### **2.2.3.2.3. Grupo CTX-M**

Várias ESBL que não-TEM e não-SHV têm sido reportadas, aparecendo a família CTX-M como o tipo mais numeroso, com mais de 70 variantes enzimáticas reunidos em cinco grupos filogenéticos. Esses grupos são chamados de CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M25 (<http://www.lahey.org/studies>, acesso em dezembro de 2008). A primeira dessas enzimas foi detectada em 1989, na Alemanha, em *Escherichia coli* e designada de CTX-M 1. Trata-se de um grupo de enzimas muito heterogêneo que compartilha menos de 40% de identidade com os tipos TEM e SHV, os quais tenham provavelmente evoluído de beta-lactamases cromossômicas de diferentes espécies ambientais de *Kluyvera* da família *Enterobacteriaceae* (Bonnet, 2004).

Uma vez mobilizado, o gene *bla*<sub>CTX-M</sub>, pode ser localizado em muitos elementos, estando na maioria das vezes, em grandes plasmídios multirresistentes. Assim, pode ocorrer em bactérias produtoras de ESBL CTX-M resistentes às associações de beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamases. Essa resistência ocorre em função da produção concomitante de penicilinas resistentes aos inibidores codificadas pelo gene *bla*<sub>OXA-1</sub> que, algumas vezes, estão presentes no mesmo plasmídio do gene *bla*<sub>CTX-M</sub> (Livermore *et al.* 2007).

As CTX-M beta-lactamases caracterizam-se por hidrolisarem mais efetivamente a cefotaxima e a ceftriaxona. Podem ser sensíveis à ceftazidima, nos testes de sensibilidade *in vitro*, diferentemente do observado em isolados bacterianos produtores de enzimas dos grupos SHV e TEM. Tais enzimas são, na maioria, ceftazidimases. Outra característica das

enzimas CTX-M é a inibição mais efetiva pelo tazobactam, quando comparados ao sulbactam e ao ácido clavulânico. Entretanto, mutantes CTX-M, com atividade contra ceftazidima, já foram identificados (Bonnet, 2004).

A partir de 1995, as enzimas CTX-M sofreram rápida expansão mundial e representam o tipo de ESBL mais encontrado na América do Sul, Ásia, certos países da Europa oriental e no leste da Europa (Bonnet, 2004). São encontradas entre uma ampla variedade de bactérias de importância clínica, em particular entre membros da família *Enterobacteriaceae*, como *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter* spp, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Bradford, 2001; Bonnet *et al.* 2001a; Bonnet *et al.* 2001b; Bonnet, 2004; Livermore *et al.* 2007).

#### **2.2.3.2.4. Outras ESBLs**

Outras beta-lactamases de espectro ampliado da classe molecular A são ainda relativamente pouco comuns. Elas são detectadas, principalmente, em *Pseudomonas aeruginosa* e muitas são encontradas em um número limitado de regiões geográficas. A enzima PER-1 foi relatada em isolados de *P. aeruginosa* na Turquia, França e Itália, em espécies de *Acinetobacter* multirresistentes na Coreia e na Turquia e a PER-2 em *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium, na Argentina. Foi relatada também em *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *E. coli* nos países da América do Sul (Weldhagen *et al.* 2003; Celenza *et al.* 2006).

Foi sugerido que a localização dos genes *bla*<sub>PER-1</sub> poderia ser plasmidial ou em integrons. Nestes, poderiam conter genes para outros grupos de ESBL, como VEB, GES e OXA (Poirel *et al.* 2000). As enzimas ESBL VEB-1 e VEB-2 foram identificadas na Ásia e



as GES-1, GES-2 e IBC-2 em isolados na África do Sul, na França e na Grécia (Weldhagen 2003; Yong *et al.* 2003; Jacoby & Munoz-Price, 2005).

Como relatado, algumas das enzimas dos grupos PER, VEB e GES ESBL foram encontradas em bacilos Gram-negativos não-fermentadores, assim como em fermentadores, enquanto que, outras ESBL incomuns, incluindo BES-1, IBC-1, SFO-1 e TLA-1 somente foram detectadas em bacilos Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* (Matsumoto & Inoue, 1999; Bonnet *et al.* 2000; Silva *et al.* 2000; Giakkoupi *et al.* 2000). Atualmente são catalogadas quatro variantes de beta-lactamases PER, seis de VEB e onze de GES (<http://www.lahey.org/studies>, acesso em dezembro de 2008)

Outras beta-lactamases de espectro ampliado, mas não pertencentes à classe molecular A, são as beta-lactamases do grupo OXA, classificadas na classe molecular D e no grupo funcional 2d. São representadas por mais de 100 variantes enzimáticas. A minoria delas apresenta fenótipo ESBL, ou seja, apenas em torno de 11 mutantes da OXA-10, OXA-1 e OXA-2 enquadram-se nesse grupo (<http://www.lahey.org/studies>, acesso em dezembro de 2008).

As OXA ESBL são mais comumente encontradas em *P. aeruginosa* do que em enterobactérias. Conferem resistência à ampicilina e à cefalotina, apresentam alta afinidade hidrolítica contra oxacilina e cloxacilina, são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico e ampliaram o seu espectro de ação contra cefalosporinas de terceira geração. Algumas conferem resistência predominantemente à ceftazidima, entretanto, o tipo OXA-17 confere maior resistência à cefotaxima e à cefepima em relação à ceftazidima (Bradford, 2001; Jacoby & Munoz-Price, 2005).

### 2.2.3.3. Epidemiologia global das ESBL

Registros de isolados clínicos produtores de beta-lactamases de espectro ampliado expandiram-se rapidamente pela Europa e posteriormente pelos Estados Unidos, ainda na década de 1980. Hoje, na década de 2000, se encontram mundialmente disseminados, particularmente, entre membros da família *Enterobacteriaceae* de importância clínica (Knothe *et al.* 1983; Sirot *et al.* 1987; Bauenfeind *et al.* 1990; Sader *et al.* 2001; Winokur *et al.* 2001; Bell *et al.* 2003; Paterson *et al.* 2003; Eckert *et al.* 2004; Chmelnitsky *et al.* 2005; Livermore *et al.* 2007; Pellecchi *et al.* 2007; Lavigne *et al.* 2007; Mendonça *et al.* 2007; Cantón *et al.* 2008; Villegas *et al.* 2008).

A prevalência mundial de produtores de ESBL é muito variável, inclusive entre instituições de saúde em um mesmo país, embora possa ser difícil determinar a prevalência real em uma determinada nação em função de possíveis problemas laboratoriais na detecção desse mecanismo de resistência. No entanto, é bastante provável que múltiplos fatores estejam envolvidos, como a pressão seletiva decorrente do uso indiscriminado de antimicrobianos, além de deficiências nas medidas de controle de infecções por bactérias multirresistentes ou mesmo fatores relacionados às rotas de disseminação, como migração humana ou consumo de alimentos (Livermore *et al.* 2007).

Desde o seu primeiro relato, as ESBL têm sido identificadas em várias espécies bacterianas, especialmente entre membros da família *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar, com ênfase para *Klebsiella pneumoniae*, seguida da *Escherichia coli*, mas também, em muitos outros gêneros, incluindo espécies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella* e *Shigella* (Bradford, 2001; Bell *et al.* 2003; Luzzaro *et al.* 2006; Manarini *et al.* 2007; Galas *et al.* 2008).

Um estudo com dados do SENTRY, (*Antimicrobial Surveillance Program*) analisou a prevalência de bactérias produtoras de ESBL em vários países da América do

Sul. Foi possível observar uma prevalência do fenótipo ESBL em isolados de *Escherichia coli* obtidos em hemoculturas de 4,5 % (Uruguai) a 12 % (Chile e México) e de 31 % (México) a 56,6 % (Brasil), considerando *Klebsiella pneumoniae* (Diekema *et al.* 1999).

Em 1998, num estudo também realizado pelo SENTRY com amostras de diferentes regiões do Brasil, incluindo 591 isolados de enterobactérias de 20 laboratórios de microbiologia clínica e 36 hospitais, evidenciou-se que 13,6 % das *E. coli* e 42,1 % das *K. pneumoniae* eram fenótipos produtores de ESBL (Sader, 2000). Outros trabalhos no Brasil têm encontrado bactérias produtoras de ESBL, em taxas que variam de 36% para isolados respiratórios de *K. pneumoniae*, obtidas em hospitais das cidades de São Paulo, Rio de Janeiro e Florianópolis e de 33 % para *Klebsiella spp* e de 8 % para *E. coli* para amostras hospitalares de Porto Alegre (Sader *et al.* 2001; Freitas *et al.* 2003).

Considerando o período entre 1997-2000, as taxas de cepas produtoras de ESBL, o Brasil, foram maiores do que as reportadas nos Estados Unidos (*K. pneumoniae* – 7,6%, *E. coli* – 3,3%), Europa (*K. pneumoniae* – 22,6%, *E. coli* – 5,3%) e Canadá. (*K. pneumoniae* – 4,9%, *E. coli* – 4,2%) (Winokur *et al.* 2001). Entretanto, na Europa, a prevalência de bactérias produtoras de ESBL é altamente variável entre os países, em torno de 2% na Holanda, atingindo valores superiores a 34% em Portugal e próximos de 50% na Rússia (Paterson *et al.* 2003; Bouchillon *et al.* 2004; Cantón *et al.* 2008).

Em muitos países, incluindo o Brasil, a prevalência de bactérias produtoras de ESBL é mais expressiva no ambiente hospitalar, em especial nas unidades de terapia intensiva. Essas unidades representam o principal epicentro e as bactérias geralmente são isoladas em espécies de *Klebsiella* (Paterson *et al.* 2004; Marra *et al.* 2006). Entretanto, o surgimento e a disseminação extra-hospitalar desses microrganismos já se apresentam em níveis preocupantes em vários países, incluindo, França, Espanha, Polônia, Estados Unidos e Israel (Goldstein, 2000; Lescure *et al.* 2001; Daza *et al.* 2001; Hryniewicz *et al.* 2001;

Borer *et al.* 2002; Ko *et al.* 2002; Arpin *et al.* 2003; Rodriguez-Baño *et al.* 2004). Esses autores detectaram *E. coli* produtoras de ESBL em taxas de 1,4 a 6,9 % para isolados urinários, 5 a 15,1% em hemocultura, e de 7,5 % da microbiota intestinal e para *Klebsiella* spp valores de 5 a 7,7 % em bacteremias adquiridas na comunidade.

Além da crescente detecção da passagem de bactérias multirresistentes do ambiente hospitalar para o extra-hospitalar, como os relacionados à assistência à saúde, incluindo os de longa duração, também vêm aumentando a disseminação pela comunidade de bactérias produtoras de ESBL (Winokur *et al.* 2001; Rodriguez-Baño *et al.* 2004; Manarini *et al.* 2007; Lewis *et al.* 2007; Arpin *et al.* 2007). Tem sido demonstrada no Reino Unido, Portugal e Espanha a disseminação clonal de isolados de origem comunitária de *E. coli* produtores do tipo CTX-M-15, paralelamente com a sua presença em hospitais e nos serviços de assistência de longa duração (Ben-Amin *et al.* 2006; Livermore *et al.* 2001; Woodford *et al.* 2004)

Na Europa, a partir dos anos 2000, inicialmente na Polônia e Espanha e logo a seguir na França e Reino Unido, foi observada uma importante mudança tanto na prevalência quanto nos tipos de ESBL. Antes dessa época, a maioria dos produtores de ESBL era de origem nosocomial, especialmente de *Klebsiella* spp e *Enterobacter* spp, isolados de unidades de cuidados intensivos com ESBL derivadas dos tipos TEM e SHV. Subsequentemente, a família de ESBL CTX-M tornou-se dominante, sendo detectada com uma frequência muito maior em *Escherichia coli*, oriundas de pacientes com infecções comunitárias complicadas, geralmente com doença de base, uso recente de antimicrobianos ou relacionados à assistência à saúde (Livermore *et al.* 2007).

Em 1989, na Argentina, foi identificado um surto provocado por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium produtora de ESBL do tipo CTX-M-2. Essa variante foi identificada posteriormente em várias outras regiões da América do Sul (Bauernfeind *et al.*

1992). No Brasil outras enzimas CTX-M (CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-16) foram identificadas em espécies de *Citrobacter*, *Enterobacter* e *E. coli*, assim como, a enzima ESBL BES-1 produzida por um isolado de *Serratia marcescenes* (Bonnet *et al.* 2000; Bonnet *et al.* 2001a; Bonnet *et al.* 2001b).

Nos Estados Unidos, as ESBL CTX-M representam o tipo mais predominante entre isolados bacterianos de infecções adquiridas na comunidade, em particular de *E. coli* de origem urinária que apresentaram ESBL CTX-M-15 e disseminação multiclonal. Isso tem levado a uma reavaliação da necessidade de triagem na rotina de bactérias produtoras de ESBL de origem comunitária, em especial de isolados de *E. coli* de infecções do trato urinário (Lewis *et al.* 2007).

#### **2.2.3.4. Importância clínica das ESBL**

As infecções relacionadas à assistência à saúde, principalmente, as adquiridas no ambiente hospitalar e, sobretudo as causadas por bactérias multirresistentes são apontadas como uma das complicações mais frequentes na geração do prolongamento do período de internação, no aumento da morbidade, na mortalidade e, conseqüentemente, nos custos hospitalares. Entre os bacilos Gram-negativos, três são particularmente considerados mundialmente problemáticos: *Acinetobacter* spp e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos e produtores de ESBL da família *Enterobacteriaceae* (Shlaes *et al.* 1997; Winokur *et al.* 2001; Paterson & Bonomo, 2005; Schwaber *et al.* 2006; Perez *et al.* 2007; Klevens *et al.* 2007; Slama, 2008).

Durante os anos de 1990, os isolados clínicos com fenótipo de ESBL transformaram-se em um dos mais importantes problemas globais de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos amplamente utilizados no tratamento de muitas infecções bacterianas de origem nosocomial e comunitária (Paterson *et al.* 2003; Cantón *et al.* 2008).

O isolamento de produtores de ESBL representa implicações clínicas-epidemiológicas importantes. Nesse caso, ao impedir a administração de todas as penicilinas, as cefalosporinas de primeira a quarta gerações, o aztreonam e as combinações com os inibidores de beta-lactamases pode ocasionar o uso excessivo de drogas de amplo espectro, como os carbapenêmicos. Com isso, aumenta o risco da emergência de *Acinetobacter* spp e *Pseudomonas aeruginosa* carbapenêmicos resistentes (Mena *et al.* 2006).

Além de impor limites ao uso dos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, esses isolados com frequência apresentam corresponsabilidade aos antimicrobianos que não beta-lactâmicos, como os aminoglicosídeos, as tetraciclínas, as fluorquinolonas, o cloranfenicol e o sulfametoxazol-trimetoprim (Fernández-Rodríguez *et al.* 1992; *et al.* 1994; Schwaber *et al.* 2005; Morosini *et al.* 2006).

Além disso, os testes de sensibilidades aos antimicrobianos de rotina podem não detectar a resistência mediada por essas enzimas e, ao proporcionar resultados de falsa sensibilidade, ao induzir o tratamento com beta-lactâmicos, esses podem não ser eficazes na erradicação do patógeno e levar a falha terapêutica (Bradford, 2001). Somados aos problemas de caráter terapêutico, devido à localização extracromossômica dos genes que codificam as enzimas ESBL em plasmídios, transposons e/ou integrons, a transmissão horizontal via conjugação é facilitada, resultando na disseminação desse fenótipo de resistência (Tenover, 2001; Bradford *et al.* 2001; Dzidic & Bedeković, 2003).

Os produtores de ESBL são mundialmente reconhecidos como um problema para pacientes hospitalizados, podendo ser responsáveis por surtos ou endemias no hospital (Paterson & Bonomo, 2005). As unidades de terapia intensiva (UTIs) representam o epicentro de muitos surtos, ocasionadas pelo alto nível de comprometimento imunológico, debilidade e manipulação dos pacientes, o uso excessivo de antimicrobianos de amplo

espectro e extremos de idade (Rebuck *et al.* 2000; Wu *et al.* 2003; Pessoa-Silva *et al.* 2003; Kristóf *et al.* 2007; Garcia *et al.* 2008).

No entanto, também têm sido bem documentada a disseminação bacteriana para outras partes do hospital fora das UTIs por vias tradicionais, utilizando principalmente as mãos do profissional de saúde como transporte para a contaminação de instrumentos, aparelhos, ambiente e de outros pacientes e/ou fômites ou soluções contaminados (Jumaa & Chattopadhyay, 1992; Gaillot *et al.* 1998; D'Agata *et al.* 1999; Kac *et al.* 2004). Já foram relatados surtos envolvendo unidades de queimados (Revathi *et al.* 1998), hematologia e oncologia (Hibbert-Rogers *et al.* 1995), geriátrica (NNIS, 2002), e também em ambientes extra-hospitalares relacionados à assistência à saúde (Bradford *et al.* 1995; Cormican *et al.* 1998; Oteo *et al.* 2006).

A utilização de métodos laboratoriais de caracterização mais detalhada dos patógenos é de extrema importância para as investigações epidemiológicas. Assim, em especial a tipagem molecular pode auxiliar na identificação de surtos e de fontes de infecção, na diferenciação de modos de transmissão ou de disseminação do patógeno e na orientação das medidas a serem adotadas nos programas de controle de infecção (Tenover *et al.* 1995; Sader *et al.* 1995; Weber *et al.* 1997; Tosin *et al.* 2003).

Os métodos de tipagem epidemiológica preferidos são os genotípicos. Diversos métodos foram desenvolvidos devido aos problemas de tipabilidade (capacidade em proporcionar resultados bem definidos para cada um dos isolados), de reprodutibilidade (habilidade em produzir resultados idênticos, quando um mesmo isolado é tipado diversas vezes) e ao poder discriminatório (capacidade em diferenciar diferentes cepas de uma mesma espécie, principalmente quando elas são muito parecidas) (Sader *et al.* 1995).

Os métodos baseados no estudo de material genético podem envolver a análise plasmidial, cromossômica ou ribossômica. São alguns exemplos desses métodos: a análise

do DNA plasmidial, de polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) do DNA cromossômico, a tipagem de seqüências de inserção, os métodos que empregam PCR e o sequenciamento, a ribotipagem e a análise do DNA cromossômico pela eletroforese em campo elétrico pulsado (PFGE, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) (Pfaller & Herwaldt, 1997; Soll *et al.* 2003).

Embora não exista um método de tipagem molecular perfeito, o método que vem sendo muito utilizado para identificar se há ou não uma relação clonal entre os isolados bacterianos clínicos testados é a eletroforese em campo elétrico pulsado (PFGE), desenvolvida, em 1984. Esse método permite avaliar muitos tipos de patógenos hospitalares sendo amplamente utilizado nessas investigações, por apresentar ótimo poder discriminatório, reprodutibilidade e facilidade de interpretação (Tenover *et al.* 1995; Pfaller, 2001; Peterson & Noskin, 2001).

Existe um número significativo de publicações analisando a epidemiologia molecular das infecções nosocomiais causadas por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* produtores de ESBL. Em alguns deles pelo menos dois pacientes são colonizados ou infectados por cepas genotipicamente similares, evidenciando disseminação clonal ou policlonal e em outros é evidenciado um grande polimorfismo genético entre os isolados (Pessoa-Silva *et al.* 2003; Miranda *et al.* 2004; DiPersio *et al.* 2005; Mendonça *et al.* 2007; Lavigne *et al.* 2007; Pitout *et al.* 2007; Kristóf *et al.* 2007; Garcia *et al.* 2008; Carattoli *et al.* 2008).

#### **2.2.3.5. Métodos de detecção laboratorial de ESBL**

Desde a primeira descoberta das ESBL, surgiu uma variedade de métodos laboratoriais de detecção dessas enzimas, os quais podem ser divididos em fenotípicos e genotípicos.



O crescente aumento em termos mundiais da prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, as implicações clínicas a que sua não detecção podem levar e, principalmente, a falta de sensibilidade e especificidade dos testes de rotinas de suscetibilidade aos antimicrobianos para a sua detecção levaram ao aprimoramento de métodos fenotípicos para sua identificação (Bradford, 2001; Steward *et al.* 2001; Tenover *et al.* 2003; Jacoby *et al.* 2006; Bell *et al.* 2007).

Por essa razão o NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standard*) e atual o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), órgão responsável pela padronização de técnicas laboratoriais nos Estados Unidos, reavaliou os seus procedimentos e seus critérios de interpretação que recomendavam. Não só por serem eles de difícil execução ou inacessíveis para muitos laboratórios, mas também, por que falhavam na detecção dos fenótipos de ESBL pela falta de concordância dos resultados de concentração inibitória mínima.

Assim, desde 1994, o NCCLS vem recomendando uma metodologia baseada em testes de triagem e confirmatórios, sejam por técnica de disco difusão ou por métodos quantitativos. No entanto, essa metodologia é apropriada somente para as amostras de *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* e *Proteus mirabilis* (CLSI, 2008). De acordo com as recomendações do CLSI, no teste de triagem, deve-se observar uma sensibilidade diminuída, seja pelo aumento da concentração inibitória mínima ou pela diminuição do halo de inibição para cefpodoxima, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona ou aztreonam.

As ESBL formam um grupo de enzimas heterogêneas que podem apresentar diferentes graus de atividades e, por essa razão, as sensibilidades podem ser dependentes do tipo de substrato testado. Em função disso, quanto maior o número de substratos utilizados maior será a sensibilidade desse teste. Nesse sentido, o conhecimento do tipo de ESBL de

cada instituição ou região geográfica pode ser muito útil na determinação da escolha desses substratos.

Como testes confirmatórios são recomendadas pelo CLSI as metodologias de diluição ou de disco difusão utilizando-se da propriedade que a beta-lactamase ESBL é inibida pelo ácido clavulânico. Pelo método de disco difusão os substratos que devem ser testados é a ceftazidima e cefotaxima. A confirmação da produção de ESBL é dada pela verificação do aumento no halo de inibição de  $\geq 5$ mm comparados aos discos isolados e em combinação com o ácido clavulânico (CLSI, 2008).

Outros testes fenotípicos, para detecção de ESBL, têm sido utilizados, uma vez que não existe ainda um consenso em relação a melhor metodologia a ser adotada ou a padrão-ouro na destinação das enzimas. Trabalhos têm avaliado a acurácia desses testes e identificado as limitações e as vantagens de cada um, como o teste de aproximação dos discos, Etest® e sistemas automatizados com painéis específicos (Pereira, *et al.* 2003; Freitas *et al.* 2003; Gheldre, *et al.* 2003; Wiegand *et al.* 2007). Mesmo considerando os resultados de acurácia dos testes fenotípicos de identificação de ESBL, nenhum deles apresenta 100% de sensibilidade ou especificidade para a detecção acurada das ESBL entre isolados clínicos de bactérias Gram-negativas (Bradford, 2001).

Dentre os métodos moleculares, existem aqueles que servem como uma identificação presuntiva e outros que conseguem caracterizar essas enzimas. A determinação do ponto isoelétrico pode auxiliar na determinação da classe enzimática, assim como a utilização de PCR com “*primers*” de oligonucleotídeos específicos para genes de ESBL pode detectar a presença do gene que codifica essa enzima. Métodos de oligotipagem podem discriminar variantes TEM, e o método por PCR-RFLP os derivados de SHV. No entanto, o sequenciamento dos nucleotídeos permanece sendo o padrão para a determinação de específicos genes de ESBL (Bradford, 2001).

### **2.3. Monitoramento e prevenção da resistência microbiana**

O acentuado desenvolvimento da tecnologia médica aliado ao consequente aumento da expectativa de vida, proporcionou elevação da sobrevivência e do número de pessoas mantidas em atendimento sob condições críticas, incluindo nesse número os extremos de idade e os pacientes com doenças crônico-degenerativas. Entre os indivíduos mais suscetíveis, expostos a procedimentos de diagnóstico e/ou terapêuticos cada vez mais invasivos, as infecções relacionadas à assistência à saúde, em especial, as hospitalares tornaram-se cada vez mais frequentes (Garner *et al.* 1988; CDC NNIS, 2003).

Classicamente, a infecção hospitalar é definida como aquela adquirida após a admissão do paciente. Ela se manifesta após a internação ou a alta, por isso pode ser relacionada com a internação ou com os procedimentos hospitalares (Brasil, 1998). Atualmente, tem sido sugerida a mudança do termo infecção hospitalar para infecção relacionada à assistência à saúde, pois reflete melhor a causa de aquisição dessas infecções (ANVISA, 2004).

A natureza da assistência à saúde está sofrendo uma verdadeira revolução, sendo verificado um aumento no número de procedimentos ambulatoriais bem como nos serviços de assistência domiciliar e nos de longa duração. Vários fatores explicam esse movimento, entre esses fatores estão o desenvolvimento de tecnologias médicas e a humanização da assistência, além da questão dos altos custos de admissões hospitalares e a mudança demográfica com aumento no número de idosos (Pereira, 2004).

A importância das infecções associadas à saúde, em especial às nosocomiais transcende aos aspectos médicos individuais, pois sua apresentação endêmica e, com frequência epidêmica, confere ao problema uma dimensão de saúde pública. Agravando essa situação, a resistência microbiana aos tratamentos disponíveis com antimicrobianos, com ênfase para a bacteriana, foi considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS)

um problema prioritário de combate por todos os países. O que pode ser verificado que essa resistência está aumentando rapidamente em todo o mundo e, em particular, no ambiente hospitalar.

Um fato a destacar é que infecções causadas por microrganismos multirresistentes apresentam maior morbidade, mortalidade e aumento de custos diretos e indiretos. Esse aumento diz respeito a perdas de dias de trabalho, que se somam às disfunções físicas e ao estresse emocional do paciente, levando, assim, a condições incapacitantes e redução da qualidade de vida. A resistência pode resultar em falência terapêutica, aumento no tempo de internação, elevação no custo do tratamento, repercutindo no uso de agentes antimicrobianos mais caros, tóxicos e nem sempre disponíveis. Além disso, o aumento do número de drogas utilizadas, a necessidade de procedimentos de isolamento e precauções, incluindo exames laboratoriais específicos também produzem efeitos nos custos. Nos Estados Unidos, o *National Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que mais de quatro bilhões de dólares são gastos anualmente direta ou indiretamente, no tratamento de infecções causadas por organismos multirresistentes (Diekema *et al.* 1999; Henderson & Fishman, 2007).

Por uma variedade de razões as instituições de saúde precisam focar a atenção na prevenção das infecções relacionadas à assistência à saúde. O foco na prevenção contribui para o aumento de sobrevivência dos pacientes reduzindo, assim a morbidade e a mortalidade. Também diminui os custos de tratamentos hospitalares (ANVISA, 2004; Henderson & Fishman, 2007)

Como uma forma de monitoramento do desenvolvimento de resistência e orientação da terapia empírica, a Organização Mundial de Saúde recomendou a vigilância dos perfis de sensibilidade antimicrobiana entre as bactérias (WHO, 1978). Com o objetivo de diminuir a magnitude do problema de resistência bacteriana nacional e global, a

Sociedade Americana de Microbiologia (ASM), em 1995, sugeriu a necessidade de implantação de medidas nas áreas de educação, de pesquisa e de estudos de vigilância.

Segundo a ASM (1995), um programa de vigilância deve ser direcionado para: (1) a coleta de dados referentes às espécies bacterianas e fúngicas que frequentemente causam doenças nos seres humanos; (2) a utilização de testes laboratoriais de sensibilidade padronizados que gerem resultados confiáveis e comparáveis; (3) a coleta de informações demográficas para estabelecer a relação entre a emergência da resistência, terapia antimicrobiana e modo de aquisição da infecção, incluindo uso local de antimicrobianos e; (4) a informação dos resultados aos profissionais de saúde para a implantação de medidas de prevenção.

O modelo brasileiro de prevenção e controle das infecções relacionadas à assistência à saúde surgiu com a publicação, pelo Ministério da Saúde, da Portaria 196, estabelecendo a obrigatoriedade de manutenção Comissões de Controle de Infecções Hospitalares – CCIH em todos os hospitais (Brasil 1983). O reconhecimento do fenômeno das infecções hospitalares como um problema de saúde pública, foi consolidada em 1997, com a publicação da Lei Federal Nº 9431, que instituiu a obrigatoriedade da existência de programas de Controle de Infecção Hospitalar, em todos os hospitais brasileiros. Seu detalhamento é instituído pela Portaria Nº 2616, de 1998, que determinou as atribuições dos Programas de Controle das Infecções Hospitalares nos âmbitos nacional, estaduais, municipais e em cada instituição hospitalar (Brasil, 1997; Brasil, 1998).

Segundo essa Portaria, cabe as CCIH; (1) coordenar as ações de vigilância epidemiológica das infecções hospitalares; (2) supervisionar normas e rotinas técnico-operacionais relacionadas à prevenção e controle de infecções; (3) capacitar o quadro de funcionários e profissionais da instituição; (4) desenvolver ações para o uso racional de antimicrobianos, saneantes e materiais médico-hospitalares e; (5) realizar investigação

epidemiológica de casos e surtos, implementando medidas imediatas de controle (Brasil, 1998).

Atualmente, o Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar é coordenado pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), criada pela Lei Nº 9782, de 26 de janeiro de 1999.

Nos Estados Unidos, em 1958, a *American Hospital Association* (AHA) foi a primeira a recomendar que os hospitais tivessem programas formais para monitorizar e prevenir infecções. As principais entidades responsáveis pelo desenvolvimento de normas clínicas e de programas de controle incluem o *Centers do Disease Control and Prevention* (CDC), a *Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology*, a *Society for Healthcare Epidemiology of América* (SHEA) e a *American Society Task Force on Antibiotic Resistance* (ASM-TFAR).

Na década de 1970, o CDC iniciou o Sistema Nacional de Vigilância de Infecções Nosocomial (*National Nosocomial Infection Surveillance System – NNIS System*). Entre os objetivos, estava estimar a incidência de infecção hospitalar no país, verificar tendências das taxas, topografias mais afetadas e fatores de risco, resistência microbiana, assim como desenvolver uma metodologia para o monitoramento dessas infecções, que permitisse comparação interinstitucional e desenvolvimento de pesquisas (Santos, 2006).

O monitoramento da resistência microbiana em serviços de saúde é imprescindível para o desenvolvimento de ações de controle e prevenção a nível local relacionadas principalmente ao uso racional de antimicrobianos.

Em 2004, no Brasil, a ANVISA firmou um termo de cooperação com a Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS), em parceria com a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB/SVS/MS), para o desenvolvimento do Projeto: Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana

em Serviços de Saúde. O objetivo geral do projeto é aumentar a efetividade da assistência à saúde por meio do uso racional de antimicrobianos e da detecção tempestiva, da prevenção e do controle da emergência e disseminação da resistência microbiana em serviços de saúde no país. Entre os objetivos específicos, estão: (1) implantar a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM), (2) conhecer e monitorar o perfil de resistência microbiana hospitalar no Brasil, possibilitando a melhoria da regulação e da vigilância sanitária de serviços de saúde; (3) elaborar mecanismos para melhoria da qualidade dos dados e da emissão de laudos microbiológicos; (3) implantar sistema de notificação da emergência de microrganismos resistentes; (4) melhorar a solicitação, interpretação dos resultados dos exames microbiológicos e prescrição de antimicrobianos; (5) melhorar a efetividade do uso de antimicrobianos na assistência à saúde; (6) contribuir para a elaboração de normas técnicas e padrões de identificação microbianos, direcionados para a realidade brasileira e fomentar o desenvolvimento de estudos e pesquisas que subsidiem a implantação de estratégias de prevenção e controle específicos (ANVISA/OPAS, 2006).

Dados nacionais sobre resistência microbiana, assim como sobre o uso de antimicrobianos, ainda são escassos, com acurácia comprometida, em especial devido à deficiência de padronização de métodos laboratoriais. Os estudos brasileiros são direcionados para poucos patógenos ou inseridos em estudos multicêntricos, os quais incluem relativamente poucos centros brasileiros e um número pequeno de isolados clínicos considerando o nosso país de dimensão continental (ANVISA/OPAS, 2006).

Além de programas de vigilância conduzidos por entidades governamentais ligados a cada país, existem programas com abrangência mais ampla financiados pela indústria farmacêutica. Entre esses programas estão o SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*), o MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*), o

TEST (*Tigeciclina Evaluation Surveillance Trial*) e o BSAC (*The British Society for Antimicrobial Chemotherapy Resistance Surveillance Project*). São estudos envolvendo países distribuídos mundialmente pelos Estados Unidos, Canadá, Europa, Ásia, Oeste asiático, África do Sul e América Latina, incluindo Venezuela, Argentina, México, Chile e Brasil (Sader, *et al.* 2001; Babinchak *et al.* 2005; Kiffer *et al.* 2005; White. 2008).



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Médica Humana da Universidade de Caxias do Sul (UCS), em conjunto com o serviço de Análises Clínicas (Laboratório de Microbiologia) do Hospital Geral de Caxias do Sul (HGCS) e do setor de Microbiologia do Alfa Laboratório de Análises Clínicas, localizados no município de Caxias do Sul, a nordeste do Estado do Rio Grande do Sul (RS).

O Hospital Geral caracteriza-se como uma instituição de assistência hospitalar de caráter público, de alta complexidade e de ensino e pesquisa na área de saúde, representando o hospital de ensino da Universidade de Caxias do Sul. Presta assistência médica tanto à população local quanto à oriunda de outros municípios de abrangência da 5ª Coordenadoria Regional da Saúde do RS. Cobre, atualmente, 48 municípios com uma população total de cerca de 980 mil pessoas, incluindo o município de Caxias do Sul.

O HGCS está instalado num prédio de seis pavimentos equipados para tratamentos clínicos, cirúrgicos, diagnóstico e de apoio. Tem capacidade para aproximadamente 267 leitos, distribuídos entre as unidades: Clínica Médica/Cirúrgica (114), Obstetrícia/Ginecologia (31), Pediatria (51), Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) Neonatal (17), UTI Adultos (10), UTI Pediátrica (10), Clínica Psiquiátrica (7), Serviço de Atendimento Médica de Urgência e Emergência (23) e Gestante de Alto Risco (4).

O Laboratório de Microbiologia do HGCS, além dos exames internos, também realiza exames externos para pacientes da comunidade encaminhados pela rede pública.

O Alfa Laboratório de Análises Clínicas é uma instituição da rede privada com cinco unidades de atendimento e quatro delas localizadas em Caxias do Sul. Presta atendimento à comunidade tanto local do município de Caxias do Sul, com aproximadamente 480 mil habitantes, quanto regional proveniente de outros municípios.

### 3.1 Isolado bacteriano

Foram analisados 1346 isolados clínicos, sendo 1162 de *Escherichia coli* e 184 de *Klebsiella* spp (180 *K. pneumoniae* e 4 de *K. oxytoca*), obtidos entre abril de 2003 e maio de 2006, cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do HGCS e pelo setor de Microbiologia do Alfa Laboratório (Unidade 1), localizados no município de Caxias do Sul. Somente um isolado bacteriano por paciente foi incluído no estudo.

As bactérias analisadas nesse trabalho e isoladas pelo Laboratório de Microbiologia do HGCS foram provenientes dos mais diversos materiais clínicos, enquanto que, as isoladas pelo setor de Microbiologia Alfa Laboratório foram todas oriundas de culturas de urina.

Após o isolamento e a identificação bacteriana rotineira realizada nos laboratórios de Microbiologia das duas instituições, os isolados foram transportados e armazenados no Laboratório de Microbiologia Médica Humana (MICRO). Nesse laboratório, seguiu-se a confirmação da identificação bacteriana mediante o isolamento em ágar MacConkey para a avaliação da morfologia colonial, da fermentação de lactose e a realização de provas bioquímicas convencionais. Foram avaliados a produção de indol, gás e H<sub>2</sub>S, a mobilidade, a utilização de citrato, a via da fermentação da glicose (prova do vermelho de metila e de Voges-Proskauer), a fermentação da lactose pela prova ONPG (o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo) quando necessária, a produção de urease e a descarboxilação de ornitina (Abbott, 2003; Bopp *et al.* 2003; Winn *et al.* 2006).

Os isolados de *E. coli* e *Klebsiella* spp produtores de ESBL obtidos nos anos de 2003 e 2004 foram retirados do banco de microrganismos do MICRO e incluídos no presente estudo. Esses isolados foram oriundos do HGCS e selecionados durante um projeto de pesquisa desenvolvido pelos pesquisadores do MICRO.

### 3.2 Identificação e caracterização dos pacientes

A identificação e a coleta de dados dos pacientes envolvidos nesse estudo, provenientes do HGCS, foram realizadas através de levantamento no banco de dados do laboratório e diretamente dos prontuários dos pacientes, respectivamente. Os prontuários foram solicitados junto ao Serviço de Arquivo Médico (SAME) do hospital. Para a coleta dos dados foi elaborada uma ficha contendo dados demográficos, epidemiológicos e laboratoriais (Anexos 1 e 2).

A análise dos prontuários permitiu a classificação quanto ao modo de aquisição da infecção, se hospitalar ou comunitária, dos pacientes internados. O diagnóstico de infecção hospitalar foi definido de acordo com o *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) que considera como infecção hospitalar qualquer infecção adquirida após 48 horas de internação do paciente ou que se manifesta com menos de 48 horas nos casos de transferência hospitalar ou de casa de saúde, ou hospitalização prévia de duas semanas (Garner *et al.* 1988).

Para os neonatos, foram consideradas hospitalares as infecções adquiridas intraparto, durante a hospitalização, ou adquiridas em até 48 horas após a alta, com exceção às infecções transplacentárias, como a rubéola, a citomegalovirose, a hepatite tipo B, a infecção por herpes simples, a síndrome da imunodeficiência adquirida, a toxoplasmose e a sífilis (Garner *et al.* 1988).

No grupo de pacientes com suspeita de infecção comunitária, foram incluídos todos os pacientes que procuraram os serviços do Laboratório Alfa. Aqueles atendidos no HGCS, somente foram considerados nesse grupo de infecção comunitária, os pacientes não internados ou com menos de 48 horas de internação no momento da coleta da amostra clínica. Nesse grupo foram incluídos apenas os que não tinham sido transferidos de hospital e nem haviam sido previamente internados num período de duas semanas (Rodriguez-Baño

*et al.* 2004).

### **3.3 Detecção fenotípica dos isolados de *E. coli* e *Klebsiella* spp produtores de ESBL**

A identificação laboratorial dos produtores de ESBL foi realizada pelo método de disco-difusão (Kirby-Bauer), conforme os critérios estabelecidos no documento do CLSI/NCCLS (*Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards*) (2005).

Para cada bactéria foi preparada uma suspensão em solução fisiológica estéril com três a quatro colônias da mesma morfologia, após a incubação a 35°C por 16 a 18 horas. Esse inóculo, seguido da comparação e do ajuste visual com a escala de turvação 0,5 de McFarland, foi semeado em uma placa de Petri contendo ágar Müeller-Hinton (Oxoid®, Basingstoke).

Para o teste de triagem foram dispensados na superfície do ágar de Müeller-Hinton, após a semeadura, discos (Oxoid®) de aztreonam (ATM), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) e ceftriaxona (CRO). A aferição dos halos de inibição ocorreu após a incubação a 35°C por 16 a 18 horas. O substrato cefpodoxima (CPD) foi incluído no teste de triagem para os isolados bacterianos a partir do ano de 2005. Todos os isolados com halo de inibição menor ou igual aos pontos de corte, para pelo menos um dos antimicrobianos a seguir foram considerados como prováveis produtores de ESBL: aztreonam e cefotaxima ( $\leq 27\text{mm}$ ), ceftazidima ( $\leq 22\text{mm}$ ), ceftriaxona ( $\leq 25\text{mm}$ ) e cefpodoxima ( $\leq 17\text{mm}$ ).

Os isolados considerados como prováveis produtores de ESBL foram submetidos ao teste confirmatório. Nesse caso foram dispensados na superfície do ágar Müeller-Hinton, após a semeadura, os discos de ceftazidima e cefotaxima (Oxoid®) combinados, cada um deles com ácido clavulânico. Os halos de inibição foram aferidos após a incubação a 35°C por 16 a 18 horas. Isolados que mostraram em pelo menos um dos dois substratos um

aumento de  $\geq 5$ mm no diâmetro dos halos na presença de ácido clavulânico foram designados como isolados com fenótipo ESBL confirmado. O substrato cefpodoxima também foi incluído no teste confirmatório para os isolados bacterianos a partir do ano de 2005. Cepas padrões *E. coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 700603 foram usadas como controles negativo e positivo de produção de ESBL, respectivamente.

Os isolados com fenótipo ESBL confirmados também foram submetidos ao teste confirmatório com discos de cefepima (Oxoid®) com e sem ácido clavulânico. Esses discos foram preparados no mesmo dia do teste e utilizados após uma hora da impregnação com 10 $\mu$ L de uma solução de ácido clavulânico a 1000  $\mu$ L/mL preparada a partir de uma solução de amoxicilina/ácido clavulânico. Foram realizados testes que mostraram resultados satisfatórios ao serem comparados os halos de inibição dos discos de ceftazidima e cefotaxima combinados com ácido clavulânico (Oxoid®) e com os halos obtidos a partir dos discos impregnados com ácido clavulânico *in house*.

As bactérias produtoras de ESBL foram armazenadas no banco de microrganismos do MICRO a -20°C e do Laboratório de Pesquisa em HIV/AIDS da UCS a -70°C, em frascos com meio *skim milk* de leite desnatado em pó (20% (pes/vol), dissolvidos em água destilada e autoclavados a 110°C por 20 minutos (Reiner & Carroll, 2003).

### **3.4 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos**

A avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos foi realizada para os isolados produtores de ESBL e, aleatoriamente, para um grupo de bactérias não produtoras de ESBL. Foi utilizada a técnica de disco-difusão, Kirby-Bauer, conforme recomendação do CLSI/NCCLS (2005). Na superfície do ágar de Mueller-Hinton, após a semeadura do inóculo na escala de turbidez de 0,5 MacFarland, foram dispensados discos (Oxoid®) impregnados com os seguintes antimicrobianos: ampicilina (AMP), ampicilina/sulbactam

(SAM), cefoxitina (FOX), cefalotina (KF), cefpodoxima (CPD), ceftriaxona (CRO), ceftazidima (CAZ) cefotaxima (CTX), cefepima (FEP), imipenem (IPM), ertapenem (ETP), aztreonam (ATM), gentamicina (CN), amicacina (AK), tobramicina (TOB), ciprofloxacina (CIP), gatifloxacina (GTX), sulfamotoxazol/trimetoprim (SXT), nitrofurantoína (F), ácido nalidíxico (NA), estreptomicina (S), tetraciclina (TE) e tigeciclina (TGE).

A aferição dos halos de inibição foi feita após incubação a 35 °C por 16 a 18 horas, e a interpretação dos testes em resistente, intermediário ou sensível, realizada de acordo com os critérios definidos pelo CLSI/NCCLS (2005). Como a tigeciclina aguarda avaliação pelo CLSI, foram utilizados os pontos de corte propostos pelo FDA (*Food and Drug Administration*).

### **3.5 Detecção dos genes de beta-lactamase por reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Os isolados com fenótipo ESBL considerados confirmados foram submetidos ao método da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar os genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>. Foram utilizados os *primers* descritos por Bonnet *et al.* (2001b) e Paterson *et al.* (2003) (**Tabela 5**).

Após cultivo em caldo TSB por um período de 16 a 18h a 35±1 °C, 5µL de cada amostra foram transferidos para um tubo tipo *Eppendorf* contendo 195µL de água Milli Q. A seguir foram preparadas as soluções mãe contendo 20mM Tris-HCL, pH 8,4, solução de 5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM de cada dinucleotídeos dATP, dTTP, dGTP e dCTP, 0,24% de Triton-X-100, 60ng dos respectivos pares de iniciadores para cada gene pesquisado e 0,75U de *Taq* polimerase (Invitrogen®). Vinte e um microlitros da solução mãe foram dispensados em tubos de amplificação, aos quais foram adicionados 4,0µL da suspensão bacteriana e posteriormente submetidos a termociclagem.

Foi utilizado o termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf®) em diferentes condições. Para os genes *bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>CTX-M</sub>* as condições de termociclagem foram as seguintes: 5 minutos à 94°C para o primeiro ciclo (fase inicial de desnaturação do DNA), seguidos de 35 ciclos (30 segundos à 94°C - desnaturação, 1,5 minutos à 60°C – anelamento, 2 minutos à 72°C - extensão) e finalmente mais 5 minutos à 72°C e 15 minutos à 4,0°C. Para o gene *bla<sub>TEM</sub>* as mesmas condições foram utilizadas, mas nesse caso, houve alteração na temperatura de anelamento para 45°C.

Vinte e cinco microlitros do produto da reação do PCR mais 5µL de uma solução de sacarose a 40% e azul de bromofenol a 0,25% foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% incorporado com 0,36mg/mL de brometo de etídio. Essa solução foi submetida a 90V por 2,5 horas em tampão TBE 1X (89mMTris-borato, 2mM EDTA, pH 8,0). Foi utilizado como marcador de massa molecular DNA λ clivado com as enzimas de restrição EcoRI e Hind III com 125 a 2122 pares de bases. O gel foi visualizado e fotografado contra luz ultravioleta e digitalizados com o auxílio de um sistema UVITEC com filtro laranja.

**Tabela 5:** Sequências iniciadoras utilizadas nas reações de ampliações

<b>Gene amplificado</b>	<b>Sequências de nucleotídeos</b>	<b>Tamanho esperado do fragmento amplificado (pb)</b>
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	F – AAACGCTGGTGAAAGTA R- AGCGATCTGCTAT	717 <sup>a</sup>
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	F – ATGCGTTATATTCGCCTGTG R – TGCTTTGTATTCGGGCAA	723 <sup>a</sup>
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	F – CGCTTTGCGATGTGCAG F – ACCGCGATATCGTTGGT	550 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Paterson *et al.* (2003) ; <sup>b</sup> Bonnet *et al.* (2001b)

### 3.6 Tipagem molecular por eletroforese em campo elétrico pulsado (PFGE)

Para a determinação dos perfis moleculares dos isolados de *E. coli* e *Klebsiella spp* produtores de ESBL, foi empregado o método de macrorestrição de DNA seguido de eletroforese em campo elétrico pulsado ou PFGE.

As bactérias produtoras de ESBL foram cultivadas em 8mL de caldo TSB e incubadas a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  por um período de 18 a 24 horas. Após esse período, a cultura foi centrifugada por 15 minutos e, em seguida, desprezado o sobrenadante. O centrifugado foi resuspenso em 1mL de tampão TE (Tris 100mM; pH 7,5; EDTA 100 mM; NaCl 150 mM) e transferido para um tubo de centrífuga. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos e o sobrenadante cuidadosamente aspirado e desprezado. Foi adicionado 400 $\mu\text{L}$  de tampão TE e após a homogeneização, 80 $\mu\text{L}$  dessa diluição de células foram retirados e misturados com 320 $\mu\text{L}$  de agarose 1% (*low melting point*). Com os tubos em banho-maria a  $57^{\circ}\text{C}$ , os moldes foram preenchidos e transferidos para o refrigerador por 15 a 30 minutos.

Após retirar os blocos dos moldes, incubá-los em 1,5mL de tampão de proteólise (EDTA 0,5M; pH 9,5; lauril sarcosil 1,0%) adicionada de 38 $\mu\text{L}$  de proteinase K (20 mg/mL) por 2 horas a  $57^{\circ}\text{C}$ , agitando de 30 em 30 minutos. A seguir os blocos foram lavados duas vezes em 10mL de água Milli Q por 15 minutos, a  $57^{\circ}\text{C}$  e mais três vezes em 10mL de tampão TE por 15 minutos a  $57^{\circ}\text{C}$ . Nessa solução os blocos ficaram armazenados em temperatura de refrigeração, até serem submetidos à digestão enzimática e posterior eletroforese.

Para a realização da digestão, menos de um terço de cada bloco foi incubado por 16-18 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  com tampão de restrição contendo 10U/ $\mu\text{L}$  da enzima *SpeI*. Os blocos foram inseridos em um gel de agarose a 1,2% e as frações de DNA resultantes foram separadas através do sistema CHEF- DRIII (Bio-Rad, Richmond®). O tempo de migração foi de 22 horas com um pulso inicial de 5s e final de 25s, numa solução tampão TBE 0,5x



(Tris 0,891 M; ácido bórico 0,90 M; EDTA 0,019 M) acrescido de 120µL de tiouréia 0,5 M por litro de tampão. A eletroforese foi realizada numa temperatura de 13°C, utilizando uma corrente elétrica de 5,9 V/cm e um ângulo de 120°. Foi usado como marcador de peso molecular o fago *Lambda Ladder* 48,5 Kb. O DNA, após a separação, foi corado com brometo de etídio (0,5µg/mL) por aproximadamente 40 minutos e descorado em água destilada por mais 40 minutos, e a seguir visualizado e fotografado sob luz ultravioleta (UV).

Os perfis de macrorrestrição do DNA foram comparados visualmente e a relação entre os isolados foi estabelecida utilizando-se os critérios baseados no número de eventos genéticos necessários para provocar uma alteração de bandas, os quais classificam os isolados em: distintos, possivelmente relacionados, provavelmente relacionados e indistinguíveis. São considerados isolados distintos aqueles que apresentaram sete ou mais bandas discordantes; isolados possivelmente relacionados aqueles que apresentaram quatro a seis bandas diferentes; provavelmente relacionados aqueles que apresentaram até três bandas diferentes e isolados indistinguíveis, aqueles com o mesmo perfil de macrorrestrição (Tenover *et al.* 1995).

### **3.7 Transferência do gene codificador de ESBL por conjugação**

Os trinta e cinco isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL resistentes à ceftriaxona e sensíveis à estreptomicina foram selecionados para o processo de transferência dos genes de resistência por conjugação. A cepa *E. coli* α-DH foi usada como receptora dos plasmídios contidos nos isolados de *K. pneumoniae*. Essa cepa é resistente à estreptomicina, não é capaz de fermentar a lactose e não possui plasmídio. A técnica utilizada foi adaptada de Coque *et al.* (2002).

Os isolados doadores e receptores foram cultivados, isoladamente, em ágar MacConkey por 16 a 18 horas a 35°C. Com colônias isoladas foi realizada uma suspensão em caldo de Lurian-Bertani (LB) e incubadas a 35°C, até atingir a fase exponencial de crescimento por cerca de 4 horas. Posteriormente, em 8mL de caldo LB foi misturado uma alíquota de 500µL do caldo contendo o isolado de *K. pneumoniae* com uma alíquota de 500µL do caldo contendo a cepa receptora. As duas suspensões foram incubadas por 4 horas a 35°C. Após esse período, 100µL da suspensão foram espalhados com uma alça de Drigalky sobre a superfície de uma placa contendo ágar MacConkey, adicionado de 30µg/mL de ceftriaxona e 300 µg/mL de estreptomicina, para selecionar as colônias transconjugantes. Cerca de seis colônias foram novamente subcultivadas em ágar MacConkey suplementado com 30µg/mL de ceftriaxona e submetidas à confirmação fenotípica da produção de ESBL e ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos como descritos nos itens **3.3 e 3.4**, respectivamente.

### **3.8 Questões éticas**

O protocolo da presente investigação foi aprovado pelas Comissões Científicas e de Ética da UCS e do HGCS (Anexo 3). Considerando-se o caráter observacional da pesquisa e a obtenção dos isolados clínicos provenientes de culturas de rotinas, não foi necessário solicitar um termo de consentimento livre e nem prestar esclarecimentos aos pacientes.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados serão apresentados na forma de capítulos, correspondentes a trabalhos enviados ou em preparação para publicação.

### **Capítulo 1.**

#### **Prevalence of extended spectrum $\beta$ -lactamase (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp originating in the community and in hospitals in Caxias do Sul, RS, Brazil**

Cláudia Wollheim; Vania D. Conte; Schelia Hoffman; Ivani Maria F. Guerra; Fernando J. Schreiner; Ana Paula Longaray Delamare; Afonso L. Barth; Sérgio Echeverrigaray ; Sérgio Olavo P. da Costa.

### **Capítulo 2.**

#### **Assessment of screening and confirmatory tests in the detection of extended spectrum $\beta$ -lactamases (ESBL) in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.**

Cláudia Wollheim; Vania D. Conte; Juliana Conrad da Silva; Ivani Maria F. Guerra; Fernando J. Schreiner; Afonso L. Barth; Sérgio Echeverrigaray; Sérgio Olavo P. da Costa.

### **Capítulo 3.**

#### **Disseminação de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado ESBL num hospital de ensino situado na região Sul do Brasil.**

Cláudia Wollheim; Vania D. Conte; Graziela Mazzarolo; Ivani Maria F. Guerra; Fernando J. Schreiner; Afonso L. Barth; Sérgio Echeverrigaray; Sérgio Olavo P. da Costa.

## Capítulo 1.

### **Prevalence of extended spectrum $\beta$ -lactamase (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp originating in the community and in hospitals in Caxias do Sul, RS, Brazil**

Cláudia Wollheim<sup>1</sup>; Vania D. Conte<sup>1</sup>; Shelia Hoffman<sup>1</sup>; Ivani Maria F. Guerra<sup>1</sup>; Fernando J. Schreiner<sup>1</sup>; Ana Paula Longaray Delamare<sup>2</sup>; Afonso L. Barth<sup>3</sup>; Sérgio Echeverrigaray<sup>2</sup>; Sérgio Olavo P. da Costa<sup>2;4\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia Médica, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil; <sup>2</sup> Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil; <sup>3</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS <sup>4</sup> Universidade Católica de Santos, Santos, SP, Brasil

Trabalho enviado para *Brazilian Journal of Microbiology*

\*Corresponding Author. Mailing address: Rua Dr. Mário Ferraz, 77/42. CEP 01453-010 São Paulo - SP, Brasil. Tel: 55 11 3819-9788. E-mail: sopdcost@usp.br

## ABSTRACT

The extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) represent one of the most important problems worldwide of resistance to the  $\beta$ -lactam antimicrobials that are commonly used in the treatment of many bacterial infections, caused by gram-negative pathogens, especially among members of the *Enterobacteriaceae* family. The aims of this study are to establish the prevalence of ESBL and determine the ESBL genes in clinical isolates of *E. coli* and *Klebsiella* spp acquired in the community and in a hospital environment in Caxias do Sul. Of the total of 1346 clinical isolates (1162 *Escherichia coli*, 180 *Klebsiella pneumoniae* and 4 *K. oxytoca*), 992 presented infection of community origin (238 patients interned and 754 not interned) and 354 patients with hospital infection. Of the 953 isolates of *E. coli* of community origin, 0.4% were ESBL producers, compared with 6.7% of the 209 isolates from a hospital origin. Among the 38 isolates of *K. pneumoniae* of community origin, one (2.6%) was an ESBL producer, compared with 43.7% of the 142 isolates from a hospital origin. Among the isolates of *K. oxytoca*, one in three (33.3%) from a hospital origin had the ESBL-producing phenotype. Analysing the prevalence of ESBL producers in hospital *E. coli* over a period of three years, it changed from 4.3% to 10.8%, while for *Klebsiella* spp the high prevalence (>40%) did not alter significantly in this period. The presence of the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene was detected in 50.0% (*E. coli*) and 82.8% (*Klebsiella* spp), the *bla*<sub>SHV</sub> gene in 11.1% (*E. coli*) and 42.2% (*Klebsiella* spp) and the *bla*<sub>TEM</sub> gene in 66.7% (*E. coli*) and 95.3% (*Klebsiella* spp). ESBL-producing isolates of *E. coli* and *Klebsiella* spp, constitute an essentially nosocomial problem, since the dissemination of these bacteria to the community has not been very significant.

**Key words:** ESBL, *E. coli* and *Klebsiella* spp, community and hospital infections, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> genes

**Prevalência de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp de origem comunitária e hospitalar em Caxias do Sul, RS, Brasil**

**RESUMO**

As  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado (ESBL) representam um dos mais importantes problemas mundiais de resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos comumente utilizados no tratamento de muitas infecções bacterianas, causadas por patógenos Gram-negativos, em especial entre membros da família *Enterobacteriaceae*. Este estudo teve como objetivos estabelecer a prevalência de ESBL e determinar os genes de ESBL em isolados clínicos de *E. coli* e *Klebsiella* spp adquiridos na comunidade e no ambiente hospitalar em Caxias do Sul. Do total de 1346 isolados clínicos (1162 *Escherichia coli*, 180 *Klebsiella pneumoniae* e 4 *K. oxytoca*), 992 apresentaram infecção de origem comunitária (238 pacientes internados e 754 não-internados) e 354 pacientes com infecção hospitalar. Entre os 953 isolados de *E. coli* de origem comunitária, 0,4% foram produtores de ESBL, comparados com 6,7% dos 209 isolados de origem hospitalar. Entre os 38 isolados de *K. pneumoniae* de origem comunitária, um (2,6%) foi produtor de ESBL, comparado com 43,7% dos 142 isolados de origem hospitalar. Entre os isolados de *K. oxytoca*, um entre os três (33,3%) de origem hospitalar apresentaram o fenótipo produtor de ESBL. Analisando ao longo de um período de três anos a prevalência de produtores de ESBL em *E. coli* hospitalares, passou de 4,3% para 10,8%, sendo que para *Klebsiella* spp, as altas prevalências (>40%) não se alteraram significativamente durante o período. A presença do gene *bla*<sub>CTX-M</sub> foi detectado em 50,0% (*E. coli*) e 82,8% (*Klebsiella* spp), o gene *bla*<sub>SHV</sub> em 11,1% (*E. coli*) e 42,2% (*Klebsiella* spp) e o gene *bla*<sub>TEM</sub> em 66,7% (*E. coli*) e 93,8% (*Klebsiella* spp). Isolados de *E. coli* e *Klebsiella* spp produtores de ESBL, constituem um problema essencialmente nosocomial, sendo que a disseminação dessas bactérias à comunidade tem sido pouco expressiva.

**Palavras-chaves:** ESBL, *E. coli* and *Klebsiella* spp, infecção comunitária e hospitalar, genes *bla*<sub>CTX-M</sub> *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub>

## INTRODUCTION

Records of ESBL-producing clinical isolates have spread rapidly through Europe and the United States since the first description of them in 1983, in Germany, and are now disseminated among members of the *Enterobacteriaceae* family (3,7,16). They currently represent one of the most important world problems of resistance to  $\beta$ -lactam antimicrobials commonly used in the treatment of many bacterial infections (9,28).

The world prevalence of ESBL producers varies greatly, even among health institutions in the same country. However it has been significantly greater in certain geographical regions, including South America, compared to countries in the north and northwest of Europe, the United States and Canada (35). Although it is more significant in hospitals, the dissemination of these micro-organisms outside hospitals is becoming an incipient problem in some countries (4,23,31).

Traditionally ESBL appeared just after the introduction of third-generation cephalosporins in the 80s, deriving from mutations in the *bla*<sub>TEM-1/2</sub> and *bla*<sub>SHV-1</sub> genes of the  $\beta$ -lactamase plasmids (class A, subgroup 2b) which were widely disseminated at that time (2). The ESBL (class A, subgroup 2be) of the TEM e SHV types are distributed throughout the world, with more than two hundred enzymatic variants catalogued. More recently, several ESBL of types other than TEM or SHV have been reported, especially from the CTX-M family. The CTX-M family shares less than 40% of identity with the TEM and SHV types, is extremely heterogeneous and is the most prevalent type among the ESBL other than TEM and SHV (<http://www.lahey.org/studies>). Some CTX-M  $\beta$ -lactamases probably evolved from chromosomal  $\beta$ -lactamases of different environmental species of *Kluyvera* (5).

The isolation of ESBL-producing bacteria has important clinical-epidemiological implications, since by preventing the administration of all penicillins, cephalosporines and aztreonam it can lead to the excessive use of other wide spectrum drugs, such as carbapenemics, increasing the risk of the emergence of *Acinetobacter* spp and *Pseudomonas aeruginosa* which are resistant to carbapenemics (22). Furthermore, these isolates frequently present co-resistance to antimicrobials other than  $\beta$ -lactams, reducing even more the antimicrobial arsenal and they have been described in numerous reports of outbreaks, especially involving *Klebsiella pneumoniae*, but also *Escherichia coli* (21,25,27).

The aims of this study are to establish the prevalence of ESBL and determine the ESBL genes in clinical isolates of *E. coli* and *Klebsiella* spp acquired in the community and in the hospital environment during a period of three years, observed in the southern region of Brazil.



## MATERIAL AND METHODS

### Clinical isolates

We analysed a total of 1346 clinical isolates (1162 *Escherichia coli*, 180 *Klebsiella pneumoniae* and 4 *K. oxytoca*) collected from April 2003 to May 2006, in the General Hospital and in a private clinical analysis laboratory in Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

The hospital in the study is a university hospital which attends the population in general and has a high degree of complexity for work-up, surgery and clinical treatment. It has 257 beds and offers medical care not only to the local population, but also to the region, which has around 980,000 inhabitants. Only one bacterial isolate from each patient was included in the study, and it was classified as to whether the origin of the infection was the community or the hospital. The diagnosis of hospital infection was defined according to the CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (13). The group of patients suspected of having a community infection was considered to be those who were not in hospital, or had been in hospital for less than 48 hours at the time of the collection of the clinical sample, provided they had not been transferred from another hospital or been in hospital in the previous two weeks (31).

The identification of the bacterial isolates as regards kind and species was confirmed using the conventional biochemical tests and they were stored at -70°C in a *skim milk* medium at 20% (11).

### Screening and confirmatory tests for ESBL producers

The laboratory identification of ESBL producers was carried out with the diffusion method in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (10). All

the isolates with inhibition halo  $\leq$  the cut-off, for at least one of the following antimicrobials - aztreonam and cefotaxime ( $\leq 27\text{mm}$ ), ceftazidime ( $\leq 22\text{mm}$ ), ceftriaxone ( $\leq 25\text{mm}$ ) and/or cefpodoxime ( $\leq 17\text{mm}$ ) – were considered to be probable ESBL producers, and submitted to the confirming test with discs of cefpodoxime, ceftazidime, cefotaxime and cefepime, combined with clavulanic acid. In the selection and confirmatory tests Oxoid® discs were used, and the cefepime discs containing clavulanic acid were prepared daily. Isolates that showed in at least one of the two substrates standardised by the CLSI (ceftazidime and cefotaxime) an increase of  $\geq 5\text{mm}$  in the diameter of the halos in the presence of clavulanic acid were designated as isolates with ESBL phenotype confirmed. The standard strains *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 700603 were used respectively as negative and positive controls of production of ESBL.

### **Molecular characterisation by PCR**

The bacterial isolates with confirmed ESBL phenotype were submitted to PCR assay to identify the *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes, using the *primers* described by Paterson et al. (2003) (28). All the reactions were carried out in a volume of 25 $\mu\text{L}$  with 0.75U of *Taq* polimerase (Invitrogen®), using the following thermocycling conditions: 5 minutes of denaturation at 94°C, followed by 35 cycles of denaturation (30 seconds at 94°C), annealing (1.5 min at 60°C for CTX-M and SHV and 45°C for TEM), extension (2 min at 72°C), finishing with an extension period of 5 min at 72°C and 15 min at 4.0°C. The *K. pneumoniae* ATCC 700603 strain was used as a positive control for the *bla*<sub>SHV</sub> gene.

## RESULTS

### Population under study

Of the total of 1346 patients studied, 992 had an infection acquired in the community (238 patients in hospital and 754 not in hospital) and 354 an infection acquired in hospital (Table 1). 1080 patients (80.2%) were female (89.3% among those with community infections, however, and 54.8% among those with hospital infections). The mean age with standard deviation was  $42.8 \pm 24.8$  years, varying from 5 days to 97 years. The two most widely represented age bands were from 22 to 60 years with 48.1% (55.6% of those with community infections, however, and 29.9% of those with hospital infections) and over 60 years with 29.7% (21.4% of those with community infections, however, and 49.7% of those with hospital infections) (Table 1).

The 354 patients with hospital infections were distributed as follows, as regards the three most representative hospital departments: clinical-surgical (41.8%), intensive care (29.4%) and urgency and emergency (15.5%). Among the 238 patients in hospital with a community infection, 40.7% and 38.7% were in the urgency and emergency and in the obstetrics unit, respectively (Table 1).

The most frequent site of *E. coli* and *Klebsiella* spp isolation was in the urine, with 86.3%, although only 54.2% of those of hospital origin. The other clinical specimens varied from 1.4% to 14.1% (blood), 0.8% to 7.1% (peritoneal liquid) and 0.1% to 4.5% (skin/surgical wound) among patients with community and hospital infections, respectively. Samples from airways, catheter and pleural liquid were only obtained from patients with nosocomial infections, with percentages of 18.1%, 1.4% and 0.6%, respectively (Table 1).

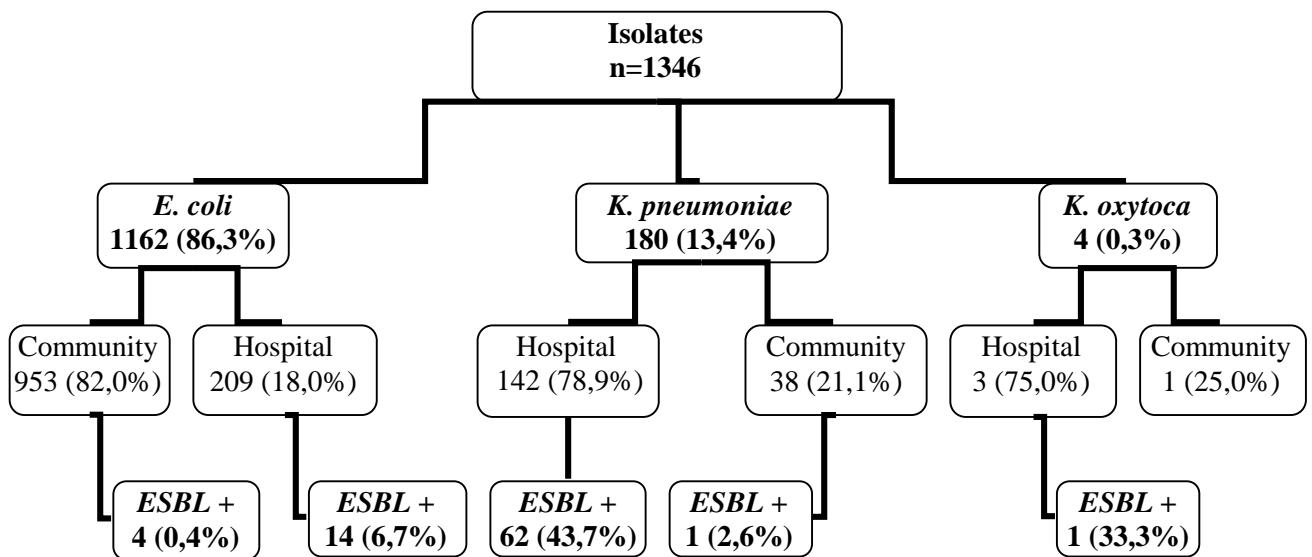
**Table 1.** Characteristics of the population analysed. \*

Characteristics	Origin of the infection		Total (n=1346)
	Community (n= 992)	Hospital (n= 354)	
<b>Females % (N)</b>	89.3 (886)	54.8 (194)	80.2 (1080)
<b>Age %</b>	<b>(n=850)</b>	<b>(n=354)</b>	<b>(n=1204)</b>
Mean $\pm$ SD	39.1 $\pm$ 22.4	51.4 $\pm$ 28.0	42.8 $\pm$ 24.8
Variation % (days - years)	42 – 93	5 – 97	5 – 97
<1 year (N/n)	3.4 (29)	11.6 (41)	5.8 (70)
1- 12 years (N/n)	7.3 (62)	5.4 (19)	6.7 (81)
13 – 21 years (N/n)	12.2 (104)	3.4 (12)	9.6 (116)
22 to 60 (N/n)	55.6 (473)	29.9 (106)	48.1 (579)
> 60 (N/n)	21.4 (182)	49.7 (176)	29.7 (358)
<b>Unit where hospitalised % (N)</b>	<b>(n=238)</b>	<b>(n=354)</b>	<b>(n=592)</b>
Clinical-Surgical	5.9 (14)	41.8 (148)	27.4 (162)
Urgency and Emergency <sup>a</sup>	40.7 (97)	15.5 (55)	25.7 (152)
Intensive care <sup>b</sup>	1.7 (4)	29.4 (104)	18.2 (108)
Obstetrics Centre	38.7 (92)	2.5 (9)	17.1 (101)
Paediatrics	1.7 (4)	4.8 (17)	3.5 (21)
Surgical Centre	3.4 (8)	2.5 (9)	2.9 (17)
Obstetrics /Gynaecology	2.5 (6)	1.1 (4)	1.7 (10)
High Risk Outpatient	2.9 (7)	0.3 (1)	1.4 (8)
Oncology Service	2.5 (6)	0.6 (2)	1.4 (8)
Chest Pain		1.4 (5)	0.8 (5)
<b>Site of isolation % (N)</b>	<b>(n=992)</b>	<b>(n=354)</b>	<b>(n=1346)</b>
Urine	97.7 (969)	54.2 (192)	86.3 (1161)
Blood	1.4 (14)	14.1 (50)	4.8 (64)
Airways <sup>c</sup>	-	18.1 (64)	4.8 (64)
Peritoneal liquid	0.8 (8)	7.1 (25)	2.5 (33)
Skin/surgical wound	0.1 (1)	4.5 (16)	1.3 (17)
Catheter	-	1.4 (5)	0.4 (5)
Pleural liquid	-	0.6 (2)	0.1 (2)
<b>Origin of the patients% (N)</b>			
<b>Hospitalised</b>	<b>24.0 (238)</b>	<b>100.0 (354)</b>	<b>44.0 (592)</b>
<b>Non-hospitalised</b>	<b>76.0 (754)</b>	-	<b>56.0 (754)</b>
Hospital laboratory	23.5 (233)	-	17.3 (233)
Non-hospital laboratory	52.5 (521)	-	38.7 (521)

\* Characteristics assessed in the study of 1346 patients with *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp infections. <sup>a</sup> Adult and Paediatric; Urgency and Emergency <sup>b</sup> Intensive Care Unit (ICU): Neonatal, paediatric and adult; <sup>c</sup> Seven isolates from bronchoalveolar lavage, 26 from tracheal aspiration and 31 from sputum

## Prevalence of ESBL-producing *E. coli* and *Klebsiella* spp isolates

Of the total of 1346 clinical isolates, 1162 (86.3%) were identified as *E. coli* and 184 as *Klebsiella* spp, of which 180 (13.4%) were *K. pneumoniae* and 4 (0.3%) *K. oxytoca*. Of the 953 isolates of *E. coli* of community origin, 4 (0.4%) were ESBL producers, compared with 14 (6.7%) of the 209 isolates of hospital origin. Of the 38 isolates of *K. pneumoniae* of community origin, one (2.6%) was an ESBL producer, compared with 62 (43.7%) of the 142 isolates of hospital origin. Of the isolates of *K. oxytoca*, one of the three of hospital origin was an ESBL producer (Figure 1). Analysis over a period of three years showed the prevalence of ESBL producers at hospital level in *E. coli* to be 4.3% (year 1: April 2003 to March 2004), 3.2% (year 2: April 2004 to March 2005), reaching a figure of 10.8% (year 3: April 2005 to March 2006). For *Klebsiella* spp, a high prevalence was maintained, being 45.5% (year 1), 40.6% (year 2) and 44.4% (year 3).



**Figure 1:** Percentage of isolates of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp of community and hospital origin in the three-year period.

Of the five patients of community origin with isolation of ESBL-producing bacteria, all had infections of the urinary tract, the mean age and standard deviation being  $61.6 \pm 15.9$  years and a variation of 34 to 77 years, while among the 77 patients with hospital infections, more than 60% of whom were male, the mean age and standard deviation were lower ( $46.5 \pm 29.8$  years), although with a wide variation of age (four days to 92 years). Separately by bacteria, the mean age and standard deviation of patients infected by *Klebsiella* spp ( $4.8 \pm 2.9$  years) was much lower, compared to those of *E. coli* ( $40.7 \pm 31.7$  years) (Table 2). Of the 41 infants, 13 (31.7%) had isolation of bacteria with ESBL phenotype (45.8% - *Klebsiella* spp and 11.8% - *E. coli*), of the 19 patients in the 1 to 12 year age band, 5 (26.3%) patients (22.2% - *Klebsiella* spp and 30.0% - *E. coli*), of the 12 patients from 13 to 21 years, 3 (25.0%) patients (60.0% - *Klebsiella* spp), of the 106 patients from 22 to 60 years, 22 (20.8%) patients (45.2% - *Klebsiella* spp and 4.7% - *E. coli*), and of the 176 patients over 60 years old, 34 (19.3%), (43.1% - *Klebsiella* spp and 5.4% - *E. coli*) (Table 2).

Considering the number of patients interned in each hospital unit with that of isolates with ESBL phenotype, 50.0% (2/4) were in the obstetrics/gynaecology unit, 36.5% (38/104) in the ICUs (51.7% - *Klebsiella* spp and 15.9% - *E. coli*) and 19.6% (29/148) in the clinical-surgical units (45.5% *Klebsiella* spp and 4.3% - *E. coli*). Other units included paediatrics (11.8%) and urgency and emergency (10.9%) (Table 2).

Analysing the number of bacteria isolated in each anatomic site, ESBL-producing bacteria were identified in three (60.0%) catheters (75.0% - *Klebsiella* spp), 21 (32.8%) in airways (41.9% - *Klebsiella* spp and 14.3% - *E. coli*), 15 (30.0%) in blood (44.4% - *Klebsiella* spp and 13.0% - *E. coli*), 35 (18.2%) in urine (49.0% - *Klebsiella* spp and 5.9% - *E. coli*), one (5.9%) in skin/surgical wound (25.0% - *Klebsiella* spp) and two (8.0%) in pleural liquid (25.0% - *Klebsiella* spp) (Table 2).

**Table 2:** Distribution of the ESBL-producing *E. coli* and *Klebsiella* spp isolates by origin of the infection, demographic characteristics of the patients and site of isolation

Characteristics	ESBL positive <i>E. coli</i> (ESBL/total)		ESBL positive <i>Klebsiella</i> spp (ESBL/total)		ESBL positive <i>E. coli</i> and <i>Klebsiella</i> spp (ESBL/total)	
	Community (n=4)	Hospital (n=14)	Community (n=1)	Hospital (n=63)	Community (n=5)	Hospital (n=77)
<b>Females % (N)</b>	50.0 (2)	50.0 (7)	-	34.9 (22)	40.0 (2)	37.7 (29)
<b>Age (years)</b>						
Mean ± standard deviation	59.8 ± 17.3	40.7 ± 31.7	69	4.8 ± 2.9	61.6 ± 15.9	46.5 ± 29.8
Variation	34 – 77	8.3 <sup>a</sup> – 88	69	4 <sup>b</sup> – 92	34 – 77	4 <sup>b</sup> – 92
< 1 year % (N/n)	(0/28)	11.8 (2/17)	(0/1)	45.8 (11/24)	(0/29)	31.7 (13/41)
1 – 12	(0/60)	30.0 (3/10)	(0/2)	22.2 (2/9)	(0/62)	26.3 (5/19)
13 – 21	(0/97)	(0/7)	(0/7)	60.0 (3/5)	(0/104)	25.0 (3/12)
22 – 60	0.4 (2/460)	4.7 (3/64)	(0/13)	45.2 (19/42)	0.4 (2/473)	20.8 (22/106)
> 60	0.6 (1/175)	5.4 (6/111)	14.3 (1/7)	43.1 (28/65)	1.1 (2/182)	19.3 (34/176)
<b>Unit where hospitalised % (N/n)</b>						
Clinical-Surgical	(0/14)	4.3 (4/93)	-	45.5 (25/55)	(0/14)	19.6 (29/148)
Urgency and emergency <sup>a</sup>	1.1 (1/92)	(0/36)	(0/5)	31.6 (6/19)	1.3 (1/97)	10.9 (6/55)
Intensive care <sup>b</sup>	(0/4)	15.9 (7/44)	-	51.7 (31/60)	(0/4)	36.5 (38/104)
Paediatrics	(0/4)	7.7 (1/13)	-	25.0 (1/4)	(0/4)	11.8 (2/17)
Obstetrics /Gynaecology	(0/6)	100.0 (2/2)	-	(0/2)	(0/6)	50.0 (2/4)
Oncology Service	16.7 (1/6)	(0/2)	-	-	16.7 (1/6)	(0/2)
<b>Non-hospitalised % (N/n)</b>	0.3 (2/729)		4.0 (1/25)	-	0.4 (3/754)	-
<b>Site of isolation % (N/n)</b>						
Urine	0.4 (4/934)	5.8 (8/137)	2.9 (1/35)	49.0 (27/55)	0.5 (5/969)	18.2 (35/192)
Blood	(0/11)	13.0 (3/23)	(0/3)	44.4 (12/27)	(0/14)	30.0 (15/50)
Airways <sup>a</sup>	-	14.3 (3/21)	-	41.9 (18/43)	-	32.8 (21/64)
Peritoneal liquid	(0/8)	(0/17)	-	25.0 (2/8)	(0/8)	8.0 (2/25)
Skin/surgical wound	(0/1)	(0/12)	-	25.0 (1/4)	-	5.9 (1/17)
Catheter	-	(0/1)	-	75.0 (3/4)	-	60.0 (3/5)

<sup>a</sup> months; <sup>b</sup> days

### Prevalence of *bla* genes

The presence of the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene was detected in 9 isolates of *E. coli* (50.0%) and 53 isolates of *Klebsiella* spp (82.8%), the *bla*<sub>SHV</sub> gene in 2 isolates of *E. coli* (11.1%) and 27 isolates of *Klebsiella* spp (42.2%) and the *bla*<sub>TEM</sub> gene in 12 isolates of *E. coli* (66.7%) and 61 isolates of *Klebsiella* spp (95.3%) (Table 3).

Of the four *E. coli* ESBL-producing isolates of community origin, 50.0% (2), 50.0% (2) e 25.0% (1) had *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, and *bla*<sub>TEM</sub> genes, respectively. Of the 14 *E. coli* isolates of hospital origin, in 78.6% (11) e 50.0% (7) *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> genes were detected, respectively. In one isolate none of the genes analysed was found, and the *bla*<sub>SHV</sub> gene was not present in these isolates of hospital origin. Of the total of 18 *E. coli* ESBL-producing isolates, 11 (61.1%) had only one gene (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> or *bla*<sub>TEM</sub>), and 6 (33.3%) a combination of two genes (*bla*<sub>CTX-M</sub> with *bla*<sub>TEM</sub>).

Of the 64 *K. pneumoniae* ESBL-producing isolates, the only one of community origin had the three genes analysed, whereas among the 63 of hospital origin 82.5% (52), 42.9% (26) e 95.2% (60) had the *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> genes, respectively. One isolate was also negative for the genes analysed. Out of the total of *K. pneumoniae* isolates, 5 (7.8%) had only one gene (*bla*<sub>CTX-M</sub> or *bla*<sub>TEM</sub>), 38 (59.4%) a combination of two genes (*bla*<sub>CTX-M</sub> with *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> with *bla*<sub>TEM</sub> or *bla*<sub>SHV</sub> with *bla*<sub>TEM</sub>) and 20 (31.3%) the three genes analysed. In the only *K. oxytoca* ESBL-producing isolate the *bla*<sub>CTX-M</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> genes were detected.



**Table 3:** Distribution of the genes of  $\beta$ -lactamase detected by PCR in ESBL-producing *E. coli* and *Klebsiella* spp of community and hospital origin

Genes	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i> spp	<i>E. coli</i>		<i>Klebsiella</i> spp	
	(n=18) % (N)	(n=64) % (N)	Community (n=4) % (N)	Hospital (n=14) % (N)	Community (n=1) % (N)	Hospital (n=63) % (N)
CTX-M	50.0 (9)	82.8 (53)	50.0 (2)	50.0 (7)	100.0 (1)	82.5 (52)
SHV	11.1 (2)	42.2 (27)	50.0 (2)	-	100.0 (1)	42.9 (26)
TEM	66.7 (12)	95.3 (61)	25.0 (1)	78.6 (11)	100.0 (1)	95.2 (60)
<b>Combinations</b>					-	
CTX-M			25.0 (1)	14.3 (2)	-	1.6 (1)
SHV			50.0 (2)	-	-	-
TEM			-	42.9 (6)	-	6.3 (4)
CTX-M + SHV			-	-	-	1.6 (1)
CTX-M + TEM			25.0 (1)	35.7 (5)	-	49.2 (31)
SHV + TEM			-	-	-	9.5 (6)
CTX-M + TEM + SHV			-	-	100.0 (1)	20.2 (19)
PCR negative			-	7.1 (1)		1.6 (1)

## DISCUSSION

Health care-related infections, mainly those acquired in a hospital environment and especially those caused by multidrug-resistant bacteria, are regarded as one of the most frequent complications which lead to prolonged hospital stay, increase of morbidity and mortality, and consequently of hospital costs. Among the Gram-negative bacilli, three are considered to be particularly problematical: *Acinetobacter* spp, *Pseudomonas aeruginosa* and several ESBL-producing types of the *Enterobacteriaceae* family (27,29, 32,33,35).

*E. coli* and *K. pneumoniae* are among the enteric bacilli most frequently isolated in clinical samples. Regardless of the means of acquisition of the infection, that of the urinary tract was the most frequently observed pathology, and the *E. coli* pathogen the most frequently isolated, confirming that it is one of the most common infectious diseases diagnosed in outpatients and a common cause of hospital infection. *K. pneumoniae* has been described as an important etiological agent of infections of the urinary tract, pneumonia and intra-abdominal and bloodstream infections, being second only to *E. coli*, and in hospitals affects newborns and the elderly, and in particular those with specific base illnesses that compromise the immunological response (1,15,17). In this study, the main site of isolation of *K. pneumoniae* was also the urinary tract, followed by the airways and the bloodstream. Analysing the age of patients with infections caused by ESBL-producing *Klebsiella* spp, it can be seen that these were more common at the extremes of the age band (4 days – 92 years), compared with patients in whom ESBL-producing *E. coli* was isolated (8.3 months – 88 years), and particularly in patients in intensive care units.

The combined prevalence of ESBL-producing *Klebsiella* spp and *E. coli* in patients with hospital infections of 21.8%, was quite similar to that described in studies for Latin America (27%) (34), which confirms that it is a serious and growing epidemiological

problem. It was also observed that the greatest prevalence (49.4%) of these bacteria is in ICUs (paediatric and adult), which is also comparable to results reported in institutions in other countries (18,30). The localisation of the problem of bacteria resistance in ICUs is understandable given the greater concentration of more susceptible people exposed to increasingly invasive procedures and possibly the great selective pressure resulting from the use of antimicrobials.

The great majority of ESBL-producing bacteria were *K. pneumoniae*, with a high prevalence (43.7%), similar to that reported for Latin America (45%) and for Brazil (12). However, it was different to that found for Canada (5%) or Europe, where the prevalence of ESBL-producing bacteria is highly variable among countries: about 2% in Holland or almost 50% in Russia (6,9,14,35). For *E. coli*, we found a prevalence of ESBL producers of 6.7%, which is similar to the prevalence described in Latin American countries, with a variation from 5.0% to 8.9% (12).

As to the low prevalence of bacteria with ESBL phenotype from the community, 2.6% for *K. pneumoniae* and 0.4% for *E. coli*, similar results were observed in Brazil, identifying a low frequency (1.48%) of ESBL-producing bacteria in the community, including isolates of *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Providencia stuartii*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marscencens* (24).

In addition to the increasing detection of the passage of multidrug-resistant bacteria from the hospital environment to the outside, including nursing homes, more recently the dissemination among the community of ESBL-producing bacteria has been increasing (2,4,19,20,31). In a study carried out in Spain 1.4% of the *E. coli* isolated in urine and 15.1% from hemocultures, both of community origin, were ESBL producers, and in 64% of the isolates, the CTX-M-9 type was seen to be present (31). On the other hand, the clonal dissemination of isolates of CTX-M-15 type-producing *E. coli* originating from the

community has been demonstrated in the U.K., Portugal and Spain, in parallel with their presence in hospitals and long term care facilities (23,26,36).

In this study we found a low prevalence of ESBL-producing *E. coli* (0.4%) and *K. pneumoniae* (2.6%) originating from the community, and the CTX-M gene was detected in 60% of the isolates. However, the epidemiological data of these patients showed in three of them co-morbidity with a neoplastic disease of the prostate gland, including one who was under health care (undergoing chemotherapy) and a pregnant woman with a recurring infection of the urinary tract and, therefore, with previous use of antimicrobials (data not shown).

Currently, in the United States, CTX-M ESBLs are the most prominent type of bacterial isolates from infections acquired in the community. These isolates are in particular of *E. coli* of urinary origin which presented ESBL CTX-M-15 and multiclinal dissemination. This has led to a reassessment of the need for screening in the routine of ESBL-producing bacteria acquired from the community, especially isolates of *E. coli* from infections of the urinary tract (19).

The genes of the SHV group were detected in 35.4% of the isolates, 32.9% of which were *K. pneumoniae*. Although most of the enzymes in this group are ESBL, it is known that the *bla*<sub>SHV-1</sub> gene is chromosomal, does not have an extended spectrum, and is present in most strains of *K. pneumoniae*. Similarly, not all the TEM enzymes that were identified in 66.7% (*E. coli*) and 95.3% (*K. pneumoniae*) can be considered ESBL, such as TEM-1 and TEM-2. Sequencing is therefore necessary to find out if they are codifiers of ESBL or not (7,36).

To sum up, the data obtained in this study showed that ESBL-producing isolates of *E. coli* and especially of *Klebsiella* spp are essentially a nosocomial problem, the dissemination of these bacteria to the community still being not very significant.

## REFERENCES

1. Andrade, S.S.; Sader, H.S.; Jones, R.N.; Pereira, A.S.; Pignatari, A.C.; Gales, A.C. Increase resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: time for local guidelines? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 101:741-748, 2006.
2. Arpin, C.; Coulange, L.; Dubois, V.; André, C.; Fischer, I.; Fourmaux, S.; Grobost, F.; Jullin, J.; Dutilh, B.; Couture, J-F.; Noury, P.; Lagrange, I.; Ducastaing, A.; Doermann, H-P.; Quentin, C. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* strains in various types of private health care centers. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51:3440-3444, 2007.
3. Bell, J.M.; Turnidge, J.D.; Jones, R.N.; SENTRY Asia-Pacific. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in the Asia-Pacific Region: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1998 to 2001. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47:3989-3993, 2003.
4. Ben-Ami, R.; Schwaber M.J.; Navon-Venezia, S.; Schwartz, D.; Giladi, M.; Chmelnitsky, I.; Leavitt, A.; Carmeli, Y. Influx of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. *Clin. Infect. Dis.*, 42:925-934, 2006.
5. Bonnet, R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48:1-14, 2004.
6. Bouchillon, S.K.; Johnson, B.M.; Hoban, D.J.; Johnson, J.L.; Dowzicky, M.J.; Wu, D.H.; Visalli, M.A.; Bradford, P.A. Determining incidence of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistance *Enterococcus faecium* and methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* in 38 centers from 17 countries: the PEARLS study 2001-2202. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 24:119-124, 2004.
7. Bradford, P.A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14:933-951, 2001.

8. Bush, K.; Jacoby, G.A.; Medeiros, A.A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39:1211-1233, 1995.
9. Cantón, R.; Novais, A.; Valverde, A.; Machado, E.; Peixe, L.; Baquero, F. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14:144-153, 2008.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved standard M2-A10. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2007.
11. Farmer, J.J. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.O.; Tenover, J.C.; Tenover, F.C. (eds). Manual of clinical microbiology. 8 (ed). Vol 1. Washington: ASM Press, 2003, p. 636-651.
12. Freitas, A.L.P.; Machado, D.P.; Soares, F.S.C.; Barth, A.L. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella spp* and *Escherichia coli* obtained in a Brazilian teaching hospital: detection, prevalence and molecular typing. *Braz. J. Microbiol.*, 34:344-348, 2003.
13. Garner, J.S.; Jarvis, W.R.; Emori, T.G.; Horan, T.C.; Hughes, J.M. CDC definitions isolated for nosocomial infections. *Am. J. Infect. Control.* , 16:128-140, 1988.
14. Goossens, H. MYSTIC Study Group (Europe) MYSTIC program: summary of European data from 1997 to 2000. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 41:183-189, 2001.
15. Hernández, J.R.; Pascual, A.; Cantón, R.; Martínez-Martínez, L.; Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de beta-lactamases de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 21:77-82, 2003.
16. Knothe, H.; Shah, P.; Kramery, V.; Antal, M.; Mitsushashi, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection.*, 11:315-317, 1983.

17. Ko, W-C.; Patersen, D.L.; Sagnimesi, A.J.; Hansen, D.S.; Gottberg, A,V.; Mohapatra, S.; Casellas, J.M.; Goossens, H.; Mulazimoglu, L.; Trenholme, G.; Klugman, K.P.; McCormack, J. G.; Yu, V. L. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg. Infect. Dis.*, 8:160-166, 2002.
18. Lavigne, J-P.; Marchandin, H.; Delmas, J. ; Moreau, J. ; Bouziges, N. ; Lecaillon, E. ; Cavalie, L. ; Jean-Pierre, H. ; Bonnet, R. ; Sotto, A. (2007). CTX-M  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in French hospitals: prevalence, molecular epidemiology, and risk factors. *J. Clin. Microbiol.*, 35:620-626, 2007.
19. Lewis, J.S.; Herrera, M.; Wickers, B.; Patterson, J.E.; Jorgensen, J.H. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51:4015-4021, 2007.
20. Livermore, D.M.; Canton, R.; Gniadkowski, M.; Nordmann, P.; Rossolini, G.M.; Arlet, G. Ayala, J.; Coque, T.M.; Kern-Zdanowicz, I.; Luzzaro, F.; Poirel, L.; Woodford, N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.*, 59:165-174, 2007.
21. Martinez-Martinez, L.; Hernandez-Alles, S.; Alberti, S.; Tomas, J.M.; Benedi, V.J.; Jacoby, G.A. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40:342-348, 1996.
22. Mena, A.; Plasencia, V.; García, L.; Hidalgo, O.; Ayestarán, J.I.; Alberti, S.; Borrell, N.; Pérez, J.L.; Olovier, A. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J. Clin. Microbiol.*, 44:2831-2837, 2006.
23. Mendonça, N.; Leitão, J.; Manageiro, V.; Ferreira, E.; Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal; Caniça, M. Spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51:1946-1955, 2007.
24. Minarini, L.A.; Gales, A.C.; Palazzo, I.C.; Darini, A.L. Prevalence of community-

- occurring extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. *Curr. Microbiol* , 54:335-341, 2007.
25. Morosini, M-I.; García-Castillo, M.; Coque, T.M.; Valverde, A.; Novais, A.; Loza, E.; Baquero, F.; Cantón, R. Antibiotic co-resistance in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and in vitro activity of tigecycline. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50:2695-2699, 2006.
26. Oteo, J.; Navarro, C.; Cercenado, E.; Delgado-Iribarren, A.; Wilhelmi, I.; Orden, B.; García, C.; Miguelañez, S.; Pérez-Vázquez, M.; García-Cobos, S.; Aracil, B.; Bautista, V.; Campos, J. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities and hospital institutions. *J. Clin. Microbiol.*, 44:2359-2366, 2006.
27. Paterson, D.L.; Bonomo, R.A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18:657-686, 2005.
28. Paterson, D.L.; Hujer, K.M.; Hujer, A.M.; Yeisser, B.; Bonomo, M.D.; Rice, L.B.; Bonomo, R.A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* , 47:3554-3560, 2003.
29. Perez, F.; Endimiani, A.; Hujer, K.M.; Bonomo, R.A. The continuing challenge of ESBLs. *Curr. Opin. Pharmacol.* , 7:459-469, 2007.
30. Rebuck, J.A.; Olsen, K.M.; Fey, P.D.; Langnas, A.N.; Rupp, M.E. Characterization of an outbreak due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric intensive care unit transplant population. *Clin Infec Dis.*, 31:1368-1372, 2000.
31. Rodriguez-Baño, J.; Navarro, M.D.; Romero, L.; Mrtinéz-Martínez, L.M.; Muniain, M.A.; Perea, E.J.; Pérez-Cano, R.; Pascual, A. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J. Clin. Microbiol.*, 42:1089-1094, 2004.
32. Sader, H.S.; Gales, A.C.; Pfaller, M.A.; Mendes. R.E.; Zoccoli, C.; Barth, A.; Jones, R.N. Pathogens frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results



- from three years of SENTRY antimicrobial surveillance program. *Braz. J. Infect. Dis.*, 5:200-214, 2001.
33. Sifuentes, J. ESBL in Latin America: their clinical repercussion. *Infect. Dis. Clin. Practice.*, ES:10-2, 2000.
34. Slama, T.G. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Critical Care*, 12:S4, 2008.
35. Winokur, P.L.; Canton, R.; Casellas, J.M.; Casellas, J.M.; Legakis, N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum  $\beta$ -lactamases phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin. Infec. Dis*, 32:S94-103, 2001.
36. Woodford, N.; Ward, M.E.; Jaufmann, M.E.; Turton, J.; Fagan, E.J.; James, D.; Johnson, A.P.; Pike, R.; Cheasty, W.M.; Pearson, A.; Harry, S.; Laech, J.B.; Loughrey, A.; Lowes, J.A.; Warren, R.E.; Livermore, D.M. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* , 54:735-743, 2004.

## Capítulo 2.

### **Assessment of screening and confirmatory tests in the detection of extended spectrum $\beta$ -lactamases (ESBL) in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.**

Cláudia Wollheim <sup>1</sup>; Vania D. Conte <sup>1</sup>; Juliana Conrad da Silva <sup>1</sup>; Ivani Maria F. Guerra <sup>1</sup>;  
Fernando J. Schreiner <sup>1</sup>; Afonso L. Barth <sup>2</sup>; Sérgio Echeverrigaray <sup>3</sup>; Sérgio Olavo P. da  
Costa <sup>3; 4 \*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia Médica, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil; <sup>3</sup> Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil; <sup>2</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS <sup>4</sup> Universidade Católica de Santos, Santos, SP, Brasil

Trabalho preparado para publicação no periódico, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.

\*Corresponding Author. Mailing address: Rua Dr. Mário Ferraz, 77/42. CEP 01453-010 São Paulo - SP, Brasil. Tel: 55 11 3819-9788. E-mail: sopdcost@usp.br

## Abstract

In the last decades, infections related to health care caused by extended spectrum beta-lactamase-producing (ESBL-producing) bacteria of the *Enterobacteriaceae* family have shown to be very important especially in the hospital environment. Accurate laboratory detection of these isolates is fundamental for medical conduct, treatment and the implementation of measures of prevention and control of infections. The aim of this study is to assess the results of phenotypic screening and confirmatory tests for the detection of ESBL, according to the recommendations of the CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*), in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp and correlate the results with the presence of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. 1346 clinical isolates (1162 *Escherichia coli*, 180 *Klebsiella pneumoniae* and 4 *K. oxytoca*) were examined, which were obtained from April 2003 to May 2006, in the Hospital Geral and in a private clinical analysis laboratory, both in Caxias do Sul, RS, Brazil. The screening tests used the substrates (aztreonam, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone and cefpodoxime) and the confirmatory tests used the substrates (cefpodoxime, ceftazidime and cefotaxime) combined with clavulanic acid. Cefepime was added in both tests. Regardless of the bacteria analysed, ceftazidime was the substrate with the worst performance in the tests, with sensitivity lower than 72.2% due to the high prevalence of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes, which was 50.0% (*E. coli*) and 82.8% (*Klebsiella* spp). The other substrates used in the screening test (cefpodoxime, cefotaxime, ceftriaxone and aztreonam) had an excellent performance in the detection of ESBL in isolates of *Klebsiella* spp (all with sensitivity of 100% and specificity >94.0%). The same was not observed for *E. coli* isolates, and the only substrate with the best performance was cefpodoxime (sensitivity of 100.0% and specificity of 75.0%). The use of cefepime in the screening test with cut-off points  $\leq 22$ mm (*E. coli*) and  $\leq 27$ mm (*Klebsiella* spp) had an excellent performance with 100.0% sensitivity and specificity, thus being a possible alternative to improve accuracy in detecting ESBL-producing *E. coli* isolates.

**Keywords:** ESBL, CLSI, interpretative criteria

## 1. Introduction

The ESBL-producing clinical isolates of the *Enterobacteriaceae* family, especially *Klebsiella pneumoniae*, followed by *Escherichia coli*, due to their high resistance to antimicrobials, their increasing dissemination and their clinical relevance, are important pathogens from the point of view of world public health (Paterson et al., 2003). This mechanism of resistance reduces the effectiveness of widely used antimicrobials, since it prevents the use of all penicillins, first- to fourth-generation cephalosporins, combinations with beta-lactamase inhibitors and the monobactamic aztreonam (Paterson and Bonomo, 2005).

The accurate laboratory detection of ESBL producers is fundamental for the treatment of and implementation of measures for the prevention and control of infections, but is a challenge. The results generated by the traditional tests of sensitivity to antimicrobials may not show up the ESBL phenotype and, causing the release of false sensitivities, may lead to the wrong treatment (Bradford, 2001). To identify ESBL producers several phenotypic methods have been used: those standardised by the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), disc approximation ones, the Etest® or semi-automated systems.

All these methods are based on the property that ESBL are inhibited by clavulanic acid, but there is not yet a consensus on the gold standard methodology to be used in the laboratory routine. There have been reports of the coexistence of other mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactamics in isolates with the ESBL phenotype, members of the *Enterobacteriaceae* family – mechanisms which can interfere in the interpretation of the phenotypical tests for the detection of ESBL. The following mechanisms have been reported: (1) the presence of  $\beta$ -lactamase of the AmpC plasmid-mediated type; (2) modification of the permeability of the external membrane through loss or alteration of the

porins; (3) the presence of new varieties of ESBL, considering that the ESBL form a very large heterogeneous group of enzymes; and (4) the presence of other  $\beta$ -lactamases (Bradford, 2001; Jacoby, Walsh and Walker, 2006; Moland *et al.*, 2006; Lartigue *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2007).

The aim of this study was to assess the efficiency of the phenotypical screening and confirmatory tests in the detection of ESBL in accordance with the recommendations of the CLSI, in clinical isolates of *E. coli* and *Klebsiella* spp and correlate their results with the presence of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> genes.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Clinical isolates**

We examined 1346 clinical isolates (1162 *Escherichia coli*, 180 *Klebsiella pneumoniae* and 4 *K. oxytoca*) collected from April 2003 to May 2006, in the Hospital Geral and in a private clinical analysis laboratory in Caxias do Sul, in the north-east of Rio Grande do Sul, Brazil.

Of the total of 1162 isolates of *E. coli*, 4 (0.4%) out of the 953 of community origin were ESBL producers, as were 14 (6.7%) of the 209 isolates of hospital origin. Of the 38 isolates of *K. pneumoniae* of community origin, one (2.6%) was an ESBL producer, as were 62 (43.7%) of the 142 isolates of hospital origin. Of the three isolates of *K. oxytoca* of hospital origin, one was an ESBL producer.

The identification of the bacterial isolates as regards kind and species was confirmed using the conventional biochemical tests, and they were later stored at -70°C in a skim milk medium at 20% until the sensitivity tests to antimicrobials were carried out (Abbott, 2003; Bopp *et al.*, 2003; Winn *et al.*, 2006).

## ***2.2 Screening and confirmatory test for ESBL producers***

Bacterial isolates which had an inhibition halo in accordance with the cut-off points established by the CLSI, for at least one of the antimicrobial substrates: aztreonam and cefotaxime ( $\leq 27\text{mm}$ ), ceftazidime ( $\leq 22\text{mm}$ ), ceftriaxone ( $\leq 25\text{mm}$ ) and/or cefpodoxime ( $\leq 17\text{mm}$ ), were considered to be probable ESBL producers, and submitted to the confirmatory test with discs of cefpodoxime, ceftazidime, and cefotaxime, combined with clavulanic acid. Isolates that showed in at least one of the two substrates (ceftazidime and cefotaxime) an increase of  $\geq 5\text{mm}$  in the diameter in the presence of clavulanic acid were designated as isolates with ESBL phenotype confirmed. These were also tested with the cefpodoxime and cefepime substrate adding clavulanic acid to check if these substrates, which are not included in the criteria of the CLSI, would be a good indicator of ESBL production. In the tests Oxoid® discs were used, and the cefepime discs containing clavulanic acid were prepared daily. The standard strains *Escherichia coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 700603 were used respectively as negative and positive controls.

## ***2.3 Molecular characterisation by PCR***

The bacterial isolates with confirmed ESBL phenotype were submitted to PCR assay to identify the *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes, using the primers described by Bonnet et al., (2001); Paterson et al., (2003). All the reactions were carried out in a volume of 25 $\mu\text{L}$  with 0.75U of *Taq* polimerase (Invitrogen®), using the following thermocycling conditions: 5 minutes of denaturation at 94°C, followed by 35 cycles of denaturation (30 seconds at 94°C), annealing (1.5 min at 60°C for CTX-M and SHV and 45°C for TEM), extension (2 min at 72°C), finishing with an extension period of 5 min at 72°C and 15 min at 4.0°C

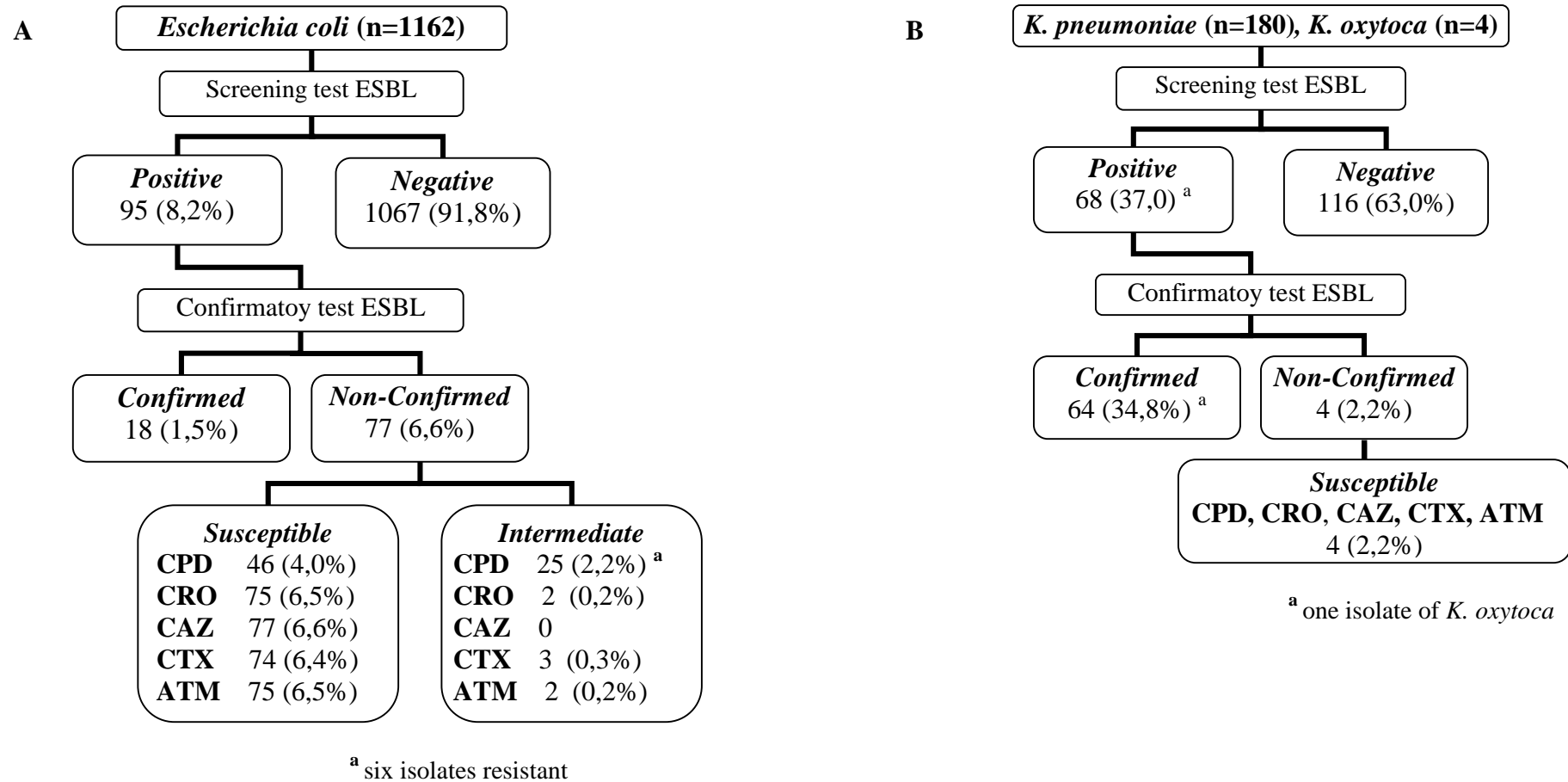
(Patersen *et al.*, 2003). The *K. pneumoniae* ATCC 700603 strain was used as a positive control for the *bla*<sub>SHV</sub> gene.

### 3. Results

Of the total of 1162 clinical isolates of *E. coli*, 95 (8.2%) had a reduction in their inhibition halos for cefpodoxime ( $\leq 17$ mm), ceftriaxone ( $\leq 25$ mm), ceftazidime ( $\leq 22$ mm), cefotaxime ( $\leq 27$ mm) and/or aztreonam ( $\leq 27$ mm), and were classified as possible ESBL producers (Figure 1A).

Of the positive isolates in the screening test, 81.1% (77 out of 95) were not confirmed by the test with association of clavulanic acid recommended by the CLSI, that is to say 6.6% (77 out of 1162) of the isolates analysed. Of the 77 isolates not confirmed as ESBL producers, 25 (32.5%) were intermediate, six of which (7.8%) were resistant to cefpodoxime, two (2.6%) were intermediate to ceftriaxone and aztreonam, and three (3.9%) to cefotaxime. Further tests showed that of the six isolates resistant to cefpodoxime, four were also resistant to ceftazidime.

Of the 184 clinical isolates of *Klebsiella* spp, 68 (37.0%) were positive considering the same screening criteria (Figure 1B). Of the positive isolates in the screening test, 5.9% (4 out of 68) were not confirmed by the test with association of clavulanic acid recommended by the CLSI. All of these were *K. pneumoniae*, and represent 2.2% (4 out of 184) of the total of isolates analysed. These isolates not confirmed as ESBL producers were sensitive to the five antimicrobials used in the screening test.



**Figura 1:** Results of ESBL screening and confirmatory tests. (A) *E. coli*, (B) *Klebsiella* spp. CPD, cefpodoxime; CRO, ceftriaxone; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime and ATM, aztreonam



The best antimicrobials used as substrate for the screening of the ESBL phenotype in *E. coli* and *Klebsiella* spp were cefpodoxime, cefotaxime, ceftriaxone and aztreonam, with 100.0% sensitivity, however with different specificities according to the species. The most specific substrate for the two species was cefpodoxime (75.0% - *E. coli* and 98.5% - *Klebsiella* spp), followed by ceftriaxone (34.6% - *E. coli*) and ceftriaxone and cefotaxime (95.5% - *Klebsiella* spp), aztreonam (21.2% - *E. coli* and 94.1% - *Klebsiella* spp) and cefotaxime (19.1% - *E. coli*) (Table 1). Ceftazidime failed to detect five ESBL-producing isolates of *E. coli* (72.2% sensitivity) and 22 of *Klebsiella* spp (65.6% sensitivity).

The results of the inhibition halos for cefepime, which is not included as a screening criterion by the CLSI, showed a variation of 11 to 22mm among the 18 ESBL-producing isolates of *E. coli* and 6 to 27mm among the 64 ESBL-producing isolates of *Klebsiella* spp, two of which had a diameter of  $\geq 25$ mm. Considering a cut-off point of  $\leq 27$ mm for cefepime, the sensitivity for the two species was 100%.

The best antimicrobial used as a substrate for confirmation of the ESBL phenotype in *E. coli* and *Klebsiella* spp, by the criteria of the CLSI through the addition of clavulanic acid, Table 1, was cefotaxime (sensitivity of 100.0% for *E. coli* and 98.4% for *Klebsiella* spp). On the other hand, ceftazidime failed to detect eight isolates of *E. coli* (sensitivity of 55.5%) and 27 isolates of *Klebsiella* spp (sensitivity of 57.8%), thus showing the least sensitivity and efficiency. However, both the substrates cefpodoxime and cefepime had a sensitivity of over 90.0%, if analysed applying the criteria of the CLSI of an increase of at least 5mm in the inhibition halos when clavulanic acid is added.

**Table 1: Results of ESBL screening and confirmatory tests of *E. coli* and *Klebsiella* spp**

Breakpoint (mm)	Antimicrobial					
	Cefpodoxime ≤17	Ceftazidime ≤22	Cefotaxime ≤27	Ceftriaxone ≤25	Aztreonam ≤27	Cefepime ---
Screening test <sup>a</sup>						
<i>E. coli</i> (n=18)						
<b>M ± SD (mm)</b>	<b>6,3 ± 1,0</b>	<b>20,3 ± 3,7</b>	<b>11,8 ± 3,7</b>	<b>10,4 ± 4,3</b>	<b>15,9 ± 3,8</b>	<b>17,2 ± 3,0</b>
<b>Variation (mm)</b>	<b>6 - 10</b>	<b>10 - 25</b>	<b>6 - 20</b>	<b>6 - 19</b>	<b>10 - 22</b>	<b>11 - 22</b>
<b>Sensitivity (%) / n° false -</b>	<b>100,0 / 0</b>	<b>72,2 / 8</b>	<b>100,0 / 0</b>	<b>100,0 / 0</b>	<b>100,0 / 0</b>	<b>100,0 / 0</b>
<b>Specificity (%) / n° false +</b>	<b>75,0 / 6</b>	<b>50,0 / 18</b>	<b>19,1 / 76</b>	<b>34,6 / 34</b>	<b>21,2 / 67</b>	<b>100,0 / 0</b>
<i>Klebsiella</i> spp (n=64)						
<b>M ± SD (mm)</b>	<b>6,3 ± 1,0</b>	<b>20,8 ± 3,5</b>	<b>11,3 ± 4,8</b>	<b>9,0 ± 4,2</b>	<b>11,3 ± 4,8</b>	<b>16,0 ± 3,9</b>
<b>Variation (mm)</b>	<b>6 - 12</b>	<b>11 - 27</b>	<b>6 - 22</b>	<b>6 - 20</b>	<b>6 - 22</b>	<b>6 - 27</b>
<b>Sensitivity (%) / n° false -</b>	<b>100,0 / 0</b>	<b>65,6 / 22</b>	<b>100,0 / 0</b>	<b>100,0 / 0</b>	<b>100,0 / 0</b>	<b>100,0 / 0</b>
<b>Specificity (%) / n° false -</b>	<b>98,5 / 1</b>	<b>98,5 / 1</b>	<b>95,5 / 3</b>	<b>95,5 / 3</b>	<b>94,1 / 4</b>	<b>100,0 / 0</b>
Teste confirmatório <sup>a</sup>						
<i>E. coli</i> (n=18)						
<b>M ± SD (mm)</b>	<b>10,4 ± 3,2</b>	<b>4,9 ± 3,1</b>	<b>11,6 ± 3,0</b>	-	-	<b>7,4 ± 1,5</b>
<b>Variation (mm)</b>	<b>4 - 14</b>	<b>0 - 11</b>	<b>5 - 17</b>	-	-	<b>5 - 10</b>
<b>Sensitivity (%) / n° false -</b>	<b>94,4 / 4</b>	<b>55,5 / 8</b>	<b>100,0 / 0</b>	-	-	<b>100,0 / 0</b>
<i>Klebsiella</i> spp (n=64)						
<b>M ± SD (mm)</b>	<b>10,6 ± 3,5</b>	<b>4,8 ± 2,8</b>	<b>12,8 ± 4,2</b>	-	-	<b>8,6 ± 3,8</b>
<b>Variation (mm)</b>	<b>3 - 23</b>	<b>0 - 13</b>	<b>3 - 25</b>	-	-	<b>3 - 24</b>
<b>Sensitivity (%) / n° false -</b>	<b>98,4 / 1</b>	<b>57,8 / 27</b>	<b>98,4 / 1</b>	-	-	<b>93,8 / 4</b>

<sup>a</sup> Screening and confirmatory test for ESBL producers by the criteria of the CLSI. Cefepime are not recommended by CLSI.

Comparing the results of the screening and confirmatory tests for the 18 isolates of *E. coli* with the ESBL phenotype with the ESBL genes detected, Table 2, of the five isolates with false-negative tests using ceftazidime, three had the *bla*<sub>TEM</sub> gene, one the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene, and in one none of the three genes analysed was detected. For the eight isolates which did not show any increase in the inhibition halo with the addition of clavulanic acid with ceftazidime, three had the *bla*<sub>TEM</sub> gene, two the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene, two a combination of *bla*<sub>CTX-M</sub> with *bla*<sub>TEM</sub> and in one isolate the PCR was negative.

Of the 23 isolates of *K. pneumoniae* that were not identified as probable ESBL producers by ceftazidime, Table 3, 12 had *bla*<sub>CTX-M</sub> with *bla*<sub>TEM</sub> genes, eight a combination of *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> genes, two just the *bla*<sub>TEM</sub> gene and one a combination of *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>TEM</sub>. Of the 26 isolates of *K. pneumoniae* with a false-negative confirmatory test for ceftazidime, 13 had *bla*<sub>CTX-M</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> genes, nine a combination of *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> genes, two a combination of *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> genes, two the *bla*<sub>TEM</sub> gene, and one isolate had none of the three genes assessed. The ESBL-producing isolate of *K. oxytoca* was detected by the cefpodoxime, cefotaxime, ceftriaxone and cefepime substrates in the screening test and by cefpodoxime in the confirmatory test, the genes detected being *bla*<sub>CTX-M</sub> and *bla*<sub>TEM</sub>.

The presence of the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene was detected in nine isolates of *E. coli* (50.0%) and 53 isolates of *Klebsiella* spp (82.8%), the *bla*<sub>SHV</sub> gene in two isolates of *E. coli* (11.1%) and 27 isolates of *Klebsiella* spp (42.2%) and the *bla*<sub>TEM</sub> gene in 12 isolates of *E. coli* (66.7%) and 61 isolates of *Klebsiella* spp (93.5%).

**Table 2:** Results of the screening and confirmatory tests for the 18 isolates of *E. coli* with the ESBL phenotype grouped with the  $\beta$ -lactamase genes detected by PCR

<i>Screening test</i>					<i>no. of isolates with <math>\beta</math>-lactamase genes</i>					
					<i>Escherichia coli</i>					
CPD	CRO	CAZ	CTX	ATM	CTX-M	SHV	CTX-M + TEM	TEM	PCR negative	Total
+	+	+	+	+	2	2	6	3		13
+	+	-	+	+	1			3	1	5
Total					3	2	6	6	1	18
<i>Confirmatory test</i>										
CPD	CAZ	CTX	FEP							
+	+	+	+	1	2	4	3			10
+	-	+	+	1		1	3	1		7
-	-	+	+			1				1
Total					1	2	1	6	1	18

CPD, cefpodoxime; CRO, ceftriaxone; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; ATM, aztreonam; FEP, cefepime

**Table 3:** Results of the screening and confirmatory tests for the 64 isolates of *Klebsiella* sp with the ESBL phenotype grouped with the  $\beta$ -lactamase genes detected by PCR

Screening test					no. of isolates with $\beta$ -lactamase genes							
CPD	CRO	CAZ	CTX	ATM	<i>Klebsiella</i> spp							
					CTX-M + SHV + TEM	CTX-M	CTX-M + SHV	CTX-M + TEM	SHV + TEM	TEM	PCR negative	Total
+	+	+	+	+	12	1	1	19	5	2	1	41
+	+	-	+	+	8			11	1	2		22
+	+	-	-	+				1				1
				Total	20	1	1	31	6	4	1	64
<b>Confirmatory test</b>												
CPD	CAZ	CTX	FEP									
+	+	+	+		11	1	1	18	4	2		37
+	-	+	+		8			10	2	1	1	22
+	-	+	-		1			2		1		4
+	-	-	-					1				1
				Total	20	1	1	31	6	4	1	64

CPD, cefpodoxime; CRO, ceftriaxone; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; ATM, aztreonam; FEP, cefepime

#### 4. Discussion

Recognition of all ESBL producers is of great clinical concern, since the extent of the spectrum of resistance to third-generation cephalosporins has limited the use of all drugs of the  $\beta$ -lactamic class, including combinations with  $\beta$ -lactamase inhibitors, the inappropriate use of which can lead to failure of the treatment and adverse clinical results (Paterson and Bonomo, 2005).

At present, the CLSI does not recommend screening ESBL-producing isolates for *Enterobacteriaceae* other than *E. coli*, *Klebsiella* spp and *Proteus mirabilis* (CLSI, 2008). Nevertheless, the production of ESBL has been shown in other kinds, including *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Providencia*, *Proteus*, *Salmonella* and *Serratia*. Research on these bacteria is particularly justified for their increasing clinical importance and for the possibility of horizontal transmission due to the presence of ESBL genes in plasmid systems (Bradford, 2001).

The performance of the phenotypical system of detection of ESBL-producing bacteria can be significantly influenced by the gene composition of the isolates assessed, since the tendency is for the pathogens to produce a larger number of  $\beta$ -lactamases every day, even in combination with other mechanisms of resistance (Hall et al., 2002).

The  $\beta$ -lactamases are the most heterogeneous group of resistant enzymes, with almost 700 different  $\beta$ -lactamases described (Perez et al., 2007). The ESBL, the largest group of the  $\beta$ -lactamases, of the TEM and SHV types are distributed throughout the world, with over 200 enzymatic varieties catalogued, the majority having the ceftazidimase phenotype, and very few with the cefotaximase phenotype. More recently, non-TEM and non-SHV ESBLs have been reported, including ceftazidimases (PER, VEB, TLA-1 and GES/IBC) and cefotaximases (SFO-1, BES-1 and the CTX-M family). The CTX-M

family, with more than 70 enzymatic types in five phylogenetic groups, is the most prevalent type among the non-TEM and non-SHV ESBLs. These are widespread in South America, Asia, and certain countries in Eastern Europe (Bonnet, 2004; <http://www.lahey.org/studies>).

The results obtained in this study showed that the proportion of isolates with a positive screening test but not confirmed as ESBL producers by the confirmatory test was particularly large for *E. coli* (81.1%) compared to *Klebsiella* spp (5.9%). Considering the total of isolates analysed for each of the species, these values were 6.6% and 2.2% respectively. A recent study (Bell et al., 2007), with data from the SENTRY Surveillance of Resistance to Antimicrobials Programme, analysed the prevalence and the meaning of a negative confirmatory test for ESBL after a positive screening test for 4515 isolates of *E. coli* and 2081 isolates of *K. pneumoniae*, obtained from nine countries in the Asia-Pacific region, including South Africa, from 1998 to 2003. The non-confirmed rates were 33.3% for *E. coli* and 15.2% for *K. pneumoniae*. Considering the total of isolates analysed for each species, the variation was from 0.6 to 7.2% (mean 3.0%), among the different countries, for the 4515 isolates of *E. coli* and from 0.8 to 19.2% (mean 3.1%) for the 2081 isolates of *K. pneumoniae*. It was also shown that 62% of the non-confirmed isolates of *E. coli* and 75% of those of *K. pneumoniae* shared a  $\beta$ -lactamase of the AmpC plasmid-mediated type. This enzyme is not inhibited by clavulanic acid, which may go some way to explaining the false-negative results observed. Our results also indicated the possibility of the presence of  $\beta$ -lactamase of the AmpC type in *E. coli*, since, of the six isolates resistant to cefpodoxime, 66.7% were also resistant to cefoxitine, which is characteristic of an AmpC-producing strain.

Several mechanisms that lead to the absence of detection of ESBL-producing isolates by the combination with clavulanic acid have been described: (1) co-production of

AmpC plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase; (2) hyper-production of TEM-1  $\beta$ -lactamase in *E. coli* which have only *bla*<sub>TEM</sub> genes; (3) the presence of K1  $\beta$ -lactamase in *K. oxytoca* and of SHV-1; (4) the presence of more than one type of ESBL; (5) the occurrence of mutation in porins; and (6) the presence of ESBL not contained by  $\beta$ -lactamase inhibitors (Bradford, 2001; Jacoby, Walsh and Walker, 2006; Moland et al., 2006; Lartigue et al., 2007; Perez et al., 2007).

On the other hand, the loss of the two main porins (OmpK35 and OmpK36) in ESBL-producing *K. pneumoniae* causes resistance to ceftaxime, an increase in the resistance to the extended spectrum cephalosporins, and a reduction of susceptibility to carbapenems, particularly to ertapenem, besides other non- $\beta$ -lactamic compounds, such as fluoroquinolones (Martínez-Martínez, 2008).

The problems found with the ceftazidime substrates in the screening test (sensitivity of 72.2% for *E. coli* and 65.6% for *Klebsiella* spp) and in the confirmatory test (sensitivity of 55.5% for *E. coli* and 57.8% for *Klebsiella* spp) are a result of the greater prevalence of CTX-M-type gene in isolation or in association with another gene, the frequency being 50.0% in *E. coli* and 82.8% in *Klebsiella* spp. The prevalence of the *bla*<sub>TEM</sub> gene was high (66.7% for *E. coli* and 95.3% for *Klebsiella* spp); however, the molecular detection test used captures all types of *bla*<sub>TEM</sub> genes, including non-ESBL TEM-1 and TEM-2 ones. Accordingly, it should be stressed that to obtain a reliable interpretation of the role of TEM genes in the ESBL phenotype it would be necessary to define the specific TEM group by means of markers or sequencing. Isolates with the ESBL phenotype were also found, in both species, in which none of the three genes being researched were found, which suggests the existence of other types of ESBL in the strains analysed.

In short, the results obtained showed that the performance of the screening substrates varied according to the species analysed, except for ceftazidime. Although the



sensitivity was 100% for cefpodoxime, cefotaxime, ceftriaxone and aztreonam, the specificities of these substrates were low for *E. coli* isolates. Cefepime gave high values of sensitivity in the screening and confirmatory tests if a cut-off point of  $\leq 27$ mm and an increase of 5mm in the halo of the disc in association with clavulanic acid were adopted respectively. The same results were observed using the disc approximation method (data not presented). In practice, the results obtained indicate that laboratories which use only ceftazidime in the screening test are subject to high error rates (false-negatives) in the detection of ESBL in *E. coli* and *Klebsiella* spp.

A greater proportion of isolates of *E. coli*, compared to *Klebsiella* spp, had a positive screening test and a negative confirmatory test, also being resistant to ceftazidime, which suggests the involvement of another mechanism of resistance, such as the presence of AmpC-type  $\beta$ -lactamase and/or some alteration of permeability caused by the mutation in genes of porins; these mechanisms are also important in clinical and epidemiological terms.

## 5. References

- Bradford, P.A. (2001) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14:933-951.
- Bonnet, R.; Dutour, C.; Sampaio, J.L.; Chanal, C.; Sirot, D.; Labia, R.; Champs, C.; Sirot, J. (2001) Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-Gly. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2269-2275.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI) (2008) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved standard M2-A10. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Farmer, J.J. (2003). *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.O.; Tenover, J.C.; Tenover, J.H.; Tenover, J.H.; Tenover, J.H. (eds). Manual of clinical microbiology. 8 (ed). Vol 1. Washington: ASM Press. pp.636-651.
- Jacoby, G.A.; Walsh, K.E.; Walker, V.J. (2006) Identification of extended-spectrum, AmpC, and carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by disk tests. *J Clin Microbiol* 44:1971-1976.
- Lartigue, M-F.; Poirel, L.; Poyart, C.; Réglie-Poupet, H.; Nordmann, P. (2007) Ertapenem resistance of *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 13:315-317.
- Livermore, D.M.; Canton, R.; Gniadkowski, M.; Nordmann, P.; Rossolini, G.M.; Arlet, G. Ayala, J.; Coque, T.M.; Kern-Zdanowicz, I.; Luzzaro, F.; Poirel, L.; Woodford, N. (2007) CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 59:165-174.
- Martínez-Martínez, L. (2008) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and the permeability barrier. *Clin. Microbiol. Infect* 14:82-89.
- Moland, E.S.; Hanson, N.D.; Black, J.A.; Hossain, A.; Song, W.; Thomson, K.S. (2006) Prevalence of newer beta-lactamases in gram-negative clinical isolates collected in the United States in 2001 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* 44:3318-3324.

- Morosini, M-I; García-Castilhos, M.; Coque, T.M.; Valverde, A.; Novais, A.; Loza, E.; Baquero, F.; Cantón, R. (2006) Antibiotic coresistance in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and in vitro activity of tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2695-2699.
- Paterson, D.L.; Bonomo, R.A. (2005) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18:657-686.
- Paterson, D.L.; Hujer, K.M.; Hujer, A.M.; Yeisser, B.; Bonomo, M.D.; Rice, L.B.; Bonomo, R.A. (2003) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents and Chemother* 47:3554-3560.
- Perez, F.; Endimiani, A.; Hujer, K.M.; Bonomo, R.A. (2007) The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol* 7:459-469.

### Capítulo 3.

#### **Disseminação de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL) num hospital de ensino situado na região Sul do Brasil.**

Cláudia Wollheim <sup>1</sup>, Vania D. Conte <sup>1</sup>, Graziela Mazzarolo <sup>1</sup>, Ivani Maria F. Guerra <sup>1</sup>,  
Fernando J. Schreiner <sup>1</sup>, Afonso L. Barth <sup>2</sup>, Sérgio Echeverrigaray <sup>3</sup>, Sérgio Olavo P. da  
Costa <sup>3,4 \*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia Médica, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS,  
Brasil, <sup>3</sup> Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS,  
Brasil, <sup>2</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Porto Alegre, RS <sup>4</sup> Universidade Católica de Santos, Santos, SP, Brasil

Trabalho para publicação no periódico *Journal of Clinical Microbiology* (em preparação)

\*Corresponding Author. Mailing address: Rua Dr. Mário Ferraz, 77/42. CEP 01453-010  
São Paulo - SP, Brasil. Tel: 55 11 3819-9788. E-mail: sopdcost@usp.br

## RESUMO

Foram avaliados 62 isolados de *K. pneumoniae*, produtores de ESBL, provenientes de pacientes internados entre abril de 2003 a maio de 2006, num hospital de ensino em Caxias do Sul (RS), Brasil. Esses isolados foram submetidos à tipagem molecular pela técnica PGFE, ao PCR para a detecção dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, a testes de sensibilidade frente a 23 antimicrobianos pelo método de disco-difusão e 35 isolados submetidos a experimentos de conjugação. Foram identificados 22 padrões de PFGE, sendo 11 padrões com dois a 13 isolados. Esses 11 padrões envolveram 50 isolados de *K. pneumoniae*, produtores de ESBL, com alta disseminação intra-hospitalar entre seis das sete unidades de internação do hospital e com alguns padrões permanecendo por longo período ( $\geq$  a um ano). Entre os 62 isolados de *K. pneumoniae*, 59 (95,2%) possuíam o gene *bla*<sub>TEM</sub>, 51 (82,3%) o gene *bla*<sub>CTX-M</sub>, e 26 (41,9%) o gene *bla*<sub>SHV</sub>, além de várias combinações 30 isolados com *bla*<sub>CTX-M</sub> + *bla*<sub>TEM</sub>, 19 isolados com três genes, seis isolados com *bla*<sub>SHV</sub> + *bla*<sub>TEM</sub> e um isolado *bla*<sub>CTX-M</sub> + *bla*<sub>SHV</sub>, não sendo observada correlação com o padrão de PFGE. Foram obtidos transconjugantes de 26 (74,3%) isolados de *K. pneumoniae*, que representaram 10 genótipos de PFGE, os quais apresentaram fenótipo de ESBL, além de resistência aos aminoglicosídeos. Os isolados de *K. pneumoniae* apresentaram ampla variabilidade genômica, indicando forte pressão seletiva de antimicrobianos, mas também disseminação multiclonal, indicando transmissão cruzada e uma situação de endemia dessas bactérias no hospital. As *K. pneumoniae* produtoras de ESBL foram multirresistentes e capazes de transferir os genes para ESBL e corresponsabilidade aos aminoglicosídeos.

## INTRODUÇÃO

As infecções relacionadas à assistência à saúde, em especial as nosocomiais, representam um problema de saúde pública com importantes implicações clínicas, epidemiológicas e de custos diretos e indiretos tanto ao paciente, à instituição como ao país (21). Agravando essa situação, a resistência bacteriana aos antimicrobianos, amplamente disponíveis, está aumentando rapidamente em todo o mundo, e exigindo prioridade nas ações de controle e prevenção de infecções por bactérias multirresistentes (39, 43)

As beta-lactamases de espectro ampliado ESBL estão entre os mais preocupantes determinantes de resistência adquiridos e de emergência mundial, detectados em bacilos Gram-negativos principalmente da família *Enterobacteriaceae*, com ênfase para os patógenos nosocomiais, como a *Klebsiella pneumoniae* (3, 29, 32). Esse mecanismo de resistência impede o uso de todas as penicilinas, as cefalosporinas de primeira a quarta gerações, as combinações com os inibidores de beta-lactamases e os monobactâmicos. Além disso, com frequência os isolados, produtores de ESBL, apresentam corresponsibilidades a outros agentes antimicrobianos que não beta-lactâmicos, como os aminoglicosídeos, as tetraciclinas, as fluorquinolonas, o cloranfenicol e o sulfametoxazol-trimetoprim (28, 29).

Somados aos problemas de caráter terapêutico, devido à localização dos genes que codificam para as enzimas ESBL ser extracromossômica, em plasmídios, transposons e/ou integrons, a transmissão horizontal pode ser facilitada e resultar na rápida disseminação intra-hospitalar desse fenótipo de resistência (13, 43).

A *K. pneumoniae* têm se destacado como um importante patógeno oportunista hospitalar e uma importante fonte de disseminação de resistência aos antimicrobianos nesse ambiente, especialmente aquelas produtoras de ESBL (2.) É reconhecida como agente de infecções do trato urinário, da corrente sanguínea, do trato respiratório, do sistema nervoso central, de infecções intra-abdominais e de ferida operatória. Com frequência atingem

pacientes com doenças de base comprometedoras da resposta imunológica, aqueles nos extremos da faixa etária, expostos aos procedimentos invasivos e ao uso excessivo de antimicrobianos (8, 14). Isolados de *K. pneumoniae*, produtores de ESBL, também têm se destacado como agentes causais de surtos hospitalares, muitas vezes, ocorridos em Unidade de Tratamento Intensivo UTI neonatais e pediátricas, ou como bactérias de caráter endêmico no hospital (17, 22, 35, 36, 46).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o modo de disseminação dos isolados clínicos hospitalares de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL, e determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos desses isolados.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Local de estudo.** Os isolados de *Klebsiella pneumoniae*, produtores de ESBL, foram provenientes de pacientes com infecção hospitalar isolados no período de abril de 2003 a maio de 2006, num hospital de ensino, localizado em Caxias do Sul, na região Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul (RS), do Brasil. O Hospital Geral de Caxias do Sul caracteriza-se por ser de caráter público e de alta complexidade, presta assistência tanto à população local quanto à regional, perfazendo aproximadamente 980 mil pessoas. Está instalado num prédio de seis pavimentos, possuindo 257 leitos, distribuídos entre as unidades: Clínica Médica/Cirúrgica (114), Obstetrícia/Ginecologia (31), Pediatria (51), Unidade de Tratamento Intensivo UTI Neonatal (17), UTI Adultos (10), UTI Pediátrica (10), Clínica Psiquiátrica (7), Serviço de Atendimento Médico de Urgência e Emergência (23) e Gestante de Alto Risco (4).

**Isolados clínicos.** Foram examinados 62 isolados clínicos de *K. pneumoniae*, produtores de ESBL, obtidos de diferentes espécimes clínicos: 41,9% urina, 19,4% sangue, 29,0% vias aéreas, 4,8% cateter, 3,2% líquido peritoneal, 1,6% ferida operatória. Somente um isolado por paciente foi incluído no estudo. O diagnóstico de infecção hospitalar foi definido pelos critérios do *Centers for Disease Control and Prevention* (18). A identificação dos isolados bacterianos em gênero e espécie foi confirmada, utilizando-se provas bioquímicas convencionais. Os produtores de ESBL foram armazenados a -70°C em meio *skim milk* a 20% 1, 45.

**Teste de triagem e confirmatório para produtores de ESBL.** A detecção dos isolados de *K. pneumoniae*, produtores de ESBL, foi realizada pelo método de disco-difusão, conforme



os critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI/NCCLS), para os testes de triagem e confirmatório. Foram considerados como prováveis produtores de ESBL aqueles que apresentaram um halo de inibição de acordo com os pontos de corte, para pelo menos um dos substratos antimicrobianos: aztreonam e cefotaxima ( $\leq 27\text{mm}$ ), ceftazidima ( $\leq 22\text{mm}$ ), ceftriaxona ( $\leq 25\text{mm}$ ) e/ou cefpodoxima ( $\leq 17\text{mm}$ ). Os isolados que mostraram em pelo menos um dos dois substratos ceftazidima e cefotaxima, um aumento de ( $\geq 5\text{mm}$ ) no diâmetro na presença de ácido clavulânico foram considerados como produtores de ESBL. Esses isolados também foram testados com os substratos cefpodoxima e cefepima, aos quais foi adicionado ácido clavulânico, mesmo não sendo incluídos nos critérios do CLSI 2008. Foram utilizados, nos testes, os discos Oxoid®, cujo preparo diário continha ácido clavulânico. As cepas padrões *Escherichia coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 700603 foram usadas como controles negativo e positivo, respectivamente.

**Tipagem molecular por eletroforese em campo elétrico pulsado PFGE.** A tipagem molecular dos isolados de *Klebsiella pneumoniae*, produtores de ESBL, foi realizada pelo método de macrorrestrição de DNA seguida de eletroforese em campo pulsado, após digestão com tampão de restrição contendo 10U/ $\mu\text{L}$  da *SpeI* (Invitrogen®), por 16-18h a 37°C. A eletroforese foi realizada no sistema CHEF DR III (Bio-Rad, Richmond, CA, USA), com as seguintes condições 0,5x TBE (Tris 0,891 M, ácido bórico 0,90 M, EDTA 0,019 M) acrescido de 120 $\mu\text{L}$  de tiouréia 0,5 M por litro de tampão, agarose 1,2%, 13°C, 5,9 V/cm, ângulo de 120°, por 22h com um pulso inicial de 5s e final de 25s. Como marcador de peso molecular foi utilizado o fago *Lambda Ladder* 48,5 Kb, sendo o gel corado com brometo de etídio e fotografado. Os perfis de macrorrestrição do DNA foram comparados visualmente e a relação entre os isolados estabelecida utilizando-se os critérios

determinados por (42). Foram considerados isolados distintos aqueles que apresentaram sete ou mais bandas discordantes, isolados possivelmente relacionados aqueles com quatro a seis bandas diferentes, provavelmente relacionados com até três bandas diferentes e isolados indistinguíveis, aqueles com o mesmo perfil de macrorrestrrição.

**Caracterização molecular por PCR do tipo de ESBL.** Os isolados bacterianos com fenótipo de ESBL confirmados foram submetidos à análise de PCR para identificação dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> de três classes de ESBL, utilizando os *primers* descritos (4) e (30). Todas as reações foram realizadas num volume de 25µL com 0,75U de *Taq* polimerase (Invitrogen®), utilizando-se das seguintes condições de termociclagem que incluíram 5min de desnaturação à 94°C, seguidos de 35 ciclos de desnaturação (30 segundos à 94°C), anelamento (1,5min à 60°C para CTX-M e SHV e 45°C para TEM), extensão (2min à 72°C), finalizando com um período de extensão de 5min à 72°C e 15min à 4,0°. A cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603 foi utilizada como controle positivo para o gene *bla*<sub>SHV</sub>.

**Transferência do gene codificador de ESBL por conjugação.** Os trinta e cinco isolados de *Klebsiella pneumoniae*, produtores de ESBL, resistentes à ceftriaxona e sensíveis à estreptomicina foram selecionados para o processo de conjugação. A cepa *E. coli* α-DH, resistente à estreptomicina e lactose negativa, foi usada como receptora. A técnica utilizada foi adaptada 10. Após os cultivos do doador e receptor, isoladamente, em ágar MacConkey por 16 a 18 horas a 35°C, algumas colônias foram suspensas em caldo de Lurian-Bertani (LB) e incubadas a 35°C até atingir a fase exponencial de crescimento por cerca de 4 horas. Posteriormente, foi misturada uma alíquota de 500µL de cada dos caldos do doador e recepto em 8mL de caldo LB e incubado por 4horas a 35°C. Após esse período, 100µL da

suspensão, foram espalhados com uma alça de Drigalky sobre a superfície de uma placa contendo ágar MacConkey, adicionado de 30µg/mL de ceftriaxona e 300 µg/mL de estreptomicina, para selecionar as colônias transconjugantes. Cerca de seis colônias foram novamente subcultivadas em ágar MacConkey suplementado com 30µg/mL de ceftriaxona e submetidas à confirmação fenotípica da produção de ESBL e ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

**Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.** A metodologia dos testes sensibilidade aos 23 antimicrobianos foi realizada pela técnica de disco-difusão, Kirby-Bauer, conforme recomendações do CLSI/NCCLS (9). Foram testados os 62 isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL e (37) isolados de *K. pneumoniae* não produtoras de ESBL. Foram utilizados discos Oxoid® impregnados com os seguintes antimicrobianos: ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefoxitina, cefalotina, cefpodoxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima, cefepima, imipenem, ertapenem, aztreonam, gentamicina, amicacina, tobramicina, ciprofloxacina, gatifloxacina, sulfamotoxazol/trimetoprim, nitrofurantoína, ácido nalidíxico, estreptomicina, tetraciclina e tigeciclina. Para a tigeciclina foram utilizados os pontos de corte propostos pelo *Food and Drug Administratio* (FDA).

## RESULTADOS

**Tipagem molecular.** A tipagem molecular, pela análise de eletroforese em campo pulsado PFGE, revelou um total de 22 padrões de macrorrestrrição diferentes entre os 61 isolados tipáveis. Um isolado (1,6%), entre os 62 testados foi considerado não tipável, mesmo após uma terceira tentativa. A análise dos perfis de PFGE também revelou a presença de 11 (50,0%) padrões com mais de um isolado, entre os 22 padrões observados. Desses 11 padrões, dois isolados foram observados nos padrões (L, P e Q), três isolados (D e R), quatro isolados (T), cinco isolados (G, H e O), seis isolados F e treze isolados (K). Seis padrões (D, G, H, K, L e R) apresentaram subtipos que foram considerados como isolados provavelmente relacionados. Os 11 perfis envolveram 50 isolados de *K. pneumoniae*, produtores de ESBL. Eles foram provenientes de pacientes internados em duas unidades (padrões D - isolados em 2003 e 2006, P e Q - isolados em 2005 e T - isolados em 2006), em três unidades (H – dois isolados em 2003 e três em 2004 e O – isolados em 2005) e quatro unidades (F e G – isolados em 2003 e K – cinco isolados em 2003 e oito em 2004).

A distribuição dos 11 genótipos de PFGE por unidade de internação pode ser visualizada nas (**Tabela 1**) e (**Figura 1**). O padrão K com o maior número de isolados foi encontrado na seguinte ordem cronológica e de localização: os cinco primeiros isolados, obtidos em 2003, tiveram entre eles uma diferença de 7, 29, 34 e 59 dias de isolamento. Esses isolados foram provenientes da Unidade Clínica-Cirúrgica no 5º pavimento (primeiro isolado), da UTI Adulto no 3º pavimento (segundo, terceiro e quarto isolados) e da Unidade Clínica-Cirúrgica no 6º pavimento (quinto isolado). Para os demais isolados, obtidos em 2004, a diferença dos dias de recuperação entre eles foi de 9, 54, 3, 3, 14, 85 e 28 dias. Esses isolados foram oriundos da UTI Adulto (sexto e sétimo isolados), da Unidade Clínica-Cirúrgica no 5º pavimento (oitavo isolado), da UTI Adulto (nono isolado), da

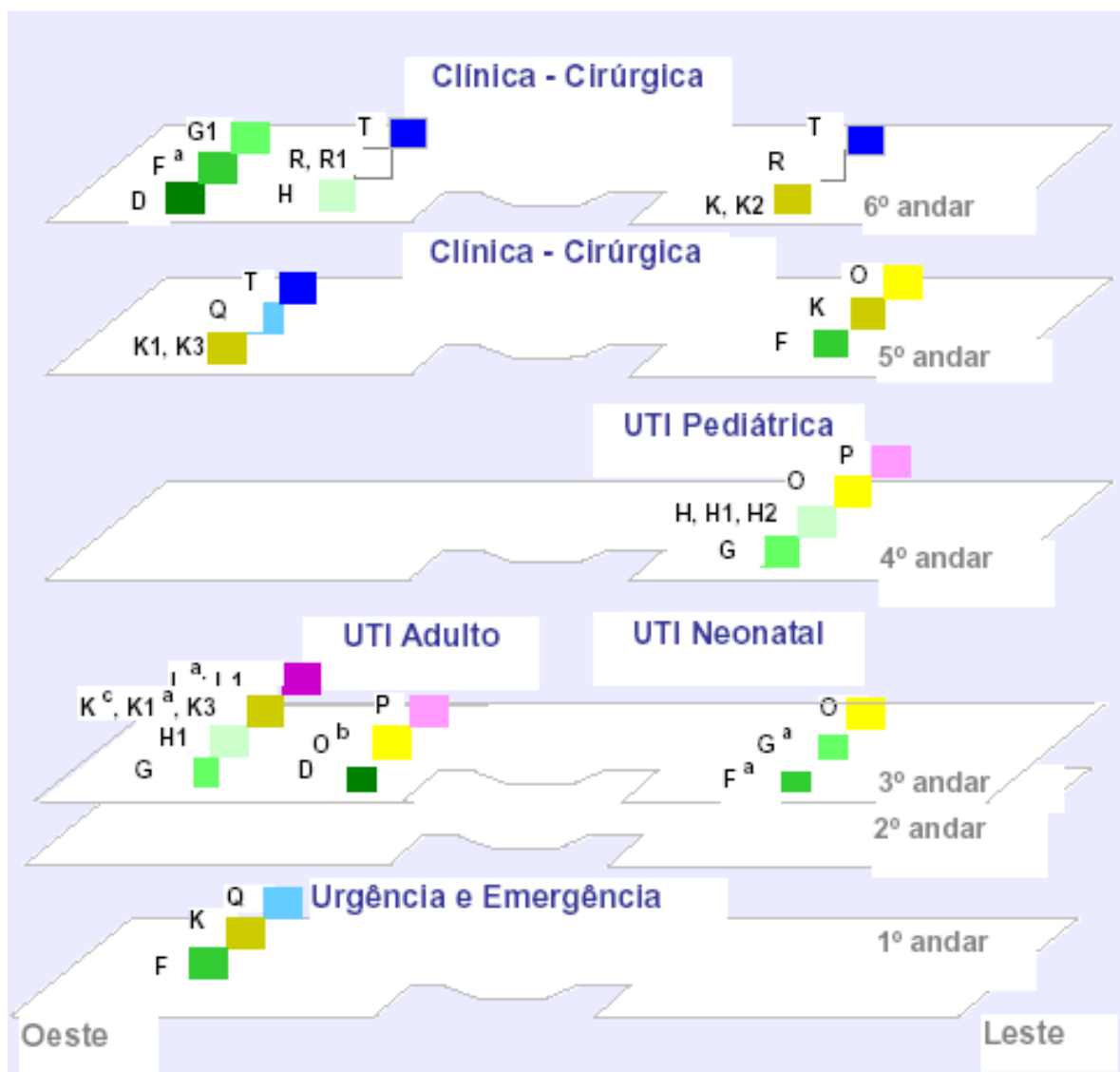
Unidade Clínica-Cirúrgica no 5º pavimento décimo isolado, da Unidade Clínica-Cirúrgica no 6º pavimento (décimo primeiro isolado), da Urgência e Emergência no primeiro pavimento (décimo segundo isolado) e da UTI Adulto (décimo terceiro isolado).

A distribuição temporal dos 11 perfis evidenciou um tempo mínimo de permanência dos padrões no hospital de um mês (genótipo R), de dois a sete meses para seis padrões (genótipos F, G, L, O, P e T), atingindo 11,1 meses (genótipo K), um ano (genótipo H) e três anos (genótipo D) **Figura 2**. Chamou a atenção o achado de um padrão do subtipo (D padrão D2) por se tratar de uma *K. pneumoniae* de origem comunitária de um paciente não hospitalizado, entretanto que apresentava comorbidade com doença neoplásica de próstata. (**Figura 3**)

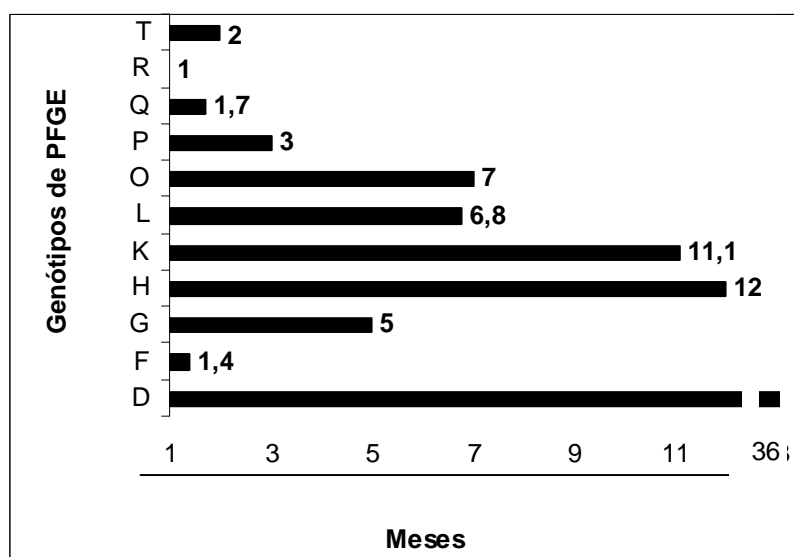
**Tabela 1:** Distribuição dos 62 isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL de origem hospitalar por data de isolamento, unidade de internação, gene de beta-lactamases e conjugação de acordo com o padrão de PFGE.

Padrão PFGE	n° isolados (n=62)	Data de isolamento	Unidade de internação	Pavimento	Gene de beta-lactamases (n° isolados)	Conjugação	
						Sim (n=26)	Não (n=9)
A, F, M NT <sup>a</sup> , Q K	6	7/4/3, 15/7/3, 25/2/4 9/4/4, 16/3/5 23/6/4	Urgência e Emergência	1 <sup>a</sup>	CTX-M+TEM (3) CTX-M+TEM+SHV (2) PCR negativo (1)	A, F	M Q
F <sup>b</sup> , G <sup>b</sup> N, O	6	6/5/3, 8/5/3, 24/5/3, 14/6/3 10/5/4, 29/3/5	UTI Neonatal	3 <sup>a</sup>	CTX-M+TEM (4) CTX-M+TEM+SHV (2)	F <sup>b</sup> , G <sup>b</sup> O	N
K, K3, <b>D1</b> G, H1, O, P, V I, J, K <sup>c</sup> , K1 <sup>b</sup> , <b>L, L1, O<sup>b</sup></b>	19	9/1/4, 7/3/4, 1/5/6 8/6/3, 16/2/4, 7/2/5, 18/5/5, 28/5/6 19/8/3, 20/8/3, 27/8/3, 1/1/4, 20/7/4, 24/9/3, 27/10/3, 29/11/3, 19/6/4, 20/5/5, 12/8/5	UTI Adulto		SHV+TEM (3) CTX-M+TEM (5) CTX-M+TEM+SHV (11)	G, H1, P J O	O
O G, H1, <b>H2, P</b> H	6	15/1/5 14/10/3, 30/4/4, 8/7/4, 17/2/5 26/6/3	UTI Pediátrica	4 <sup>o</sup>	CTX-M+SHV (1) CTX-M+TEM (4) CTX-M (1)	H1, H2 H	G
C	1	3/5/3	Pediátrica		CTX-M+TEM (1)		
K, U K3, Q E, K1, F, T	8	22/8/3, 25/5/6 9/3/4, 5/5/5 5/5/3, 4/3/4, 16/6/3, 23/5/6	Clínica-Cirúrgica	5 <sup>a</sup>	TEM (2) SHV+TEM (2) CTX-M+TEM (4)	F, T	U
T <sup>b</sup> K B, <b>D, F<sup>b</sup>, H, G1,</b> R, S, U D, K2, <b>R, R1</b>	16	16/5/6, 19/5/6 22/3/4 27/4/3, 4/5/3, 26/5/3, 1/6/3, 26/7/3, 19/8/3, 21/1/6, 6/3/6, 23/4/6, 29/5/3, 24/12/3, 5/2/6, 21/2/6	Clínica-Cirúrgica	6 <sup>a</sup>	TEM (2) SHV+TEM (1) CTX-M+TEM (9) CTX-M+TEM+SHV (4)	D, F <sup>b</sup> , H, G1 R D, R, R1	T <sup>b</sup> S

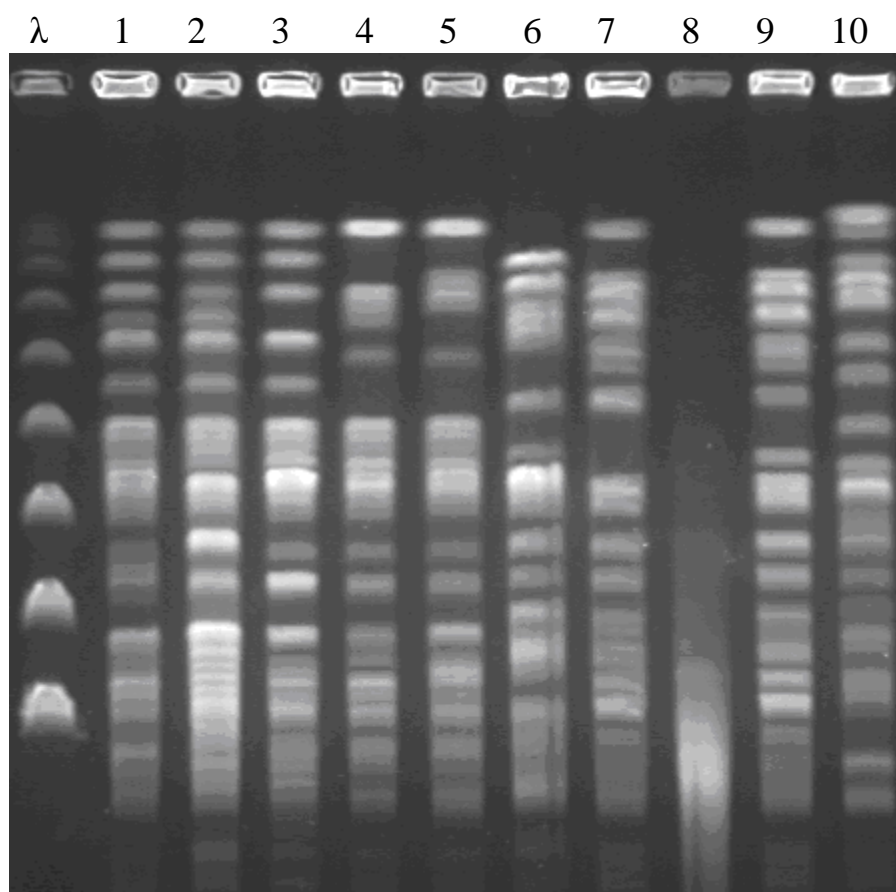
Os isolados com padrões PFGE em negrito podem ser visualizados na **Figura 1**. <sup>a</sup> NT: não tipável; <sup>b</sup> Dois isolados; <sup>c</sup> Três isolados



**Figura 1:** Distribuição dos 11 padrões de macro-restrição com mais de um isolado, envolvendo 50 isolados de *Klebsiella* spp produtores de ESBL nas unidades de internação do hospital. As letras e os quadrados coloridos correspondem aos padrões de PFGE e entre parênteses, o número de isolados verificados. <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup> : Dois, três e quatro isolados, respectivamente.



**Figura 2:** Distribuição temporal dos 11 padrões de PFGE com mais de um isolado de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL



**Figura 3:** Padrões de macro-restrição de 10 isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL. Legenda:  $\lambda$  – 48,5kb lambda ladder marcador de peso molecular, **Coluna 1:** padrão D, **Coluna 2:** padrão D1, **Coluna 3:** padrão D2, **Coluna 4:** padrão R, **Coluna 5:** padrão R1, **Coluna 6:** padrão G, **Coluna 7:** padrão L, **Coluna 8:** não-tipável, **Coluna 9:** padrão L1, **Coluna 10:** padrão H2.



**Detecção dos genes de ESBL por PCR.** Dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> de beta-lactamases, pesquisados nos 62 isolados de *K. pneumoniae*, 59 (95,2%) dos isolados possuíram o gene *bla*<sub>TEM</sub>, 51 (82,3%) isolados o gene *bla*<sub>CTX-M</sub> e 26 (41,9%) o gene *bla*<sub>SHV</sub>. Um isolado foi negativo para os genes analisados. Várias combinações gênicas foram verificadas: 30 isolados com os genes *bla*<sub>CTX-M</sub> + *bla*<sub>TEM</sub>, (17 em 2003, 5 em 2004, 3 em 2005 e 5 em 2006), 19 isolados com os três genes (8 em 2003, 5 em 2004, 4 em 2005 e 2 em 2006), seis isolados com os genes *bla*<sub>SHV</sub> + *bla*<sub>TEM</sub> (4 em 2004, 1 em 2005 e 1 em 2006) e um isolado *bla*<sub>CTX-M</sub> + *bla*<sub>SHV</sub> em 2005 **Tabela 1**.

**Experimentos de conjugação.** Foram obtidos transconjugantes de 26 (74,3%) isolados de *K. pneumoniae* dos 35 previamente selecionados, os quais representaram 10 genótipos de PFGE (padrão, D, F, G, H, J, O, P, R e T.) Nove isolados 25,7% não conjugaram, mesmo após uma terceira tentativa e representaram os seguintes genótipos de PFGE (G, M, N, O, Q, S, T e U). No grupo de isolados que não conjugaram, três isolados apresentaram genótipos de PFGE (G, O e T) também incluídos no grupo cuja conjugação foi verificada. Os genótipos (G e O), de cada grupo, apresentaram os mesmos genes de β-lactamase, ou seja, os genes *bla*<sub>CTX-M</sub> + *bla*<sub>TEM</sub> e os genes *bla*<sub>CTX-M</sub> + *bla*<sub>SHV</sub> + *bla*<sub>TEM</sub>, respectivamente. No entanto, os representantes do genótipo T do grupo dos isolados que não conjugaram possuíam apenas os genes *bla*<sub>TEM</sub>, diferentemente daquele que conjugou que possuía também o gene *bla*<sub>CTX-M</sub> (**Tabela 1**).

Os transconjugantes obtidos mostraram perfis de resistência aos três aminoglicosídeos testados amicacina, gentamicina e tobramicina sugerindo que a resistência aos beta-lactâmicos, mediada por ESBL, e aos aminoglicosídeos estão associadas com a presença de um plasmídeo conjugativo. O mesmo não foi observado para os demais antimicrobianos não beta-lactâmicos, como as fluorquinolonas ciprofloxacina e gatifloxacina, a nitrofurantoína, o trimetoprim/sulfametoxazol e o cloranfenicol.

**Perfil de sensibilidade dos isolados de *Klebsiella* spp produtores e não de ESBL aos antimicrobianos.** Os 37 isolados de *K. pneumoniae* não produtores de ESBL foram mais sensíveis aos diversos antimicrobianos testados quando comparadas aos 62 isolados produtores de ESBL (**Tabela 2**). Todos os isolados não produtores de ESBL foram sensíveis ao aztreonam e às cefalosporinas, exceto à cefalotina e à cefoxitina, que apresentaram sensibilidades de 81,1% e 94,6%, respectivamente. Os isolados produtores de ESBL, por outro lado, apresentaram altas taxas de resistência a esses antimicrobianos, exceto à cefoxitina e à ceftazidima. Independentemente da produção de ESBL, os carbapenêmicos imipenem e ertapenem inibiram o crescimento de 100,0% dos isolados de *K. pneumoniae*. Da mesma forma, a tigeciclina foi ativa contra 100% dos isolados, no entanto, um isolado produtor de ESBL mostrou resultado intermediário. Entre os aminoglicosídeos, a amicacina apresentou maior atividade que a gentamicina e a tobramicina contra os isolados produtores de ESBL. Para esses isolados, as sensibilidades foram respectivamente de 37,0%, 17,7% e 9,7%, enquanto que os isolados não produtores de ESBL apresentaram sensibilidades superiores a 94%. O ácido nalidíxico foi ativo contra 43,5% e as fluorquinolonas (ciprofloxacina e gatifloxacina) foram ativas contra aproximadamente 48% dos isolados produtores de ESBL. Mais de 83% os isolados não produtores de ESBL apresentaram sensibilidade ao ácido nalidíxico e fluorquinolonas. As

combinações de ampicilina com sulbactam e piperacilina com tazobactam mostraram-se pouco ativos com sensibilidades de 3,2% e 21,0%, respectivamente, para os isolados produtores de ESBL, comparados com sensibilidades superiores a 75% para os isolados não produtores de ESBL.

**Tabela 2:** Comparação do perfil de sensibilidade aos 25 antimicrobianos testados entre 62 isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL e 37 isolados não produtores de ESBL.

Agente antimicrobiano	<i>Klebsiella pneumoniae</i>					
	ESBL positiva n=62			ESBL negativa n=37		
	% S	% I	% R	% S	% I	% R
Ampicilina	0	0	100,0	5,4	5,4	89,2
Ampicilina/sulbactam	3,2	3,2	93,6	75,7	10,8	13,5
Piperacilina/tazobactam	21,0	86,5	27,4	94,6	0	5,4
Aztreonam	25,8	37,1	37,1	100,0	0	0
Cefalotina	0	0	100,0	81,1	5,4	13,5
Cefoxitina	93,6	3,2	3,2	94,6	0	5,4
Cefpodoxima	0	0	100,0	100,0	0	0
Ceftazidima	85,5	11,3	3,2	100,0	0	0
Cefotaxima	1,6	30,7	67,7	100,0	0	0
Ceftriaxona	1,6	21,0	77,4	100,0	0	0
Cefepima	33,9	35,5	30,6	100,0	0	0
Imipenem	100,0	0	0	100,0	0	0
Ertapenem	100,0	0	0	100,0	0	0
Amicacina	37,0	21,0	42,0	97,3	0	2,7
Gentamicina	17,7	3,2	79,1	94,6	0	5,4
Tobramicina	9,7	4,8	85,5	94,6	0	5,4
Ácido nalidíxico	43,5	8,1	48,4	83,8	5,4	10,8
Ciprofloxacina	50,0	6,5	43,5	94,6	0	5,4
Gatifloxacina	48,4	6,5	45,1	94,6	0	5,4
Nitrofurantoína	45,2	14,5	40,3	75,7	10,8	13,5
Trimetoprim/sulfametoxazol	43,5	6,5	50,0	75,7	0	24,3
Tetraciclina	69,4	25,8	4,8	91,9	0	8,1
Estreptomicina	58,0	6,5	35,5	62,2	21,6	16,2
Cloranfenicol	27,4	4,8	67,8	--	--	--
Tigeciclina	98,4	1,6	0	100,0	0	0

S: sensível, I: intermediário, R: resistente

## DISCUSSÃO

A tipagem molecular tem orientado as medidas a serem adotadas nos programas de controle de infecção ao auxiliar na identificação de surtos e de fontes de infecção, na diferenciação de modos de transmissão ou de disseminação do patógeno. A epidemiologia molecular é importante para as investigações das infecções relacionadas à assistência à saúde, em especial às nosocomiais, causadas por bactérias multirresistentes, como as da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL (33, 42, 44).

As beta-lactamases representam o principal mecanismo de resistência dos bacilos Gram-negativos aos antimicrobianos beta-lactâmicos amplamente utilizados no tratamento de infecções comunitárias e hospitalares (24, 25). Nos últimos 25 anos, as ESBL ou beta-lactamases do grupo funcional 2be, tiveram um significativo aumento na prevalência mundial em patógenos hospitalares de importância clínica, especialmente em *K. pneumoniae*, seguida da *Escherichia coli*, mas também em muitos outros gêneros da família *Enterobacteriaceae* (5, 30).

Os resultados da tipagem molecular, pela técnica de PFGE, obtidos nesse trabalho, demonstraram uma grande variabilidade entre os 62 isolados de *K. pneumoniae*, produtoras de ESBL, sendo observado 22 padrões entre os 61 isolados tipados. No entanto, além da emergência de cepas exibindo genótipos únicos, foram observados 11 perfis que envolveram um total de 50 isolados de *K. pneumoniae*, evidenciando uma disseminação multiclonal dessas bactérias. Também foi observada uma alta transmissão intra-hospitalar desses padrões entre seis das sete unidades de internação do hospital com isolamento de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL (nove padrões com transmissão intra-hospitalar envolvendo de duas a quatro unidades de internação). Além disso, foi verificada a permanência de perfis por um período próximo ou superior a um ano. O padrão K com 13

isolados foi observado em quatro unidades de internação localizadas em diferentes pavimentos do hospital, e isolados num período de 11,1 meses entre os anos de 2003 a 2004. Algumas pesquisas, por exemplo, (6, 12, 17, 22, 23, 26, 27, 31, 34) têm demonstrado uma disseminação de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, de modo clonal e/ou multiclonal, assim como não clonal evidenciada pela ampla variedade genômica encontrada

Nas espécies do gênero *Klebsiella*, a infecção cruzada intra-hospitalar pode ser bastante facilitada devido à presença de fatores, como, a cápsula, que explicaria a sobrevivência por períodos mais longos comparadas a outras bactérias enterais nas mãos e nas superfícies ambientais (7). Sabe-se que a *K. pneumoniae*, além de ser um patógeno, principalmente hospitalar e oportunista, está presente nos seres humanos, colonizando a nasofaringe e o trato digestório. No ambiente hospitalar, o trato digestório dos pacientes e a contaminação das mãos dos pacientes e/ou dos profissionais de saúde representam os principais reservatórios de transmissão da *K. pneumoniae*, além da contaminação de diversos equipamentos médicos (11, 15, 19, 20, 35). Uma alta porcentagem de pacientes portadores intestinais de *K. pneumoniae*, produtoras de ESBL, previamente a infecção comprovam a importância do trato digestório como reservatório dessas bactérias. Considerando essa situação, embora a descontaminação intestinal seletiva possa ser uma medida de controle de infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, ainda há falta de concordância sobre a sua real eficácia (41).

A disseminação clonal sugere uma transmissão cruzada, o que implica na adoção de medidas de precauções de contato, incluindo o emprego de aventais e luvas para o contato com o paciente colonizado ou infectado, aliadas a uma eficiente anti-sepsia (40). Por outro lado, a grande variabilidade genômica sugere a influência da pressão seletiva dos antimicrobianos e a implementação de medidas baseadas no controle do uso dessas drogas. Entretanto, situações moleculares mais complexas têm emergido em hospitais, onde a

transferência horizontal de plasmídios que codificam a ESBL seja a responsável pela disseminação do mecanismo de resistência entre as diversas bactérias (30). Os dados obtidos pelas análises de PCR, no presente trabalho, suportam a possibilidade de transferência horizontal, visto que diferentes padrões apresentaram o mesmo gene de beta-lactamase ou a mesma associação de genes e isolados geneticamente não relacionados possuíam semelhante gene ou combinação gênica. Além disso, 74,3% dos isolados transferiram o plasmídio que codifica as ESBL para *E. coli*, demonstrando a presença de plasmídios conjugativos e a transferência horizontal destes genes de resistência.

Os resultados obtidos nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos mostraram que os isolados de *K. pneumoniae*, produtores de ESBL, avaliados, apresentaram altas taxas de resistência à maioria dos antimicrobianos testados quando comparados aos isolados não produtores de ESBL. Esses resultados, observados no presente estudo, são semelhantes aos resultados de muitos estudos previamente publicados, demonstrando que os isolados de *K. pneumoniae*, com fenótipo ESBL, são caracterizados pela multirresistência tanto a beta-lactâmicos como aos antimicrobianos que não beta-lactâmicos.

Todos os isolados avaliados apresentaram de sensibilidade aos carbapenêmicos e a tigeciclina, independente da produção de ESBL, exceto para um isolado que mostrou um resultado intermediário à tigeciclina. A tigeciclina pertence a uma nova classe de antimicrobianos, denominada de glicilciclinas, que age inibindo a síntese protéica. Embora seja um derivado semi-sintético da minociclina, essa estrutura química resultou num amplo e diferenciado espectro de ação, com ação contra patógenos Gram-positivos e Gram-negativos resistentes à tetraciclina, o que justificou a sua caracterização como uma nova classe de antimicrobianos. Possui um amplo espectro de ação atuando contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo os membros da família *Enterobacteriaceae*,

produtores de ESBL, embora tenha uma ação diminuída frente a espécies de *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* e *Pseudomonas* (16, 38).

Em resumo, os resultados demonstraram uma grande variabilidade genômica entre os 62 isolados de *K. pneumoniae*, produtores de ESBL, indicando forte pressão seletiva de antimicrobianos. No entanto, a presença de 11 padrões envolvendo 50 isolados, evidenciou também uma disseminação multiclonal e, portanto, mostrando a ocorrência de transmissão cruzada. Também foi observada uma grande disseminação intra-hospitalar de padrões, envolvendo seis das sete unidades de internação localizadas em diferentes pavimentos do hospital, bem como, uma situação de endemia dessas bactérias no hospital. As *K. pneumoniae* produtoras de ESBL foram multirresistentes, inclusive aos antimicrobianos que não beta-lactâmicos, sendo capazes de transferir genes de resistência aos aminoglicosídeos.



## REFERÊNCIAS

1. **Abbott, S.** 2003. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, and Serratia*. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.C., Tenover, P.C. Eds. Manual of clinical microbiology. 8<sup>th</sup> ed, Washington, DC: American Society for Microbiology. pp 475-482.
2. **Archibald, L.K.** 2004. Gram-negative, hospital-acquired infections: a growing problem. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **25**:809-811.
3. **Bradford, P.A.** 2001. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:933-951.
4. **Bonnet, R., Sampaio, J.L., Labia, R., Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Sirot, J.** 2001. Novel CTX-M  $\beta$ -lactamase CTX-M-8 in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1936-1942.
5. **Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F.** 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**:144-153.
6. **Carattoli, A., García-Fernández, A., Varesi, P., Fortini, D., Gerardi, S., Penni, A., Mancini, C., Giordano, A.** 2008. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases isolated in Rome, Italy. *J. Clin. Microbiol.* **46**:103-108.
7. **Casewell, M.W., Phillips, I.** 1981. Aspects of the plasmid-mediated antibiotic resistance and epidemiology of *Klebsiella* species. *Am. J. Med.* **70**:459-462.
8. **CDC NNIS System** 2003. National nosocomial infections surveillance NNIS system report, data summary from January 1992 through June 2003, issued August 2003. *Am. J. Infect. Control* **31**:481-498.

9. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** CLSI 2008. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved standard M2-A10. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
10. **Coque, T.M., Liver, A., Pérez-Dias, J.C., Baquero, F., Cantón, R.** 2002. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital Madrid, 1989 to 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:500-510.
11. **D'Agata, E.M., Ventkataraman, L., DeGirolami, P., Samore, M.** 1999. Molecular epidemiology of ceftazidime-resistant gram-negative bacilli on inanimate surfaces and their role in cross-transmission during non-outbreak periods. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3065-3067.
12. **DiPersio, J.R., Deshpande, L.M., Biedenbach, D.J., Toleman, M.A., Walsh, T.R., Jones, R.N.** 2005. Evolution and dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and molecular report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-2003. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* **51**:1-7.
13. **Dzidic, S., Bedeković, V.** 2003. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta. Pharmacol. Sin.* **24**:519-526.
14. **Eisenstein, B.I., Zaleznik, D.F.** 2000. *Enterobacteriaceae*. In: Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. 5<sup>th</sup> ed. Vol 2. Philadelphia: Churchill Livingstone. pp.2294-2309.
15. **Gaillot, O., Maruejols, C., Abachin, E., Lecuru, F., Arlet, G., Simonet, M., Berche, P.** 1998. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1357-1360.

16. Gales, A.C., Jones, R.S., Andrade, S.S., Pereira, A.S., Sader, H.S. 2005. In vitro activity of tigecycline, a new glycycline, tested against 1,326 clinical bacterial strains isolated from Latin America. *Braz. J. Infec. Dis.* **9**:348-356.
17. Garcia, D.O., Doi, Y., Szabo, D., Adams-Haduch, J.M., Vaz, T.M.I., Leite, D., Padoveze, M.C., Freire, M.P., Silveira, F.P., Paterson, D.L. 2008. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1790-1793.
18. Garner, J.S., Jarvis, W.R., Emori, T.G., Hora, T.C., Hughes, J.M. 1988. CDC definitions isolated for nosocomial infections. *Am. J. Infect. Control.* **16**:128-140.
19. Jumaa, P., Chattopadhyay, B. 1992. Pseudobacteraemia with multiresistant *Klebsiella pneumoniae* resulting from contamination from the blood gas machine on a neonatal unit. *J. Hosp. Infect.* **22**:251-255.
20. Kac, G., Podglajen, I., Vaupré, S., Colardelle, N., Buu-Hoï, A., Gutmann, L. 2004. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamses-producing *Enterobacteriaceae* isolated from environmental and clinical specimens in a cardiac surgery intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **25**:852-855.
21. Klevens, R.M., Edwards, J., Richards, C.L., Horan, T.C., Gaynes, R.P., Pollack, D.A., Cardo, D.M. 2007. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Reports.* **122**: 160-166.
22. Kristóf, K., Szabó, D., Marsh, J.W., Cser, V., Janek, L., Rozgonyi, F., Nobilis, A., Nagy, K., Paterson, D.L. 2007. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. In a neonatal intensive care unit: risk factors for the infection and the dynamics of the molecular epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**:563-570.
23. Lavigne, J-P., Marchandin, H., Delmas, J., Moreau, J., Bouziges, N., Lecaillon, E., Cavalie, L., Jean-Pierre, H., Bonnet, R., Sotto, A. 2007. CTX-M  $\beta$ -lactamases-producing *Escherichia coli* in French hospitals: prevalence, molecular epidemiology, and risk factors. *J. Clin. Microbiol.* **45**:620-626.

24. **Livermore, D.M.** 1995.  $\beta$ -lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:557-584.
25. **McManus, M.C.** 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **54**:1420-33.
26. **Mendonça, N., Leitão, J., Manageiro, V., Ferreira, E., The Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal, Caniça, M.** 2007. Spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1946-1955.
27. **Miranda, G., Castro, N., Leños, B., Valenzuela, A., Garza-Ramos, U., Rojas, T., Solórzano, F., Chihu, L., Silva, J.** 2004. Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a mexican pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* **42**:30-35.
28. **Morosini, M-I, García-Castilhos, M., Coque, T.M., Valverde, A., Novais, A., Loza, E., Baquero, F., Cantón, R.** 2006. Antibiotic coresistance in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae and in vitro activity of tigecycline. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **50**:2695-2699.
29. **Paterson, D.L., Bonomo, R.A.** 2005. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.***18**:657-686.
30. **Paterson, D.L., Hujer, K.M., Hujer, A.M., Yeisser, B., Bonomo, M.D., Rice, L.B., Bonomo, R.A.** 2003. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3554-3560.
31. **Pessoa-Silva, C.L., Moreira, B.M., Almeida, V.C., Flannery, B., Lins, M.C.A., Sampaio, J.L.M., Teixeira, L.M., Miranda, L.E.V., Riley, L.W., Gerberding, J.L.** 2003. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: risk factors for infection and colonization. *J. Hosp.*

- Infect. 53:198-206.
32. **Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K.M., Bonomo, R.A.** 2007. The continuing challenge of ESBLs. *Curr. Opin. Pharmacol.* **7**:459-469.
  33. **Pfaller, M.A., Herwaldt, L.A.** 1997. The clinical microbiology laboratory and infection control: emerging pathogens, antimicrobial resistance, and new technology. *Clin. Infect. Dis.* **25**:858-870.
  34. **Pitout, J.D.D., Church, D.L., Gregson, D.B., Chow, B.L., McCracken, M., Mulvey, M.R., Laupland, K.B.** 2007. Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the Calgary health region: emergence of CTX-M-15-producing isolates. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **51**:1281-1286.
  35. **Podschun, R., Ullmann, U.** 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 598-603.
  36. **Rebuck, J.Á., Olsen, K.M., Fey, P.D., Langnas, A.N., Rupp, M.E.** 2000. Characterization of an outbreak due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric intensive care unit transplant population. *Clin Infect Dis.* **31**:1368-1372.
  37. **Reiner, L.G., Carroll, K.C.** 2003. Procedures for the storage of microorganisms. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Tenover, R.H., Tenover, R.H., Eds. *Manual of clinical microbiology*. 8<sup>th</sup> ed, Washington, DC: American Society for Microbiology. pp. 69-73.
  38. **Rossi, F., Andreazzi, D.** 2006. Overview of tigecycline and its role in the era of antibiotic resistance. *Braz. J. Infect. Dis.* **10**:203-216.
  39. **Slama, T.G.** 2008. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Critical Care*, 12:4.
  40. **Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., The Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee.** 2006. Management of multidrug-resistant

organisms in healthcare settings, 2006. CDC. 53p

41. **Smet, A.M.G.A, Kluytmans, J.A.J.W., Cooper, B.S., Mascini, E.M., Benus, R.F.J., van der Werf, T.S., van der Hoeven, J.G., Pickkers,P., Bogaers-Hofman, D., van der Meer, N.J.M., Bernards, A. T., Kuijper, E.J., Joore, J.C.A., Leverstein-van Hall, M.A., Bindels, A.J.G.H., Jansz, A.R., Wesselink, R.M.J., Jongh, B.M., Dennesen, P.J.W., van Asselt, G.J., Velde, L.F., Frenay, I.H.M.E., Kaasjager, K., Bosch, F.H., van Iterson, M., Thijsen, S.F.T., Kluge, G.H., Pauw, W., de Vries, J.W., Kaan, J.A., Arends, J.P., Aarts, L.P.H.J., Sturm, P.D.J., Harinck, H.I.J., Voss, A., Uijtendaal, E.V., Blok, H.E.M., Thieme Groen, E.S., Pouw, M.E., Kalkman, C.J. Bonte, M.J.M.** 2009. Decontamination of the digestive tract and oropharyns in ICU patients. *N. Engl. J. Med.* **360**:20-31.
42. **Tenover, F., Arbeit, R., Goering, R., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* **33**:2233-2239.
43. **Tenover, F.C.** 2001. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. *Clin. Infect. Dis.*, **33**:108-115.
44. **Tosin, I., Silbert, S., Sader, H.S.** 2003 The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among gram-negative rods in brazilian hospitals. *Braz. J. Infec. Dis.***7**:360-369.
45. **Winn, W.C.Jr, Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P.C., Woods, G.** 2006. Koneman`s color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Chapter 6 The *Enterobacteriaceae* pp.211-302
46. **Wu, T-L., Chia, J-H., Su, L-H. , Chu, C., Chiu, C-H.** 2003. Dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing Enterobacteriaceae in pediatric intensive care units. *J Clin Microbiol* **41**:4836-4838.

47. **Yong, D., Shin, J.H., Kim, S** et al. 2003. High prevalence of PER-1 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter* spp. In Korea. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1749-1751.

## 5. CONCLUSOES GERAIS

1. Do total de 142 isolados analisados, constatou-se uma alta prevalência de isolados de *Klebsiella pneumoniae* (43,7%), produtores de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL), em relação aos 209 isolados de *Escherichia coli* (6,7%), no Hospital Geral de Caxias do Sul (RS).
2. Somente 2,5% dos 38 isolados de *Klebsiella pneumoniae* e 0,4% dos 953 isolados de *Escherichia coli*, ambos de origem comunitária, foram confirmados como produtores de ESBL.
3. Os materiais clínicos nos quais mais frequentemente se obteve a identificação de isolados de *Klebsiella* spp e *E. coli*, produtores de ESBL, de origem hospitalar, foram as vias aéreas (32,8%), o sangue (30,0%) e a urina (18,2%). As unidades hospitalares que apresentaram maior risco para o isolamento dessas bactérias foram as Unidades de Tratamento Intensivo (Neonatal, Pediátrica e Adultos) (36,5%), seguido pelas Unidades de Internação Clínica-Cirúrgicas (19,6%).
4. Independente da bactéria analisada, o substrato que mostrou o pior desempenho nos testes fenotípicos (triagem e confirmatório) para a detecção de produtores de ESBL foi a ceftazidima.
5. Os demais substratos, utilizados no teste de triagem (cefpodoxima, cefotaxima, ceftriaxona e aztreonam), mostraram ótimo desempenho para a detecção de ESBL em isolados de *Klebsiella* spp (todos com sensibilidade de 100% e especificidade >94,0%). O mesmo não foi observado para os isolados de *E. coli*, sendo o substrato com melhor desempenho apenas a cefpodoxima (sensibilidade de 100,0% e especificidade de 75,0%).
6. A utilização do antimicrobiano cefepima, no teste de triagem com pontos de corte



de  $\leq 22$ mm (*E. coli*) e de  $\leq 27$ mm (*Klebsiella* spp), mostrou excelente desempenho com 100,0% de sensibilidade (*E. coli*) e 93,4% (*Klebsiella* spp) e 100,0% de especificidade, podendo ser uma boa alternativa para melhorar a acurácia na detecção de isolados de *E. coli*, produtores de ESBL.

7. Os isolados de *Klebsiella* spp, produtores de ESBL, apresentaram taxas de resistência superiores àqueles apresentados pelos isolados não produtores de ESBL para vários antimicrobianos beta-lactâmicos e não beta-lactâmicos.
8. De acordo com os testes de sensibilidade, os carbapenêmicos (imipenem e ertapenem) e a tigeciclina constituíram as únicas opções terapêuticas mais seguras para o tratamento das infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae*, produtoras de ESBL.
9. O gene de beta-lactamase *bla*<sub>TEM</sub> foi o mais frequentemente detectado por PCR nos isolados bacterianos analisados, estando presente em 89,0% deles, seguido pelo gene *bla*<sub>CTX-M</sub>, verificado em 75,6%; e o gene *bla*<sub>SHV</sub>, em 35,4 %.
10. Os resultados da tipagem molecular pela técnica de PFGE mostraram uma ampla variabilidade genômica, bem como, a ocorrência de disseminação multiclonal dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL entre várias unidades de internação. A pressão seletiva dos antimicrobianos sobre a microbiota hospitalar associada a falhas nas medidas para conter ou desacelerar a disseminação bacteriana estão contribuindo para a alta prevalência de isolados produtores de ESBL.
11. Os isolados de *K. pneumoniae* foram capazes de transferir os genes para ESBL e para resistência aos aminoglicosídeos, através da transferência horizontal o que pode representar um impacto importante nas medidas de controle e nas opções terapêuticas para o tratamento de infecções por bactérias produtoras de ESBL.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott, S. (2003). *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, and Serratia*. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Tenover, M.A.; Tenover, R.H.; (Eds). **Manual of clinical microbiology**. 8<sup>th</sup> ed, Washington, DC: American Society for Microbiology. pp 475-482.
2. Alvarez, M.; Tran, J.H.; Chow, N.; Jacoby, G.A. (2004). Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in the United States. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 48:533-537.
3. Alves, M.S.; Dias, R.C.S.; Castro, A.C.D.; Riley, L.W.; Moreira, B.M. (2006). Identification of clinical isolates of indol-positive and indol-negative *Klebsiella* spp. **J. Clin. Microbiol.** 44:3640-3646.
4. Ambler, R.P. (1980). The structure of  $\beta$ -lactamases. **Philos. Trans. Roy. Soc. London Biol.** 289:321-331.
5. American Society for Microbiology (ASM) (1995). Report on the ASM task force on antibiotic resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** pp. 1-23.
6. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (2004). Legislação e criação de um programa de prevenção e controle de infecção hospitalar. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Curso de infecção relacionada à assistência a saúde. Versão 1,0. Módulo 1.
7. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (2006). Termo de cooperação 37 (TC 37) entre a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).
8. Archibald, L.K. (2004). Gram-negative, hospital-acquired infections: a growing problem. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** 25:809-811.
9. Arpin, C.; Dubois, V.; Coulanges, L.; André, C.; Fischer, I.; Noury, P.; Grobost, F.; Brochet, J-P.; Jullin, J.; Dutilh, B.; Larribet, G.; Lagrange, I.; Quentin, C. (2003). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community and private health care centers. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 47:3506-3514.

10. Arpin, C.; Coulange, L.; Dubois, V.; André, C.; Fischer, I.; Fourmaux, S.; Grobost, F.; Jullin, J.; Dutilh, B.; Couture, J-F.; Noury, P.; Lagrange, I.; Ducastaing, A.; Doermann, H-P.; Quentin, C. (2007). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* strains in various types of private health care centers. **Antimicrob. Agents Chemother.** 51:3440-3444
11. Babinchak, T.; Ellis-Grosse, E.J.; Dartois, N.; Rose, G.M.; Eobotac, S.G. (2005). The efficacy and safety of tigecycline in the treatment of complicated intra-abdominal infections: analysis of pooled clinical trial data. **Clin. Infect. Dis.** 41:354-367.
12. Bagley, S.; Seidler, R.J.; Brenner, D.J. (1981). *Klebsiella planticola* sp. nov.: a new species of *Enterobacteriaceae* found primarily in nonclinical environments. **Curr. Microbiol.** 6:105-109.
13. Bauerfeind, A.; Casellas, J.M.; Goldberg, M.; Holley, M.; Jungwirth, R.; Mangold, P.; Rohnisch, T.; Schweighart, S.; Wilhelm, R. (1992). A new plasmidic cefotaxime from patients infected with *Salmonella typhimurium*. **Infect.** 20:158-163.
14. Bauerfeind, A.; Grimm, H.; Schweighart, S. (1990). A new plasmid cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infect.** 18:294-298.
15. Bell, J.M.; Chitsaz, M.; Turnidge, J.D.; Barton, M.; Walters, L.J.; Jones, R.N. (2007). Prevalence and significance of a negative extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) confirmation test result after a positive ESBL screening test result for isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: results from the SENTRY Asia-Pacific Surveillance program. **J. Clin. Microbiol.** 45:1478-1482.
16. Bell, J.M.; Turnidge, J.D.; Jones, R.N.; SENTRY Asia-Pacific. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in the Asia-Pacific Region: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1998 to 2001. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47:3989-3993, 2003.
17. Ben-Ami, R.; Schwaber M.J.; Navon-Venezia, S.; Schwartz, D.; Giladi, M.; Chmelnitsky, I.; Leavitt, A.; Carmeli, Y. (2006). Influx of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. **Clin. Infect. Dis.** 42:925-934.

18. Biedenbach, D.J.; Moet, G.J.; Jones, R.N. ( 2004). Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Dian. Microbiol. Infect. Dis.** 50:59-69.
19. Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: CTX-M enzymes. **Antimicrob. Agents Chemother.** 48:1-14.
20. Bonnet, R.; Sampaio, J.L.; Labia, R.; Champs, C.; Sirot, D. ; Chanal, C.; Sirot, J. (2001a). Novel CTX-M  $\beta$ -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44:1936-1942.
21. Bonnet, R.; Dutour, C.; Sampaio, J.L.; Chanal, C.; Sirot, D.; Labia, R.; Champs, C.; Sirot, J. (2001b). Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-Gly. **Antimicrob. Agents Chemother.** 45:2269-2275.
22. Bonnet, R.; Sampaio, J.L.; Chanal, C.; Sirot, D.; Champs, C.; Viallard, J.L.; Labia, R.; Sirot, J. (2000) A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44:3061-3068.
23. Bopp, C.A.; Brenner, F.W.; Fields, P.I.; Wells, J.G.; Strockbine, N.A. (2003). *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: Murray, P.R.; Baron, E.JO; Jorgensen, J.H.; Tenover, M.C.; Tenover, M.A.; Tenover, R.H. (eds). Manual of clinical microbiology. 8 (ed). Vol 1. Washington: ASM Press. pp.654-671.
24. Borer, A.; Gilad, J.; Menashe, G.; Peled, N.; Riesenber, K.; Schlaeffer, F. (2002). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* strains in community-acquired bacteremia in Southern Israel. **Med. Sci. Monit.** 8:CR44-47.
25. Bradford, P.A. (2001). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin. Microbiol. Rev.** 14:933-951.
26. Bradford, P.A.; Urban, C.; Jaiswal, A.; Mariano, N.; Rasmussen, B.A.; Projan, S.J.; Rahal, J.J.; Bush, K. (1995). SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients.

- Antimicrob. Agents and Chemother.** 39:899-905.
27. Brasil. Ministério da Saúde. (1983). Portaria 196 de 24 de junho de 1983. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de junho de 1983.
28. Brasil. Ministério da Saúde. (1997). Lei Federal N 9431, de 6 de janeiro de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, 6 de janeiro de 1997.
29. Brasil. Ministério da Saúde. (1998). Portaria 2616/Ms/GM, de 12 de maio de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 de maio de 1998.
30. Bret, L.; Chanel, C.; Sirot, D.; Labia, R.; Sitor, J. (1996). Characterization of an inhibitor-resistant enzyme IRT-2 derived from TEM-2  $\beta$ -lactamase produced by *Proteus mirabilis* strains. **J. Antimicrob. Chemother.** 38:183-191.
31. Brisse, S.; Himbergen van T. ; Kusters, K. ; Verhoef, J. (2004). Development of rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. **Clin. Microbiol. Infect.** 10:942-945.
32. Bouchillon, S.K.; Johnson, B.M.; Hoban, D.J.; Johnson, J.L.; Dowzicky, M.J.; Wu, D.H.; Visalli, M.A.; Bradford, P.A. (2004). Determining incidence of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistance *Enterococcus faecium* and methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* in 38 centers from 17 countries: the PEARLS study 2001-2202. **Int. J. Antimicrob. Agents.** 24:119-124.
33. Bush, K. (1989). Characterization of  $\beta$ -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** 33:259-276.
34. Bush, K. (2001). New  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin. Infect. Dis.**32:1085-1089.
35. Bush, K.; Jacoby, G.A.; Medeiros, A.A. (1995). A functional classification scheme for lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob. Agents Chemother.** 39:1211-1233.
36. Bush, K.; Jacoby, G. (1997). Nomenclature of TEM  $\beta$ -lactamases. **J. Antimicrob. Chemother.** 39:1-3.

37. Campos, L.C.; Franzolin, M.R.; Trabulsi, L.R. (2005). Infecções causadas por *Escherichia coli*. In: Coura, J.R. (Ed). **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 2v. Rio de Janeiro:Editora Guanabara Koogan S.A. pp. 1357-1366.
38. Cantón, R.; Novais, A.; Valverde, A.; Machado, E.; Peixe, L.; Baquero, F. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. **Clin. Microbiol. Infect.** 14:144-153.
39. Carattoli, A.; García-Fernández, A.; Varesi, P.; Fortini, D.; Gerardi, S.; Penni, A.; Mancini, C.; Giordano, A. (2008). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamses isolated in Rome, Italy. **J. Clin. Microbiol.** 46:103-108.
40. Celenza, G.; Pellegrini, C.; Caccamo, M.; Segatore, B.; Amicosante, G.; Perilli, M. (2006). Spread of *bla*<sub>CTX-M</sub>-type and *bla*<sub>PER-2</sub>  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. **J. Antimicrob. Chemother.** 57:975-978.
41. CDC NNIS System (2003). National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2003, issued August 2003. **Am. J. Infect. Control** 31:481-498.
42. Chaibi, E.B.; Sitot, D.; Paul, G.; Labia, R. (1999). Inhibitor-resistant TEM- $\beta$ -lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. **J. Antimicrob. Chemother.** 43:447-458.
43. Chmelnitsky, I.; Carmeli, Y.; Leavitt, A.; Schwaber, M.J.; Navon-Venezia, S. (2005). CTX-M-2 and a new CTX-M-39 enzyme are the major extended-spectrum beta-lactamases in multiple *Escherichia coli* clones isolated in Tel Aviv, Israel. **Antimicrob. Agents Chemother.** 49:4745-4750.
44. Claeys, G.; Baere, De T.; Wauters, G.; Vandecandelaere, P.; Verschraegen, G.; Muylaert, A. Vaneechoutte, M. (2004). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Enterobacter aerogenes* phenotypically misidentified as *Klebsiella pneumoniae* or *K. terrigena*. **BMC Microbiology.** 4:49. <http://www.biomedcentral.com/147-2180/4/49>.

45. Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI) (2008). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved standard M2-A10. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
46. Coque, T.M.; Liver, A.; Pérez-Dias, J.C.; Baquero, F.; Cantón, R. (2002). Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). **Antimicrob. Agents Chemother.** 46:500-510.
47. Cormican, M.; Morris, D.; Corbett-Feeney, G.; Flynn, J. (1998). Extended spectrum beta-lactamase production and fluorquinolone resistance in pathogens associated with community acquired urinary tract infection. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.** 32:317-319.
48. D'Agata, E.M.; Ventkataraman, L.; DeGirolami, P.; Samore, M. (1999). Molecular epidemiology of ceftazidime-resistant gram-negative bacilli on inanimate surfaces and their role in cross-transmission during nonoutbreak periods. **J. Clin. Microbiol.** 37:3065-3067.
49. Daza, R.; Gutiérrez, J.; Piédrola, G. (2001). Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary infections. **Inter. J. Antimicrobial. Agents** 18:211-215.
50. Depardieu, F.; Podglajen, I.; leclercq, R.; Collatz, E.Courvalin, P. (2007). Modes and modulation of antibiotic resistance gene expression. **Clin. Microbiol. Rev.** 20:79-114.
51. Diekema, D.J.; Pfaller, M.A., Jones, R.N. et al. (1999). Survey of bloodstream infectious due to Gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada and Latin American for the SENTRY Antimicrobial Surveillance. **Clin. Infect. Dis.** 29:595-607.
52. DiPersio, J.R. ; Deshpande, L.M. ; Biedenbach, D.J. ; Toleman, M.A. ; Walsh, T.R. ; Jones, R.N. (2005). Evolution and dissemination of extended-spectrum  $\beta$ lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and molecular report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance program (1997-2003). **Diag. Microbiol. Infect. Dis.** 51:1-7.

53. Du Bois, S.K.; Marriot, M.S.; Amyes, S.G.B. (1995). TEM- and SHV- derived extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: relationship between selection, structure and function. **J. Antimicrob. Chemother.** 35:7-22.
54. Dzidic, S.; Bedeković, V. (2003). Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. **Acta. Pharmacol. Sin.** 24:519-526.
55. Eckert, C.; Gautier, V.; Saladin-Allard, M; Hidri, N.; Verdet, C.; Ould-Hocine, Z.; Barnaud, G.; Delile, F.; Rossier, A.; Lambert, T.; Philippon, A.; Arlet, G. (2004). Dissemination of CTX-M-type  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. **Antimicrob. Agents and Chemother** . 48:1249-1255.
56. Eisenstein, B.I.; Zaleznik, D.F. (2000). *Enterobacteriaceae*. In: Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R. (eds). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. 5<sup>th</sup> (ed). Vol 2. Philadelphia: Churchill Livingstone. pp.2294-2309.
57. Farmer, J.J., III. (2003). *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.O.; Tenover, J.C.; Tenover, F.C. (eds). Manual of clinical microbiology. 8<sup>th</sup> (ed). Vol 1. Washington: ASM Press. pp.636-653.
58. Farmer, J.J.; Davis, B.R.; Hickman-Brenner, F.W.; et al . (1985). Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.** 21:46-76.
59. Fernández-Rodríguez, A.; Canton, R.; Pérez-Díaz, J.C.; Martínez-Beltrán, J.; Picazo, J.J.; Baquero, F. (1992). Aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates harboring extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 36: 2536-2538.
60. Fevre, C.; Jbel, M.; Passet, V.; Weill, F. X.; Grimont, P.A.D.; Brisse, S. (2005). Six groups of the OXY  $\beta$ -lactamase evolved over millions of years in *Klebsiella oxytoca*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 49:3453-3462.
61. Flemming, P.C.; Goldner, M.; Glass, D.G. (1963). Observations on the nature, distribution, and significance of cephalosporinase. **Lancet**, i:1399-1401.



62. Freitas, A.L.P.; Machado, D.P.; Soares, F.S.C.; Barth, A.L. (2003). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella spp* and *Escherichia coli* obtained in a brazilian teaching hospital: detection, prevalence and molecular typing. **Braz. J. Microbiol.** 34:344-348.
63. Gailliot, O. ; Maruejouis, C. ; Abachin, E. ; Lecuru, F. ; Arlet, G. ; Simonet, M. ; Berche, P. (1998). Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. **J. Clin. Microbiol.** 36:1357-1360.
64. Galas, M.; Decousser, J-W.; Breton, N.; Godard, T.; Allouch, P.Y. ; Pina, P. ; Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (CoIBVH) Study Group. (2008). Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in France. **Antimicrob. Agents Chemother.** 52:786-789.
65. Gales, A. C.; Bolmström, A.; Sampaio, J.; Jones, R.N.; Sader, H.S. (1997). Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) isolated in Brazilian Hospitals. **Braz. J. Infect. Dis.** 1:196-203.
66. Garcia, D.O.; Doi, Y.; Szabo, D.; Adams-Haduch, J.M.; Vaz, T.M.I.; Leite, D.; Padoveze, M.C.; Freire, M.P., Silveira, F.P.; Paterson, D.L. (2008). Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.** 52:1790-1793.
67. Garner, J.S.; Jarvis, W.R.; Emori, T.G.; Hora, T.C.; Hughes, J.M. (1988). CDC definitions isolated for nosocomial infections. **Am. J. Infect. Control.** 16:128-140.
68. Gheldre, Y.D.; Avesani, V.; Berhin, C.; Delmée, M.; Glupczynski, Y. (2003). Evaluation of oxoid combination discs for detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **J. Antimicrobial. Chemother.** 52:591-597.
69. Giakkoupi, P.; Tzouvelekis, L.S.; Tsakris, A.; Loukova, V.; Tzelepi, E. (2000). IBC-1, a novel integron-associated class A  $\beta$ -lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. **Antimicrob. Agents Chemother.**

44:2247-2253.

70. Goldstein, F.W. (2000) The Multicentre Study Group. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections in France. **Eur. J. Clin. Infect. Dis.** 19:112-117.
71. Gupta, A. (2002). Hospital-acquired infections in the neonatal intensive care unit *Klebsiella pneumoniae*. **Semin. Perinatal.** 26:340-345.
72. Henderson, D.K.; Fishman, N. (2007). Prevention and control of hospital-acquired infections. In: Goldman, L. (Ed.). **Cecil Medicine.** 23<sup>th</sup> ed.
73. Hibbert-Rogers, L.C. ; Heritage, J.; Gascoyne-Binzi, D.M.; Hawkey, P.M.; Todd, N.; Lewwis, I.J.; Bailey, C. (1995). Molecular epidemiology of ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* from patients on a paediatric oncology ward. **J. Antimicrob. Chemother.** 36:65-82.
74. Honoré, N; Nicolas, M.H.; Cole, S.T. (1986). Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. **EMBO J.** 5:3709-3714.
75. Hryniewicz, K.; Szczypa, K.; Sulikowska, A. et al. (2001). Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from urinary tract infections in Poland. **J. Antimicrob. Chemother.** 47:773-780.
76. Izard, D.; Ferragut, C.; Gavini, F.; Kersters, K.; De Ley, J.; Leclerc, H. (1981). *Klebsiella terrigena*, a new species from soil and water. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 31:116-127.
77. Jacoby, G.A. (2006).  $\beta$ -lactamase nomenclature. **Antimicrob. Agents Chemother.** 50:1123-1129.
78. Jacoby, G.A.; Munoz-Price, L.S. (2005). The new  $\beta$ -lactamases. **N. Engl. J. Med.** 352:380-391.

79. Jacoby, G.A.; Walsh, K.E.; Walker, V.J. (2006). Identification of extended-spectrum, AmpC, and carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by disk tests. **J. Clin. Microbiol.** 44:1971-1976.
80. Jenney, A.W.; Clements, A.; Farn, J.L.; Wijburg, O.L.; McGlinchey, A.; Spelman, D.W.; Pitt, T.L.; Kaufmann, M.E.; Liolios, L.; Moloney, M.B.; Wesselingh, S.L.; Strugnell, R.A. (2006). Seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae* in an Australian tertiary hospital and its implication for vaccine development. **J. Clin. Microbiol.** 44:102-107.
81. Jones, R.N. (1998). Important era emerging  $\beta$ -lactamases-mediated resistance in hospital-based pathogens: the AmpC enzymes. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.** 31:461-466.
82. Jumaa, P.; Chattopadhyay, B. (1992) Pseudobacteraemia with multiresistant *Klebsiella pneumoniae* resulting from contamination from the blood gas machine on a neonatal unit. **J. Hosp. Infect.** 22:251-255.
83. Kac, G.; Podglajen, I.; Vaupré, S.; Colardelle, N.; Buu-Hoï, A.; Gutmann, L. (2004). Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamses-producing *Enterobacteriaceae* isolated from environmental and clinical specimens in a cardiac surgery intensive care unit. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** 25:852-855
84. Klevens, R.M.; Edwards, J.; Richards, C.L.; Horan, T.C.; Gaynes, R.P.; Pollack, D.A.; Cardo, D.M. (2007). Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. **Public Health Reports.** 122: 160-166.
85. Knothe, H.; Shah, P.; Kramery, V.; Antal, M.; Mitsuhashi, S. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection.** 11:315-317.
86. Kiffer, C.; Hsiung, A.; Oplustil, C.; Sampaio, J.; Sakagami, E.; Turner, P.; Mendes, C.; MYSTIC Brazil Group. (2005). Antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria in brazilina hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. **Bras. J. Infect. Dis.** 9:216-224.
87. Ko, W-C.; Patersen, D.L; Sagnimesi, A,j; Hansen, D.S.; Gottberg, A,V.; Mohapatra, S.;

- Casellas, J.M.; Goossens, H.; Mulazimoglu, L.; Trenholme, G.; Klugman, K.P.; McCormack, J. G.; Yu, V. L. (2002). Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. **Emerg. Infect. Dis.** 8:160-166.
88. Koh, T.H.; Babini, G.S.; Woodford, N.; Sng, L.H.; Hall, L.M.C.; Livermore, D. (1999). Carbapenem-hydrolysing IMP-1  $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Singapore. **Lancet.** 253:2162.
89. Kristóf, K.; Szabó, D.; Marsh, J.W.; Cser, V.; Janek, L.; Rozgonyi, F.; Nobilis, A.; Nagy, K.; Paterson, D.L. (2007). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. In a neonatal intensive care unit: risk factors for the infection and the dynamics of the molecular epidemiology. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 26:563-570.
90. Lavigne, J-P.; Marchandin, H.; delmas, J. ; Moreau, J. ; Bouziges, N. ; Lecaillon, E. ; Cavalie, L. ; Jean-Pierre, H. ; Bonnet, R. ; Sotto, A. (2007). CTX-M  $\beta$ -lactamases-producing *Escherichia coli* in French hospitals: prevalence, molecular epidemiology, and risk factors. **J. Clin. Microbiol.** 45:620-626.
91. Lescure, F.X.; Eveillard, M.; Douadi, Y.; Eb, F. (2001). Community-acquired multiresistant bacteria: an emerging problem ?. **J. Hosp. Infect.** 49:149-151.
92. Lemozy, J.; Sitor, D.; Chanal. C.; Heu, C.; Lábia, R.; Dabernat, H.; Sitot, J. (1995). First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT)  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strains. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44:2709-2714.
93. Lewis, J.S.; Herrera, M.; Wickers, B.; Patterson, J.E.; Jorgensen, J.H. (2007). First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. **Antimicrob. Agents Chemother.** 51:4015-4021.
94. Lindberg, F.; Normark, S. (1986). Contribution of chromosomal  $\beta$ -lactam resistance in enterobacteria. **Infect. Dis.** 8: 292-304.
95. Livermore, D.M. (1991). Mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. **Scand. J. Infect. Dis.** 78: 7-16.

96. Livermore, D.M. (1995).  $\beta$ -lactamase in laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbiol. Rev.** 8:557-584.
97. Livermore, D.M.; Canton, R.; Gniadkowski, M.; Nordmann, P.; Rossolini, G.M.; Arlet, G. Ayala, J.; Coque, T.M.; Kern-Zdanowicz, I.; Luzzaro, F.; Poirel, L.; Woodford, N. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. **J. Antimicrob. Chemother.** 59:165-174.
98. Livermore, D.M. (2008). Defining an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. **Clin. Microbiol. Infect.** 14:3-10.
99. Luzzaro, F.; Mezzatesta, M.; Mugnaioli, C.; Perilli, M.; Stefani, S.; Amicosante, G.; Rossolini, G.M.; Toniolo, A. (2006). Trends in production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. **J. Clin. Microbiol.** 44:1659-1664.
100. Matsumoto, Y.; Inoue, M. (1999). Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A  $\beta$ -lactamase from *Enterobacter cloacae*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43:307-313.
101. Minarini, L.A.; Gales, A.C.; Palazzo, I.C.; Darini, A.L. (2007). Prevalence of community-occurring extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Curr. Microbiol.** 54:335-341.
102. McManus, M.C. (1997). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **Am. J. Health-Syst. Pharm.** 54:1420-33.
103. Martínez, J.; Martínez, L.; Rosenblueth, M.; Silva, J.; Martinez-Romero, E. (2004). How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **Int. Microbiol.** 7:261-267-
104. Matthew, M. (1979). Plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. **J. Antimicrob. Chemother.** 5:349-358.
105. Medeiros, A.A. (1997). Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by

- generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. **Clin. Infect. Dis.** 24:S19-45.
106. Mena, A.; Plasencia, V.; García, L.; Hidalgo, O.; Ayestarán, J.I.; Alberti, S.; Borrell, N.; Pérez, J.L.; Olovier, A. (2006). Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. **J. Clin. Microbiol.** 44:2831-2837.
107. Mendonça, N.; Leitão, J.; Manageiro, V.; Ferreira, E.; the Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal, Caniça, M. (2007). Spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. **Antimicrob. Agents Chemother.** 51:1946-1955.
108. Miranda, G.; Castro, N.; Leños, B.; Valenzuela, A.; Garza-Ramos, U.; Rojas, T.; Solórzano, F.; Chihu, L.; Silva, J. (2004). Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a mexican pediatric hospital. **J. Clin. Microbiol.** 42:30-35.
109. Morosini, M-I; García-Castilhos, M.; Coque, T.M.; Valverde, A.; Novais, A.; Loza, E.; Baquero, F.; Cantón, R. (2006). Antibiotic coresistance in extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and in vitro activity of tigecycline. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 50:2695-2699.
110. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2004). Approved Standards M2-A8 and M7-A6: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fourteenth Information Supplement. Wayne, PA, pp 161.
111. Nijssen S.; Klorijn, A.; Top, J.; Willems, R.; Fluit, A.; Bonten, M. (2005). Unnoticed spread of integron-carrying *Enterobacteriaceae* in intensive care units. **Clin. Infect. Dis.** 45:1-9.
112. NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance). (2002). National Nosocomial Infections Surveillance System report, data summary from January 1992 to June 2002, issued August 2002. **Am. J. Infect. Control.** 30:458-475.

113. Odeh, R.; Klelar, S.; Hujer, A.M.; Bonomo, R.A.; Schreckenberger, P.C., Quinn, J.P. (2002). Broad resistance due to plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*. **Clin. Infect. Dis.** 35:140-145.
114. Padilha, G.; Costa, S.O.P. (2004). **Genética bacteriana**. In: Trabulsi, L.R.; Alterthum, F. (Ed.). **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu. pp.37-49.
115. Pallecchi, L.; Bartoloni, A.; Fiorelli, C.; Mantella, A.; Maggio, T. Di; Gamboa, H.; Gotuzzo, E.; Kronvall, G.; Paradisi, F.; Rossolini, G.M. (2007). Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. **Anticancer Agents. Chemother.** 51:2720-2725.
116. Paterson, D.L.; Bonomo, R.A. (2005). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. **Clin. Microbiol. Rev.** 18:657-686.
117. Paterson, D.L.; Hujer, K.M.; Hujer, A.M.; Yeisser, B.; Bonomo, M.D.; Rice, L.B.; Bonomo, R.A. (2003). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type  $\beta$ -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47:3554-3560.
118. Paterson, D.L.; Ko, W-C.; Gottberg, A.Von; Mohapatra, S.; Casellas, J.M.; Goossens, H.; Mulazimoglu, L.; Trenholme, G.; Klugman, K.P.; Bonomo, R.A.; Rice, L.B.; Wagener, M.M.; McCormack, J.G.; Yu, V.L. (2004). International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in nosocomial infections. **Ann. Intern. Med.** 140:26-32
119. Pereira, A.S.; Filho, J.R.C.; Tognim, M.C.B.; Sader, H.S. (2003). Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido. **J. Brás. Patol. Méd. Lab.** 39:45-50.
120. Pereira, C.R. (2004). Assistência médica fora de hospitais para pacientes agudos. In: Coutinho, A.P.; Pereira, C.R.; Feijó, R.D.F. (Coord.). **Prevenção e controle de infecções associadas à assistência médica extra-hospitalar: ambulatórios, serviços, diagnósticos, assistência domiciliar e serviços de longa permanência**. Associação Paulista de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar, APECIH, São Paulo, pp 1-4.

121. Pessoa-Silva, C.L.; Moreira, B.M.; Almeida, V.C.; Flannery, B.; Lins, M;C.A.; Sampaio, J.L.M.; Teixeira, L.M.; Miranda, L.E.V.; Riley, L.W.; Gerberding, J.L.. (2003). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: risk factors for infection and colonization. **J. Hosp. Infect.** 53:198-206.
122. Peterson, L.R; Noskin, G.A. (2001). New technology for detecting multidrug-resistant pathogens in the clinical microbiology laboratory. **Emerg. Infect. Dis.** 7: 123-129.
123. Perez, F.; Endimiani, A.; Hujer, K.M.; Bonomo, R.A. (2007). The continuing challenge of ESBLs. **Curr. Opin. Pharmacol.** 7:459-469.
124. Pfaller, M.A. (2001). Molecular approaches to the diagnosis and management of infectious diseases. Practical and cost implications. **Emerg. Infect. Dis.** 7:212-318.
125. Pfaller, M.A.; Herwaldt, L.A. (1997). The clinical microbiology laboratory and infection control: emerging pathogens, antimicrobial resistance, and new technology. **Clin. Infect. Dis.** 25:858-870.
126. Philippon, A.; Arlet, G.; Jacoby, G.A. (2002). Minireview. Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 46:1-11.
127. Philippon, A.; Arlet, G.; Lagrange, P.H. (1994). Origin and impact of plasmid-mediated of extended spectrum  $\beta$ -lactamases. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 13:17-29.
128. Pitout, J.D.D.; Church, D.L.; Gregson, D.B.; Chow, B.L.; McCracken, M.; Mulvey, M.R.; Laupland, K.B. (2007). Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the Calgary health region: emergence of CTX-M-15-producing isolates. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 51:1281-1286.
129. Podschun, R.; Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.** 11: 598-603.





- Escherichia coli* in nonhospitalized patients. **J. Clin. Microbiol.** 42:1089-1094.
139. Ronald, A. R.; Ludwig, E. (2001). Urinary tract infection in adults with diabetes. **Int. J. Antimicrob. Agents** 17:287-292.
140. Ronald, A.R.; Nicolle, L.E.; Stamm, J.; Krieger, J.; Warren, A.; Scharffer, A.; Naber, K.G.; Hooton, T.M.; Johnson, J.; Chambers, S.; Andriole, V. (2001). Urinary tract infection in adults: research priorities and strategies. **Int. J. Antimicrob. Agents** 17:343-348.
141. Rosen, D.A.; Pinkner, J.S.; Jones, J.M.; Wlaker, J.N.; Clegg, S.; Hultgren, S.J. (2008). Utilization of an intracellular bacterial community pathway in *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection and the effect of fimK on type 1 pilus expression. **Infect. Immun.** 76:3337-3345.
142. Rossi, F.; Andreazzi, D.B. (2005). **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma.** São Paulo: Atheneu. 118p.
143. Sader, H.S. (2000). Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. **Braz. J. Infect. Dis.** 49:91-99.
144. Sader, H.S. (2005). Novas perspectivas na terapia antimicrobiana. **Prática Hospitalar** 41: cccc
145. Sader, H.S.; Gales, A.C.; Pfaller, M.A.; Mendes. R.E.; Zoccoli, C.; Barth, A.; Jones, R.N. (2001). Pathogens frequency and resistance patterns in brazilian hospitals: summary of results from three years of SENTRY antimicrobial surveillance program. **Braz. J. Infect. Dis.** 59:200-214.
146. Sader, H.S.; Mendes, R.E.; Gales, A.C. (2001). Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros – resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. **J. Pneum.** 27: 59-67.
147. Sader, H.S.; Pfaller, M.A.; Hollis, R.J. (1995). The use of molecular techniques in the epidemiology and control of hospital infectious. **Clin. Lab. Med.** 15:407-431.

148. Sagasaki, R.; Tamura, K.; Kosako, Y.; Yoshizaki, E. (1989). *Klebsiella ornithinolytica* sp nov., formerly known as ornithine-positive *Klebsiella oxytoca*. **Curr. Microbiol.**, 2:181-185.
149. Sanders, C.C.; Sanders, W.E. (1992).  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria: new challenges for new drugs. **Clin. Infect. Dis.** 14:1089-1099.
150. Santos, A.A.M. (2006). O modelo brasileiro para o controle das infecções hospitalares: após vinte anos de legislação, onde estamos e para onde vamos? Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Infectologia e Medicina Tropical. Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.
151. Schwaber, M.J.; Navon-Venezia, S.; Kaye, K.S.; Ben-Ami, R.; Scharz, D.; Carmeli, Y. (2006). Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 50:1257-1262.
152. Schembri, M.A.; Blom, J.; Krogfelt, K.A.; Klemm, P. (2005). Capsule and fimbriae interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.** 73:4626-4633.
153. Schwaber, M.J.; Navon-Venezia-S.; Schwartz, D.; Carmeli, Y. (2005). High levels of antimicrobial coreistance among extended-spectrum- $\beta$ -lactamases-producing *Enterobacteriaceae*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 49:2137-2139.
154. Senda, K.; Arakawa, Y.; Ichiyama, S.; Nakashima, K.; Ito, H.; Ohsuka, S.; Shimokata, K.; Kato, N.; Ohta, M. (1996). PCR detection of metallo- $\beta$ -lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum  $\beta$ -lactams. **J. Clin. Microbiol.** 34:2909-2913.
155. Shlaes, D.M.; Gerding, D.N.; John, J.F.; Craig, W.A.; Bornstein, D.L.; Duncan, R.A.; Eckman, M.R.; Farrer, W.E.; Greene, W.H.; Lorian, V.; Levy, S.; McGowan, J.E.; Paul, S.M.; Ruskin, J.; Tenover, F.C.; Watanakunakorn, C. (1997). Society for Healthcare Epidemiology of American and Infectious Disease Society of America Joint

- Committee on the prevention of antimicrobial resistance: guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** 18:275-291.
156. Slama, T.G. (2008). Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. **Critical Care**, 12:4.
157. Silva, J.; Aguilar, C.; Ayala, G. et al. (2000). TLA-1: a new plasmid-mediated inducible class A  $\beta$ -lactamase from *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44:997-1003.
158. Sirot, D.; Sirot, J.; Labia, R.I; Morand, P.; Courvalin, A.; Darfeuille-Michaud, R.; Perroux, R.; Cluzel, R. (1987). Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel  $\beta$ -lactamase. **J. Antimicrob. Chemother.** 20:323-334.
159. Soll, D.R.; Lockhart, S.R.; Pujol, C. (2003). **Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms**. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Tenover, F.C.; Tenover, F.C.; Tenover, F.C. (Eds). **Manual of clinical microbiology**. 8<sup>th</sup> ed, Washington, DC: American Society for Microbiology. pp139-161.
160. Stamm, W.E.; Norrby, R. (2001). Urinary tract infections: disease panorama and challenges. **J. Infect. Dis.** 181:1-S4.
161. Steward, C.D.; Rasheed, K.; Hubert, S.K.; Biddle, J.W.; Raney, P.M.; Anderson, G.J.; Williams, P.P.; Brittain, K.L.; Oliver, A.; McGowan, J.E.; Tenover, F.C. (2001). Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratory using the national committee for clinical laboratory standards extended-spectrum  $\beta$ -lactamase detections methods. **J. Clin. Microbiol.** 39:2864-2872.
162. Tavares, W. (2002). Manual de antibióticos e quimioterápicos antinfeciosos. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1216 p.
163. Tenover, F.; Arbeit, R.; Goering, R.; Mickelsen, P.A.; Murray, B.E.; Persing, D.H.; Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol.**

33:2233-2239.

164. Tenover, F.C. (2001). Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. **Clin. Infect. Dis.**, 33:108-115.
165. Tenover, F.C.; Raney, P.M.; Williams, P.P., Rasheed, K.; Biddle, J.W.; Oliver, A.; Fridkin, S.K.; Jevitt, L.; McGowan, J.E. (2003). Evaluation of the NCLLS extended-spectrum  $\beta$ -lactamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during Project ICARE. **J. Clin. Microbiol.** 41: 3142-3146.
166. Thompson, K.S. (2001). Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. **Emerg. Infect. Dis.** 7:333-336.
167. Tosin, I.; Silbert, S.; Sader, H.S. (2003) The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among gram-negative rods in brazilian hospitals. **Bras.J. Infect.Did.** 7:360-369.
168. Villegas, M.V.; Kattan, J.N.; Quinteros, M.G.; Casellas, J.M. (2008). Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in South America. **Clin. Microbiol. Infect.** 14:154-158.
169. Waley, S.G. (1987). An explicit model for bacterial resistance: application to  $\beta$ -lactam antibiotics. **Microbiol. Sci.** 4:143-146.
170. Weber, S.; Pfaller, M.A.; Herwaldt, L.A. (1997). Role of molecular epidemiology in infection control. **Infect. Dis. Clin. North. Am.** 11:257-278.
171. Weldhagen, G.F.; Poirel, L.; Nordmann, P. (2003). Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47:2385-2392.
172. Wilson, W.R.; Henry, N.K. (2004). Infecções do trato urinário. In: Wilson, W.R.; Sande, M.A.; Henry, N.K.; Drew, W.L.; Relman, D.A.; Steckelberg, J.M.; Gerberding, J.L. (Eds). **Doenças infecciosas. Diagnóstico e tratamento.** Porto Alegre: Artmed. pp 236-246.

173. White, A.R. (2008). The British Society for Antimicrobial Chemotherapy Resistance Surveillance project: a successful collaborative model. **J. Antimicrob. Chemother.** 62:3-14.
174. Winn, W.C.Jr; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger, P.C.; Woods, G. (2006). Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Chapter 6 The *Enterobacteriaceae* pp.211-302
175. Winokur, P.L.; Canton, R.; Casellas, J.M.; Casellas, J.M.; Legakis, N. (2001). Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum  $\beta$ -lactamases phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. **Clin. Infec. Dis.** 32:94-103.
176. World Health Organization (WHO) (1978). Surveillance for the prevention and control of health hazards due to antimicrobial agent resistant enterobacteria: report of a WHO meeting. **WHO Technical Report**, 624:1-51.
177. Wiegand, I.; Geiss, H.K.; Mack, D.; Sturenburg, E.; Seifert, H. (2007). Detection of extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. **J. Clin. Microbiol.** 45:1167-1174.
178. Woodford, N.; Ward, M.E.; Jaufmann, M.E.; Turton, J.; Fagan, E.J.; James, D.; Johnson, A.P.; Pike, R.; Cheasty, W.M.; Pearson, A.; Harry, S.; Laech, J.B.; Loughrey, A.; Lowes, J.A.; Warren, R.E.; Livermore, D.M. (2004). Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the UK. **J. Antimicrob. Chemother.** 54:735-743.
179. Wu, T-L.; Chia, J-H.; Su, L-H. ; Chu, C.; Chiu, C-H. (2003). Dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Enterobacteriaceae* in pediatric intensive care units. **J. Clin. Microbiol.** 41:4836-4838.

180. Yeh, K-M.; Kurup, A.; Siu, L.K.; Koh, Y.L.; Fung, C-P.; Lin, J-C.; Chen, T-L.; Chang, F-Y.; Koh, T-H. (2007). Capsular serotypes K1 or K2, rather than *magA* and *rmpA*, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. **J. Clin. Microbiol.** 45:466-471.
181. Yu, V.L.; Hansen, D.S.; Ko, W.C.; Sagnimeni, A.; Klugman, K.P.; von Gottberg, A.; Goossens, H.; Wagener, M.M.; Benedi, V.J.; International *Klebsiella* Study Group. (2007). Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical bloodstream infections. **Emerg. Infect. Dis.** 13: 276-281.
182. Yong, D.; Shin, J.H.; Kim, S et al., (2003). High prevalence of PER-1 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Acinetobacter* spp. In Korea. **Antimicrob. Agents. Chemother.** 47:1749-1751.

## ANEXO 1

### Formulário de estudos dos pacientes provenientes do Hospital Geral

Data da consulta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ NÚMERO DA AMOSTRA: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ ESBL (+/--): \_\_\_\_\_

Registro: \_\_\_\_\_ Pcte hospitalizado: (sim/não): \_\_\_\_\_

Procedência (cidade que mora): \_\_\_\_\_

Unidade de Internação: ( ) UTI adulto ( ) UTI Pediátrica ( ) UTI Neonatal  
( ) Unidade Clínico-Cirúrgica ( ) Unid. Intern Pediatrica ( ) Unid Urgência e emergencia  
( ) Centro Obstétrico ( ) Centro Cirúrgico ( ) Unid. Int. Ginecol. ( ) Oncologia  
( ) Gênero ( ) masculino ( ) feminino

Data de nascimento: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Data internação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Data alta: \_\_\_\_/\_\_\_\_ Motivo inter. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Data alta: \_\_\_\_/\_\_\_\_ Motivo inter. \_\_\_\_\_

Data do exame positivo para *E. coli* ou *Klebsiella* spp: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Material clinico: \_\_\_\_\_

Diferença entre a data da internação e do exame: (não preencher se for recém-nascido).  
Mais que 48 horas ( ) Sim ( ) Não

Procedência do paciente:  
( ) Residência Outro hospital Qual ? \_\_\_\_\_  
( ) Hospitalização prévia Data de internação naquele hospital: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Data de alta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
( ) Casa de saúde: Qual ? \_\_\_\_\_ Data de internação : \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Conclusão: **Paciente considerado hospitalizado**

( ) Mais de 48 horas de internação no momento do isolamento da amostra  
( ) Menos de 48 horas de internação com  
( ) Hospitalização prévia de 2 semanas ou transferência de hospital ou casa de saúde  
( ) Paciente considerado não-hospitalizado  
( ) Menos de 48 horas de internação no momento do isolamento da amostra desde que não tenha sido previamente hospitalizados há um mês



## ANEXO 2

### Formulário de estudo para recém-nascido

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Peso ao nascimento: \_\_\_\_\_

Procedência:

Nascimento neste hospital

Outro hospital Qual ? \_\_\_\_\_

Data de internação naquele hospital: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Residência

Idade gestacional:

Classificação:  Pequeno para idade gestacional  
 Adequado para idade gestacional  
 Grande para idade gestacional

Apgar 1º minuto: \_\_\_\_\_

5º minutos: \_\_\_\_\_

Doença de base:

Infecção:

Materna

Recém-nascido

<input type="checkbox"/>	Herpes simples
<input type="checkbox"/>	Toxoplasmose
<input type="checkbox"/>	Rubéola
<input type="checkbox"/>	Citomegalovírus
<input type="checkbox"/>	Sífilis

<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>

Conclusão:  Paciente considerado hospitalizado

Paciente considerado não-hospitalizado

## ANEXO 3



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

Caxias do Sul, 25 de maio de 2005

Senhora Professora:

Informamos que o projeto "Caracterização Genotípica de Escheria Coli e Klebsiella SPP Produtoras de Betalactamase de Espectro Ampliado em Caxias do Sul", proposto e coordenado por V. Sa., foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Caxias do Sul, em reunião realizada no dia 12 de maio de 2005 e foi aprovada e está apta a ser desenvolvida. Porém recomendamos que: não poderá ter contato com o paciente, caso contrário o pesquisador deverá elaborar e encaminhar ao CE/UCS para avaliação o "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido".

Colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Celso Piccoli Coelho  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

Uma: Sra.  
Prof.ª Cláudia Wolheim  
DCBM/CCBS