

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**DETECÇÃO DE BETA-LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO EM
MEMBROS DA FAMÍLIA *ENTEROBACTERIACEAE***

LILIAN DE OLIVEIRA RODRIGUES

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Câmpus de Araraquara – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas (Área de Microbiologia Clínica).

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto

ARARAQUARA - SP

2005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Clínica, Centro de Referência Diagnóstica (CRD) do Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC), da Unidade Auxiliar Integrada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, campus de Araraquara-Unesp, com apoio da CAPES, através da concessão da bolsa de mestrado e PADC/FCF com a reserva técnica.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais David Rodrigues e Amália Marlene de Oliveira Rodrigues que se abdicaram de seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Vocês são referenciais de amor incondicional, honestidade, virtude e companheirismo. São meus exemplos de vida, pois exalam o “perfume de Cristo”!

Ao meu namorado Rones José da Silva que esteve presente em todas as minhas dificuldades, ouviu meus desabafos e me deu o suporte para seguir em frente.

Obrigada, você é muito importante pra mim!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof. Dra. Elisabeth Loschagin Pizzolitto pela disposição em me orientar abraçando a idéia deste trabalho comigo e me dando a oportunidade de crescimento. Obrigada pelas palavras amigas nos momentos difíceis e pelo estímulo e incentivo. Você é um exemplo de profissionalismo, competência e segurança e isso permanecerá sempre comigo!

AGRADECIMENTOS

A Deus “porque tu és minha rocha e a minha fortaleza, por causa do teu nome, tu me conduzirás e me guiarás” Sl 31:4.

Aos meus irmãos Janine, Cristina e Henrique por me fazer acreditar no meu sonho e me incentivar nessa escolha.

À minha avó Cleusa pelo amor, carinho, orações intercedidas a mim. Muito obrigada por me ensinar os caminhos para alcançar a vitória.

Aos meus familiares que mesmo distantes sempre me apoiaram e incentivaram a fazer o mestrado.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto pela competência e amor pela vida acadêmica que é um referencial para mim, pois ensinou-me a amar a microbiologia.

Aos professores Dr. Wilton Rogério Lustri, Dra. Izabel Yoko Ito, Dra Taís Maria Bauab pelas valiosas contribuições durante o Exame Geral de Qualificação e Dissertação de Mestrado para que o trabalho ficasse melhor

Aos voluntários que participaram deste trabalho de pesquisa, muito obrigada.

Aos funcionários, pós graduandos e estagiários do Setor de Microbiologia Clínica Adilson César de Abreu Bernardi, Benedita Reis de Abreu, Vânia Morena Cruzes, Gabriela Maria Pavan de Arruda Camargo, Anísio Storti, Elisabeth Eyko Aoki, Tatiane Kabeça, Douglas Silva e Silva pela colaboração profissional e pessoal.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela gentileza e atenção sempre que precisei.

Às funcionárias da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Cláudia Lúcia Molina, Laura Rosim e Sônia Ornellas Silva, por sempre estarem prontas a ajudar.

Aos funcionários do Centro de Referência Diagnóstica CRD-NAC que me receberam tão bem e sempre me apoiaram.

Aos amigos Alessandro Guerta Pires, Flávia Cristina Mascia Lopes, SamiYokoo pelo apoio e sempre prontos a ajudar.

À CAPES através da Pró reitoria da UNESP pela bolsa de estudos concedida.

Ao PADC/FCF pelo apoio financeiro sem o qual não seria possível a realização do trabalho.

A todos que contribuíram para que este trabalho se tornasse real, muito obrigada.

**“E, se clamares por inteligência, e por entendimento alçares a voz,
se buscares a sabedoria como a prata e como a tesouros
escondidos a procurares, então, entenderás o temor do Senhor e
acharás o conhecimento de Deus”. Pv. 2: 3-5**

RESUMO

Rodrigues, L. O. Detecção de beta-lactamase de espectro estendido em membros da família *Enterobacteriaceae*. 2005. 105f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2005).

A produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) em membros da família *Enterobacteriaceae* pode conferir resistência a cefalosporinas de amplo-espectro, aztreonam e penicilinas. Devido a esse fenômeno, a detecção exata dos produtores de ESBL é essencial para a seleção apropriada da antibioticoterapia. Para detectar a produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) em bacilos Gram-negativos, foi usado um teste de triagem com os discos de aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX) e ceftriaxona (CRO) sobre 300 cepas, das quais trinta e cinco eram suspeitas da presença de ESBL. A produção de ESBL foi demonstrada por três métodos fenotípicos confirmatórios de fácil utilização. Os três testes fenotípicos para confirmar a produção de ESBL incluíram o teste do sinergismo (*double disk*), E-test² ESBL e disco combinado. Os discos utilizados no teste do sinergismo e do disco combinado foram: aztreonam (30?g-ATM), cefotaxima (30?g-CTX), ceftazidima (30?g-CAZ), cefpodoxima (10?g-CPD) ceftriaxone (30?g-CRO) e amoxicilina+ácido clavulânico(30?g-AMC), cefotaxima+ácido clavulânico (30?g-10?g), ceftazidima+ácido clavulânico (30?g-10?g), cefpodoxima+ácido clavulânico (10?g-1?g). Para E-test foram utilizadas fitas contendo as cefalosporinas: ceftazidima *versus* ceftazidima/ácido clavulânico; cefotaxima *versus* cefotaxima/ácido clavulânico. Os testes fenotípicos confirmaram a presença de ESBL em cinco cepas de enterobactérias (1,66%). Todos os métodos

são de fácil execução, contudo o método do Etest requer experiência para interpretar os resultados. Os três testes oferecem uma solução viável para confirmar a produção de ESBL no laboratório clínico.

PALAVRAS-CHAVE: ESBL, beta lactamase de espectro estendido, *Enterobacteriaceae*, Etest, sinergismo, double-disk, disco combinado.

ABSTRACT

The production of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) in the members of the family *Enterobacteriaceae* can check resistance to cephalosporins of extended-spectrum, aztreonam and penicilins. Due to this phenomenon, the exact detection of the producers of ESBL are essential for the appropriate selection of antimicrobial therapy. To detect the production of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) in Gram-negative bacilli, a test of screening was used with the discs of aztreonam (ATM), ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX) e ceftriaxone (CRO) in 300 strains, of which thirty-five were suspicious of the presence of ESBL. The production of ESBL was demonstrated by three phenotypic methods confirmed of easy utilization. The three phenotypic tests to confirm the production of ESBL included the test of synergy (*double disk*), E-test² ESBL and combination disk. The disks used on the test synergy and the combination disk were: aztreonam (30?g-ATM), cefotaxime (30?g-CTX), ceftazidime (30?g-CAZ), cefpodoxime (10?g-CPD) ceftriaxone (30?g-CRO) e amoxicillin+clavulanic acid (30?g-AMC), cefotaxime+clavulanic acid (30?g-10?g), ceftazidime+clavulanic acid (30?g-10?g), cefpodoxime+clavulanic acid (10?g-1?g). For E-test, were utilized strips containing the cephalosporins: ceftazidime and ceftazidime/clavulanic acid; cefotaxime and cefotaxime/clavulanic acid. The phenotypic tests confirmed the presence of ESBL in five strains *Enterobacteriaceae* (1,66%). All of the methods are of easy execution; however, the method of Etest requires experiment to interpret the results. The three tests offer a viable solution to confirm the production of ESBL on a clinic laboratory.

KEY WORDS: ESBL, extended spectrum beta-lactamase, *Enterobacteriaceae*, Etest, synergy, double disk, combination disk.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Classificação das beta-lactamases.....	21
Tabela 2 -Interpretação dos resultados do E-test [®]	44
Tabela 3 -Idade dos pacientes.....	48
Tabela 4 -Porcentagem de cepas sensíveis/resistentes aos agentes antimicrobianos dos isolados de comunidade e hospital.....	49
Tabela 5 -Triagem de cepas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella</i> sp suspeitas de serem produtoras de ESBL.....	51
Tabela 6 -Triagem de cepas de membros <i>Enterobacteriaceae</i> suspeitas de serem produtoras de ESBL.....	52
Tabela 7 -Cepas de enterobactérias produtoras e não produtoras de ESBL verificado pelo método disco difusão (teste fenotípico confirmatório).....	53
Tabela 8 -Cepas de enterobactérias produtoras e não de ESBL, verificados pelo método E-test ESBL [®] (teste fenotípico confirmatório).....	57
Tabela 9 -Cepas de enterobactérias produtoras e não de ESBL verificado pelo método Discos Combinados (teste fenotípico confirmatório).....	58
Tabela 10 -Medida dos halos dos antimicrobianos para 5 cepas produtoras de ESBL.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Gabarito de comparação mostrando as unidades formadoras de colônias por mL de urina.....	37
Figura 2- Representação esquemática do procedimento de identificação de bacilos Gram-negativos através do Sistema BBL CRYSTAL.....	38
Figura 3- Teste do disco aproximação (<i>double disk</i>): observação de sinergismo entre os antimicrobianos.....	41
Figura 4- Teste do disco aproximação (<i>double disk</i>): observação de sinergismo entre os antimicrobianos.....	41
Figura 5- Configuração e interpretação das fitas de E-test [®] ESBL.....	43
Figura 6- E-test: fita impregnada com ceftazidima em um extremo e, no outro, ceftazidima + ácido clavulânico –ESBL positivo.....	43
Figura 7- E-test: fita impregnada com ceftazidima em um extremo e, no outro, ceftazidima + ácido clavulânico –ESBL negativo.....	44
Figura 8- Discos combinados.....	45
Figura 9- Teste com discos combinados beta-lactâmico/inibidor de beta-lactamase e disco do beta-lactâmico não combinado.....	46
Figura 10- Foto ilustrativa de produção de ESBL em cepa estudada de <i>Klebsiella pneumoniae</i> pelo método disco difusão.....	54
Figura 11- Foto ilustrativa de produção de ESBL em cepa estudada de <i>Enterobacter cloacae</i> pelo método disco difusão.....	54
Figura 12- Foto ilustrativa de produção de ESBL em cepa estudada de <i>Klebsiella pneumoniae</i> pelo método disco difusão.....	55

- Figura 13-** Esquema representativo da elipse deformada nas duas fitas (ceftazidima/ceftazidima+ácido clavulânico e cefotaxima / cefotaxima + ácido clavulânico) caracterizando ESBL positivo.....55
- Figura 14-**Foto ilustrativa do método Etest[®] demonstrando a produção de ESBL por *Serratia marcescens*.....56
- Figura 15-**Foto ilustrativa do método Etest[®] demonstrando a produção de ESBL por *Enterobacter cloacae*.....56
- Figura 16-**Foto ilustrativa do método do disco combinado mostrando a produção de ESBL por *Klebsiella pneumoniae*.....59
- Figura 17-** Foto ilustrativa do método do disco combinado mostrando a produção de ESBL por *Serratia marscescens*.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC	Amoxicilina+ácido clavulânico
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
ATM	Aztreonam
BHI	Infusão Cérebro Coração
CAZ	Ceftazidima
CFL	Cefalotina
CFO	Cefoxitina
CFZ	Cefazolina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLED	Cistina Lactose Eletrólito Deficiente
CLO	Cloranfenicol
CPD	Cefpodoxima
CPM	Cefepime
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
CT	Cefotaxima
CTL	Cefotaxima+ácido clavulânico
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
GEN	Gentamicina
I	Indeterminado
IPM	Imipenem

KAN	Kanamicina
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NAL	Ácido nalidíxico
NET	Netilmicina
NIT	Nitrofurantoína
OFX	Ofloxacina
PIP	Ácido pipemídico
R	Resistente
SIM	Sulfeto, Indol, Motilidade
SHV	Sulphydryl Variable
SUT	Sulfametoxazol-trimetoprim
TEM	Temoniera
TET	Tetraciclina
TOB	Tobramicina
TRI	Trimetoprim
TZ	Ceftazidima
TZL	Ceftazidima+ácido clavulânico
° C	Graus Celsius
µg	Microgramas

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-INTRODUÇÃO.....	19
2-OBJETIVOS.....	28
2.1-Objetivos gerais.....	28
2.2-Objetivos específicos.....	28
2.2.1-Triagem presuntiva de cepas potencialmente produtoras de ESBL.....	28
2.2.2- Testes confirmatórios de produção de ESBL.....	28
3-MATERIAL E MÉTODO.....	29
3.1-Materiais.....	29
3.1.1- Cepas de bacilos Gram-negativos.....	29
3.1.2- Discos de antibióticos Cecon [?]	29
3.1.3- Discos de antibióticos OXOID.....	29
3.1.4- Fitas E-test [?]	30
3.1.5- Meios de cultura.....	30
3.1.6- Sistema BBL CRYSTAL.....	34

3.1.7- Discos de antimicrobianos.....	35
3.1.8- Controle de qualidade.....	35
3.2-Métodos.....	36
3.2.1- Identificação de Bacilos Gram-negativos da família <i>Enterobacteriaceae</i> fermentadores da glicose.....	37
3.2.2-Desenvolvimento da pesquisa.....	39
3.2.2.1-Triagem das cepas produtoras de ESBL.....	40
3.2.2.2-Teste do sinergismo dupla difusão com discos	40
3.2.2.3-E-test ESBL.....	42
3.2.2.4-Discos combinados	45
4-RESULTADOS.....	47
5-DISCUSSÃO.....	63
6-CONCLUSÃO.....	72
7-REFERÊNCIAS.....	73
8-APÊNDICE.....	84
9-ANEXOS.....	95

1-INTRODUÇÃO

O surgimento das beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) entre membros da família *Enterobacteriaceae*, particularmente *Klebsiella* sp e *Escherichia coli*, foi notificado devido ao extenso uso de cefalosporinas de amplo espectro (GIBB & CRICHTON, 2000; GOMES & MARTINEZ, 2001; HERRERA & DUARTE, 1998; PELOSO et al., 2005; SHEHABI et al., 2000).

As ESBLs são enzimas, produzidas por muitas espécies bacterianas, capazes de hidrolisar e inativar, cefalosporinas de terceira geração, como a ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona, ou seja, os antimicrobianos que apresentam as estruturas oximino beta-lactâmicos, bem como aztreonam (monobactâmico) (EHRHARDT et al., 1999; MIMS et al., 1999; SALADIN et al., 2002; SANDERS et al., 1996; SILVA, 2000a; ZEMELMAN et al, 2001). Estas enzimas são responsáveis pela resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos beta-lactâmicos (JACOBY & MEDEIROS, 1991; PERILLI et al., 2002; QUINTEROS et al., 2003)

A primeira resistência aos antibióticos beta-lactâmicos foi verificada em uma cepa de *Escherichia coli* (BRADFORD, 2001; GALES et al., 2000). A resistência aos antibióticos beta-lactâmicos surgiu antes da liberação da penicilina, para uso médico, e o *Staphylococcus aureus* apresentou resistência à penicilina devido a penicilinase mediada por plasmídeo, a qual disseminou-se, rapidamente, para a maioria dos isolados clínicos de *S. aureus* e outras espécies de *Staphylococcus* (BRADFORD, 2001).

A primeira beta-lactamase descrita em 1960 foi observada em Gram-negativos. A enzima TEM-1 foi detectada em uma única espécie de *Escherichia coli*,

isolada de uma cultura de sangue de uma paciente Temoniera, na Grécia, daí a designação TEM. A enzima TEM-1 é mediada por plasmídeo e transposon, de disseminação fácil para outras espécies de bactérias (BRADFORD, 2001). Poucos anos após o primeiro isolamento, a beta-lactamase TEM-1 disseminou-se pelo mundo todo e é encontrada em diferentes espécies de membros da família *Enterobacteriaceae* (AMATO et al., 1994; APPLETON & HALL, 2001; COULDRON et al., 1997; ESSACK, 2000; JACOBY & HAN, 1996; MICROBIOLOGIA, 2002; MOOSDEN, 1997; PAGANI et al. 2002; PHILIPPON et al., 1994; REIS et al., 2002; SILVA, 1999; SILVA, 2000a,b).

Outra beta-lactamase comum mediada por plasmídeo, SHV-1, foi encontrada na *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. O nome desta beta-lactamase SHV deriva de uma propriedade bioquímica da enzima TEM, porém com variável sulfidril- *Sulphydryl Variable*, pela substituição de um ou mais aminoácidos (CARTER et al., 2000; COULDRON et al., 1997; HALL et al., 2002; JACOBY & HAN, 1996; NUESCH-INDERBINEN et al, 1997; PAGANI et al. 2002; PHILIPPON et al., 1994).

As ESBLs foram descobertas na Alemanha em 1983 em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, logo após a introdução das oximino cefalosporinas (cefotaxima e ceftazidima) e do monobactâmico (aztreonam) (JACOBY & CARRERAS, 1990; PHILIPPON et al., 1994). Subsequentemente foram isoladas na França em 1984 (TEM-3) e no mundo todo de muitas espécies da família *Enterobacteriaceae* (APPLETON & HALL, 2001; COULDRON et al., 1997; HALL et al., 2002; HONÓRIO et al., 2001; MOOSDEN, 1997; SILVA, 1999).

Quanto à classificação das beta-lactamases Bush e Singer (1989) agrupou as enzimas, correlacionando os substratos e perfis de inibição, da seguinte forma:

grupo 1- beta-lactamases não inibidas pelo ácido clavulânico, grupo 2- beta-lactamases de amplo espectro, geralmente inibidas pelo ácido clavulânico; grupo 3 – metalo-beta-lactamases que atuam sobre penicilinas, cefalosporinas e carbapenens; não inibidas pelo ácido clavulânico e grupo 4 – beta-lactamases que são inibidas pelo ácido clavulânico. Bush et al. (1995) propuseram outra classificação, devido ao crescente aparecimento de beta-lactamases e às diversidades (derivadas de TEM e derivadas de SHV). A nova classificação caracterizou as diferentes enzimas adicionando os subgrupos, como por exemplo, 2b, 2be, e, f (Tabela 1).

Tabela 1-Classificação das beta-lactamases

Grupo	Características	Enzimas/Microrganismos
1	cefalosporinases não inibidas pelo ácido clavulânico	Amp C
2a	penicilinas inibidas pelo ácido clavulânico	PCI (<i>S. aureus</i>)
2b	beta-lactamases inibidas pelo ácido clavulânico	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs)	TEM-3 a 28, SHV-2 a 6
2br	IRTs	TEM-30 a 36, TRC-1
2c	hidrolisam carbenicilinas	PSE-1, CARB-3
2d	hidrolisam cloxacilina	OXA-1, PSE-2
2e	cefalosporinases inibidas pelo ácido clavulânico	<i>P. vulgaris</i>
2f	hidrolisam carbapenems não metalo-beta-lactamases	IMI-1, NMC-A, Sme-1
3	metalo-beta-lactamases	L1
4	penicilinas não inibidas pelo ácido clavulânico	<i>P. cepacia</i>

Ambler (1980) propôs a classificação molecular, por meio da seqüência genética e definiu quatro classes designadas como A, B, C e D. Correlacionando a classificação fenotípica e a molecular proposta por Ambler, a literatura mostra que as ESBLs são enzimas classe A do grupo 2be (BRADFORD, 2001; PITOUT et al., 1997) e são altamente sensíveis aos inibidores de beta-lactamases como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (APPLETON & HALL, 2001; CARTER et al., 2000; COULDRON et al., 1997; ESSACK, 2000; HADZIYANNIS et al., 2000; HALL

et al., 2002; JACOBY & HAN, 1996; REIS et al., 2002; SHEN et al., 1999; SILVA, 1999; SILVA, 2000a).

Quanto ao grupamento molecular e funcional das ESBLs, a maioria das enzimas, contém a serina como sítio ativo e pertence a classe molecular A de Ambler. Estas enzimas apresentam massa molecular de aproximadamente 29.000 Da e de preferência hidrolizam as penicilinas (BRADFORD, 2001).

A classe das beta-lactamases inclui as enzimas TEM-1, SHV-1 e a penicilinase encontrada nos *Staphylococcus aureus*. O esquema molecular de classificação é ainda usado para caracterizar as beta-lactamases, contudo, este esquema não é suficiente para diferenciar os tipos de enzimas classe A. O esquema de classificação de Richmond e Sykes (1973), baseado no perfil do substrato e na localização do gene que codifica a beta-lactamase foi desenvolvido antes das ESBLs aparecerem e não permite a diferenciação entre as enzimas originais TEM e SHV e as enzimas derivadas. Bush et al. (1995) usaram as propriedades bioquímicas das enzimas, mais a estrutura molecular e a seqüência de nucleotídeos dos genes para colocar as beta-lactamases dentro de grupos funcionais. Os autores, usando este esquema, definiram as ESBLs como beta-lactamases capazes de hidrolizar as oximino-cefalosporinas, as quais são inibidas pelo ácido clavulânico e são colocadas no grupo funcional 2be (BRADFORD, 2001).

As ESBLs são codificadas em plasmídios os quais podem ser intercambiáveis entre espécies bacterianas (WINOKUR et al., 2001). Frequentemente, na mesma cepa, podem existir muitos plasmídios e múltiplas ESBLs (GRUTEKE et al., 2003; ROSSI & ANDREAZZI, 2004). Estes plasmídios podem codificar também outros genes de resistência antimicrobiana. Desta forma, é comum que microrganismos que expressam uma ESBL expressem co-resistência aos aminoglicosídeos,

tetraciclinas, cloranfenicol, trimetoprim, sulfametoxazol, e outros antimicrobianos (IMPLICAÇÕES TERAPÊUTICAS, 2002; SHEN et al., 1999).

Outros membros da família *Enterobacteriaceae* como *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* indol positivo e *Serratia* spp. são capazes de produzir diferentes tipos de beta-lactamases (AmpC), as quais conferem resistência às cefalosporinas de “terceira geração”, e não são inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam considerados inibidores de beta-lactamases (BLATT, 2002; COPAR et al., 2002; FARMER et al., 1999; FUNG-TOMC et al., 1996; LIVERMORE, 1995; NEUWIRTH et al., 1996). Este tipo de beta-lactamase é capaz de conferir resistência aos antibióticos beta-lactâmicos que contenham em sua molécula o grupo 7-alfa-metoxi (como a cefoxitina) ou o grupo oxamino (AMATO et al., 1994; GARCIA, 2003; LEE et al., 2001; MURRAY et al., 2000).

Outro tipo específico de beta-lactamase, a metalo beta-lactamase, capaz de hidrolisar os carbapenems (imipenem e meropenem), bem como os beta-lactâmicos de espectro estendido (HONÓRIO et al., 2001; SENDA et al., 1996; YONG et al., 2002) foi observado nos isolados de *Pseudomonas* sp. e *Serratia* sp. no Japão (SENDA et al., 1996) e de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, em hospitais onde o antimicrobiano era extensivamente usado (DUARTE et al., 2002; SILVA, 1999; WALSH et al., 2001). A diminuição da permeabilidade da membrana externa bacteriana e a hiperprodução de enzimas hidrolíticas têm gerado resistência em algumas espécies de enterobactérias. Estes dados alertam para a necessidade do uso racional dos antibióticos carbapenêmicos para prevenir o surgimento de novos microrganismos multirresistentes (GARCIA, 2003; SILVA, 1999; SIQUEIRA, 2002; THOMSON & MOLAND, 2001; WIEDEMANN, 1995a,b).

A produção de ESBL ocorre predominantemente em *Klebsiella* spp e em menor grau na *E. coli*, mas pode ser encontrada em vários patógenos clinicamente importantes sendo um problema significativo no tratamento de infecções graves por estes agentes (KATSANIS et al., 1994; KLIEBE et al., 1985; MEYER et al., 1993; ROSSI & ANDREAZZI, 2004; VERCAUTEREN et al., 1997). A predileção pelo gênero *Klebsiella* é explicada por estes microrganismos apresentarem fatores de sobrevivência maior do que outras enterobactérias em tecidos como a pele e superfícies, facilitando a disseminação da infecção de cepas com este tipo de resistência (ROSSI & ANDREAZZI, 2004).

Por razões não conhecidas ainda, *E.coli* produtoras de ESBL são identificadas com maior frequência em pacientes provenientes da comunidade, enquanto *Klebsiella pneumoniae* é mais prevalente em hospitais causando surtos endêmicos (PUJOL & PEÑA, 2003)

Em virtude das dificuldades técnicas de detecção, a prevalência de ESBL é, geralmente, subnotificada e permanece desconhecida na maioria dos laboratórios de rotina (ESSACK, 2000; HONÓRIO et al., 2001). Desse modo, a falha na identificação de ESBL através de testes de rotina pode levar a uma utilização imprópria de cefalosporinas de 3ª geração com conseqüente aumento de mortalidade (SILVA, 1999).

Devido a sua excelente atividade e tolerabilidade, os antibióticos beta-lactâmicos foram os mais utilizados até que a produção de ESBL, por patógenos comuns, se tornou generalizada. A prevalência crescente de cepas produtoras destas enzimas, tanto em patógenos da comunidade como, principalmente, em hospitais, representa um impacto significativo na prescrição de antimicrobianos (BLATT, 2002; MORALES, 2003).

Vários relatos mostraram falha terapêutica, quando infecções causadas por cepas produtoras de ESBL foram tratadas, com cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona, ceftazidima), mesmo quando os testes de sensibilidade/resistência apontaram essas cepas como sensíveis aos antimicrobianos utilizados. Assim, como houve evolução na produção de beta-lactamases com o uso de penicilinas e cefalosporinas, o uso clínico de diferentes antibióticos beta-lactâmicos também influenciou na evolução molecular das beta-lactamases (HONÓRIO et al., 2001; POOLE, 2002).

Pesquisas têm sido direcionadas para o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos, os quais resistem à hidrólise enzimática ou usam inibidores de beta-lactamases, como o ácido clavulânico ou sulfona penicilânica como droga coadjuvante (SANGUINETTI et al., 2003; SABATÉ et al., 2002).

Para o controle dos surtos hospitalares têm sido aplicadas medidas como restrição ao consumo de cefalosporinas de terceira geração, isolamento dos pacientes colonizados/infectados e orientação aos profissionais que lidam diretamente com os pacientes. A restrição de cefalosporinas de terceira geração relaciona-se em muitas ocasiões com o controle de surtos (SILVA, 1999).

Como a *Klebsiella pneumoniae* está entre os bacilos Gram-negativos mais resistentes, responsáveis por episódios de infecções em hospitais (SILVA, 1999), a disseminação desses microrganismos é muito dinâmica e a fim de contornar esse problema, foram introduzidas as cefalosporinas de quarta geração, cefepime e ceftazidime, os denominados novos antibacterianos, com atividade aumentada contra as bactérias produtoras de ESBL. O cefepime e os carbapenens são mais estáveis à hidrólise destas enzimas, ou seja, até o momento são menos sensíveis às ESBLs, mesmo quando produzidas em grandes quantidades, com a vantagem de

alcançarem imediatamente o espaço periplasmático, terem alta afinidade às proteínas de ligação à penicilina e alta estabilidade frente as várias ESBLs e a beta-lactamase cromossômica do tipo 1. Vários autores têm mostrado que as cefalosporinas de “quarta geração” (cefepime) são mais ativas contra bacilos Gram-negativos do que as cefalosporinas de “terceira geração” (FUNG-TOMC, 1997; GARAU et al., 1997; JONES et al., 1997; SILVA, 1999; NAMIUK et al., 2001; MURRAY et al., 2003; LABORATÓRIO, 2004).

A emergência dos microrganismos produtores de ESBL tem grande importância clínica e implicações terapêuticas, como por exemplo: o mecanismo de resistência é mediado por plasmídios, facilitando a transmissão horizontal (LIVERMORE, 1995); a extensão do espectro de resistência para cefalosporinas de espectro ampliado (terceira e quarta geração) impõe limites para utilização de drogas da classe dos beta-lactâmicos, podendo aumentar a prescrição de drogas de amplo espectro como os carbapenêmicos (BUSH et al., 1995); o antibiograma tradicional pode não revelar as cepas produtoras de ESBL e determinar a liberação de falsas resistências, principalmente as relacionadas às cefalosporinas de “terceira” e “quarta geração” e resultados terapêuticos adversos (POTTUMARTHY et al., 2005; SADER et al., 1997; TENOVER et al. 1999); a seleção dos antibióticos para o tratamento de infecções graves por cepas produtoras de ESBL é um desafio devido à complexidade do teste de sensibilidade *in vitro* e à correlação *in vivo* (PATERSON & YU, 1999).

Os fatores de risco identificados e associados à colonização ou infecção por microrganismos produtores de ESBL podem ser devido ao uso de cateter arterial e cateter venoso central; cirurgia abdominal de emergência, tubo gastrostômico e jejunostômico; colonização dos intestinos; tempo de permanência na Unidade de

Terapia Intensiva (UTI); tempo de permanência no hospital; baixo peso ao nascer; administração anterior de qualquer antibiótico; administração anterior de ceftazidima ou aztreonam; morador em instituições de assistência fechada; gravidade da doença; cateter urinário e assistência ventilatória (HONÓRIO et al., 2001; IMPLICAÇÕES TERAPÊUTICAS, 2002; ROSSI & ANDREAZZI, 2004; SHEHABI et al., 2000; SILVA, 2000b), bacteriemia, infecção com uma cepa resistente a três ou mais antibióticos de classes diferentes, como por exemplo, cefalosporinas, carbapenems, quinolonas e aminoglicosídeos (VAHABOGLU et al., 2000), instrumentação, combinação de terapia com quinolonas e drogas ativas contra anaeróbios (SILVA, 2000b).

Especula-se que a emergência de ESBL associa-se à pressão seletiva causada pelo uso de certas cefalosporinas de amplo espectro. É comum a propagação hospitalar, e pode-se identificar a transmissão policlonal que envolve a transmissão de plasmídios a várias cepas ou, monoclonal, em que a transmissão ocorre de paciente a paciente por profissionais da área de saúde (ROSSI & ANDREAZZI, 2004).

No Brasil, como no mundo todo o uso de cefalosporinas de espectro estendido é amplo e já realizado há muitos anos. Se a prática do uso de antimicrobianos conservar suas características atuais, a perspectiva é a de que a resistência aos antibióticos continuará a crescer e poderá tornar-se um problema muito sério. Os reservatórios hospitalares para a manutenção e a evolução dos genes de resistência desempenham papel complicador para a fase atual e o futuro da antibioticoterapia. Esse fato incentivou-nos a realizar esta pesquisa.

2-OBJETIVOS

2.1-Objetivos gerais

Investigar a produção de ESBL em bacilos Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* isolados de amostras de urina de pacientes com infecção do trato urinário atendidos na comunidade e hospitalar.

2.2-Objetivos específicos

2.2.1. Fazer a triagem presuntiva de cepas potencialmente produtoras de ESBL, de acordo com os critérios preconizados pelo CLSI (M100-S15)

2.2.2. Avaliar três testes comerciais disponíveis no mercado de confirmação fenotípica de produção de beta-lactamase de espectro estendido

2.2.2.1. Teste do sinergismo dupla difusão

2.2.2.2. E-test⁷ ESBL

2.2.2.3. Discos Combinados-Oxoid.

3-MATERIAL E MÉTODO

3.1-MATERIAIS

3.1.1- Cepas de bacilos Gram-negativos

Cepas de bacilos Gram-negativos (enterobactérias) isolados de amostras de urina de pacientes que procuraram o Laboratório de Análises Clínicas, setor de Microbiologia Clínica, Centro de Referência Diagnóstica (CRD) do Núcleo de Atendimento à Comunidade (NAC), da Unidade Auxiliar Integrada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, câmpus de Araraquara-UNESP e hospitalares recebidas no laboratório.

3.1.2- Discos de antibióticos Cecon[?]

Discos de antibióticos Cecon[?] (São Paulo, Brasil): aztreonam-30?g, cefotaxima-30?g, ceftazidima-30?g e ceftriaxona-30?g foram utilizados para a realização da triagem das cepas produtoras de ESBL, de acordo com os critérios preconizados pelo NCCLS (M100-S13).

3.1.3- Discos de antibióticos OXOID

Discos de antibióticos da OXOID (Hampshire, England): cefotaxima-30?g, cefotaxima-30?g/ácido clavulânico-10?g, ceftazidima-30?g, ceftazidima-30?g/ácido clavulânico-10?g , cefpodoxima-30?g, cefpodoxima-10?g/ácido clavulânico-1?g (INFORME TÉCNICO nº 28 OX/BR) foram usados para o teste com discos combinados Oxoid.

3.1.4- Fitas E-test²

Fitas E-test² (AB Biodisk, Solna, Sweden) finas, de plástico, não porosas, de 5mm de largura e 60mm de comprimento com os antimicrobianos cefotaxima (0,25-16 μ g/mL) e cefotaxima (0,016-1,0 μ g/mL)+ácido clavulânico (4 μ g/mL); ceftazidima (0,5-32 μ g/mL) e ceftazidima (0,064-4 μ g/mL)+ácido clavulânico (4 μ g/mL) foram usadas para o E-test² ESBL (CORMICAN et al., 1996; JARLIER et al., 1988). O E-test² cefepime (0,25-16 μ g/mL) e cefepime (0,064-4 μ g/mL)+ácido clavulânico (4 μ g/mL) é uma ferramenta adicional para a detecção de ESBL entre as enterobactérias.

3.1.5- Meios de cultura

Os meios de cultura desidratados das marcas comerciais DIFCO (Becton Dickinson, Sparks, MD), MERCK (Darmstadt, Germany), BBL (Becton Dickinson, Cockeysville, USA), OXOID (Hampshire, England) foram preparados de acordo com as especificações dos fabricantes: Ágar CLED, Ágar MacConkey, Ágar Citrato de Simmons, Meio Mueller Hinton, Caldo Uréia, Ágar Tríplice Açúcar Ferro, Meio SIM e Caldo de Infusão Cérebro e Coração.

Os meios de cultura, após a autoclavagem, foram distribuídos em câmara de Fluxo Laminar (Veco), em recipientes previamente esterilizados. Foram estocados em refrigerador a 4°C para uso posterior.

3.1.5.1. - Caldo Infusão de Cérebro e Coração-BHI (Difco)

Infusão de cérebro	200,0g
Infusão de coração	250,0g
Proteose peptone	10,0g
Bacto Dextrose	2,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Fosfato de sódio	25,0g
Água Destilada	1000,0mL

pH final 7,4 ± 0,2

3.1.5.2. - Bacto Ágar MacConkey (Difco)

Peptona	17,000g
Proteose peptona	3,000g
Lactose	10,000g
Sais de bile nº3	1,500g
Cloreto de sódio	5,000g
Ágar	13,500g
Vermelho Neutro	0,030g
Violeta cristal	0,001g
Água destilada	1000,000mL

pH final 7,1 ± 0,2

3.1.5.3. - Bacto Ágar Mueller Hinton (Difco)

Infusão de carne	300,0g
Ácidos de casamino, técnico	17,5g
Amido	1,5g
Ágar	17,0g
Água destilada	1000,0mL

pH final 7,3 ± 0,1

3.1.5.4. - Bacto Ágar Tríplice Açúcar e Ferro (TSI) (Difco)

Extrato de carne	3,000g
Extrato de levedura	3,000g
Peptona	15,000g
Proteose Peptona, Difco	5,000g
Lactose	10,000g
Sacarose	10,000g
Dextrose	1,000g
Sulfato ferroso	0,200g
Cloreto de sódio	5,000g
Tiosulfato de sódio	0,300g
Ágar	12,000g
Vermelho fenol	0,024g
Água destilada.....	1000,000mL

pH final 7,4 ± 0,2 (25°C)

3.1.5.5. - Bacto meio SIM (Difco)

Extrato de carne	3,000g
Peptona	30,000g
Ferro peptonizado, Difco	0,200g
Tiosulfato de sódio	0,025g
Ágar	3,000g
Água destilada.....	1000,000mL

pH final 7,3 ? (25°C)

3.1.5.7. - Bacto Ágar Citrato de Simmons (Difco)

Sulfato de magnésio	0,20g
Fosfato de amônio dihidrogênio	1,00g
Fosfato dipotássico	1,00g
Citrato de sódio	2,00g
Cloreto de sódio	5,00g
Ágar	15,00g
Azul de bromo timol	0,08g
Água destilada.....	1000,00mL

pH final 6,8?0,2 (25°C)

3.1.5.6. - Bacto Uréia Caldo (Difco)

Extrato de levedura	0,100g
Fosfato de potássio monobásico	0,091g
Fosfato de sódio dibásico	0,095g
Uréia, Difco	20,000g
Vermelho fenol	0,010g
Água destilada.....	1000,000mL

pH final 6,9 ± 0,2 (25°C)

3.1.6- Sistema BBL CRYSTAL Enterico /Não Fermentador (BD)

O sistema é composto de bandejas com os substratos cromogênicos, tubos com 2,2mL de fluido para inóculo constituído de:

Cloreto de sódio	8,5000g
Ácido3-morfolinopropanosulfônico	0,8372g
Água purificada	1000,0000mL

O painel BBL Crystal E/NF ID contém 30 substratos bioquímicos e enzimáticos, a seguir relatados: arabinose, manose, sacarose, melibiose, ramnose, sorbitol, manitol, adonitol, galactose, inositol, p-nitrofenil fosfato, p-nitrofenil α - β -glucosídeo, p-nitrofenil β -galactosídeo, prolina nitroanilida, p-nitrofenil bis-fosfato, p-nitrofenil xilosídeo, p-nitrofenil α -arabinosídeo, p-nitrofenil fosforilcolina, p-nitrofenil β -glucoronídeo, p-nitrofenil N-acetil glucosaminídeo, γ -L-glutamil p-nitroanilídeo,

esculina, p-nitro-DL-fenilalanina, uréia, glicina, citrato, malonato, tetrazolium, arginina e lisina.

3.1.7- Discos de antimicrobianos

Os antimicrobianos utilizados no teste de sensibilidade/resistência estão descritos a seguir: β -lactâmicos – Penicilinas: Ampicilina (AMP), Ácido pipemídico (PIP); Penicilinas+ β -lactamase: Amoxicilina+ácido clavulânico (AMC); β -lactâmicos – Cefalosporinas: Cefazolina (CFZ), Cefalotina (CFL), Cefuroxima (CRX), Cefoxitina (CFO), Cefotaxima (CTX), Cefepime (CPM), Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO); Carbapenens β -lactâmicos: Aztreonan (ATM), Imipenen (IPM); Aminoglicosídeos: Amicacina (AMI), Kanamicina (KAN), Gentamicina (GEN), Netilmicina (NET), Tobramicina (TOB); Quinolonas: Ácido nalidíxico (NAL); Fluorquinolonas: Ciprofloxacina (CIP), Ofloxacina (OFX); Inibidores da Síntese de Folato: Sulfametoxazol-trimetoprim (SUT), Trimetoprim (TRI); Tetraciclina: Tetraciclina (TET); Fenicol: Cloranfenicol (CLO); Nitrofurano: Nitrofurantoína (NIT).

3.1.8- Controle de qualidade

Amostras da American Type Culture Collection (ATCC), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 produtora de ESBL e *Escherichia coli* ATCC 25922 não produtora de ESBL foram utilizadas como controle de qualidade para todos os testes usados neste estudo. Estas cepas ATCC foram avaliadas seguindo a padronização do NCCLS e a interpretação dos resultados foi realizada utilizando os limites preconizados para cada ATCC.

3.2-MÉTODOS

O presente estudo foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa, na Seção Técnica Acadêmica da Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, sob protocolo CEP/FCF/CAr.21/2003 parecer nº. 10/2004, aprovado em 30 de março de 2004.

Para os pacientes que concordaram em participar do estudo, foram dadas informações verbais e por escrito, para a obtenção de Consentimento Livre e Esclarecido.

A coleta de urina foi realizada no período de maio de 2004 a janeiro de 2005. As amostras de urina foram colhidas em sala apropriada, de acordo com o protocolo de coleta de urina (Anexo 1) para cultura do Setor de Microbiologia Clínica, transportadas para o Setor em caixas refrigeradas e processadas imediatamente.

As urinas foram semeadas em meios de MacConkey e Cistina Lactose Eletrólito Deficiente (CLED) distribuídos em lâminas contidas em *container* apropriado e que recebe o nome comercial de URILAB (Laborclin, Pinhais, PR) e incubado a temperatura de $35\pm 1-37\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 18-24h. Após a incubação, foi analisado o crescimento de bactérias nos dois meios de cultura e a seguir realizada a leitura de contagem de colônias, no meio CLED, por meio da comparação visual com um gabarito de comparação (Figura 1), o qual mostra as unidades formadoras de colônia/mL de urina (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7). No meio CLED observa-se o crescimento de colônias de cor clara (amarelas) e no de MacConkey colônias róseas, bordas lisas e de consistência cremosa, bem como as colônias róseas não cremosas (transparentes).

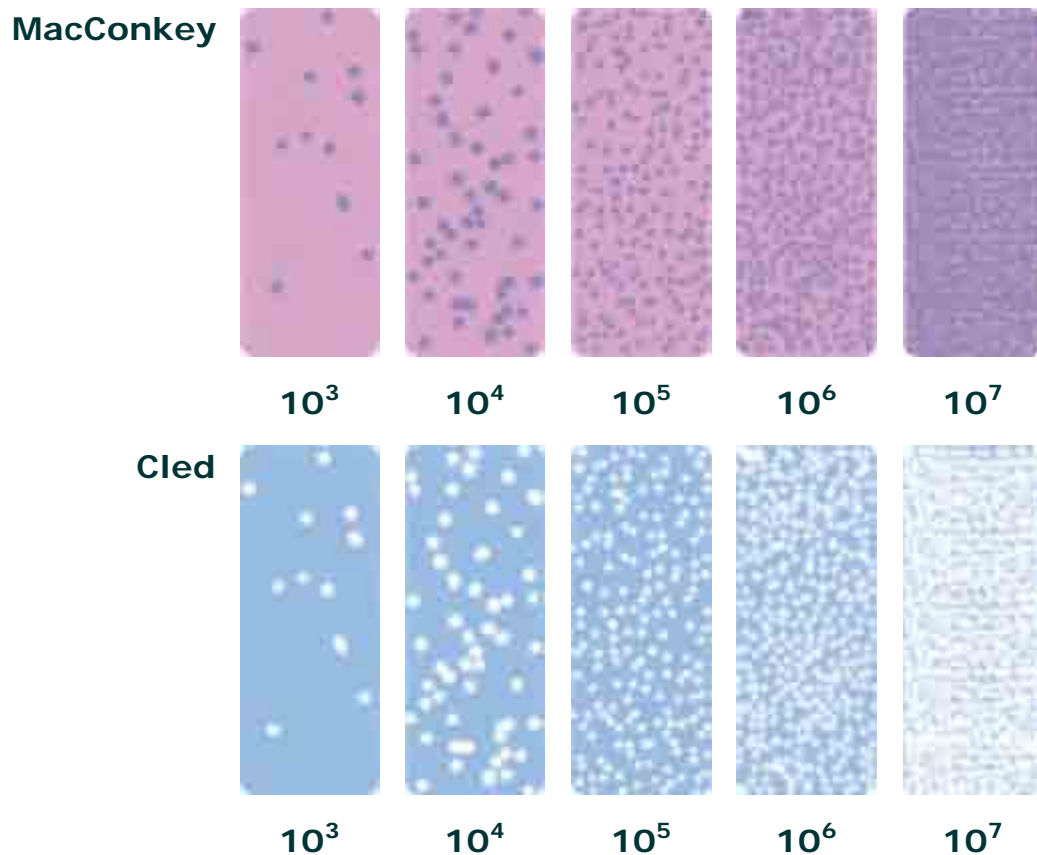


Figura 1- Gabarito de comparação mostrando as unidades formadoras de colônia por mL de urina.

3.2.1- Identificação de bacilos gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* fermentadores da glicose.

Após a observação do desenvolvimento bacteriano no ágar CLED e MacConkey, as unidades formadoras de colônia selecionadas foram repicadas com agulha bacteriológica para o meio de triagem tríplice açúcar ferro (TSI), SIM, uréia e citrato de Simmons e a seguir identificadas por método bacteriológico convencional – (Koneman et al., 2001 e Murray et al., 2003) e por sistema de identificação BBL CRYSTAL™ – Identification Systems – Enteric/Nonfermenter ID Kit (BD-Bioscences, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD-United States).

O sistema de identificação BBL CRYSTAL™ – Identification Systems – Enteric/Nonfermenter ID Kit (BD-Bioscences, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD-United States) foi utilizado para a confirmação da identificação das cepas produtoras de ESBL. É o método convencional de identificação, miniaturizado, empregando substratos cromogênicos. A suspensão bacteriana apresentando uma turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, foi vertida em fluido de inóculo, na área demarcada na base do sistema, lacrada e agitada suavemente. O sistema foi incubado em estufa bacteriológica a 37°C por 18-20 horas (Figura 2). A leitura foi feita observando a face que ficou virada para baixo, como referência foi tomado o painel de cores que acompanha o sistema (Manual de instruções).

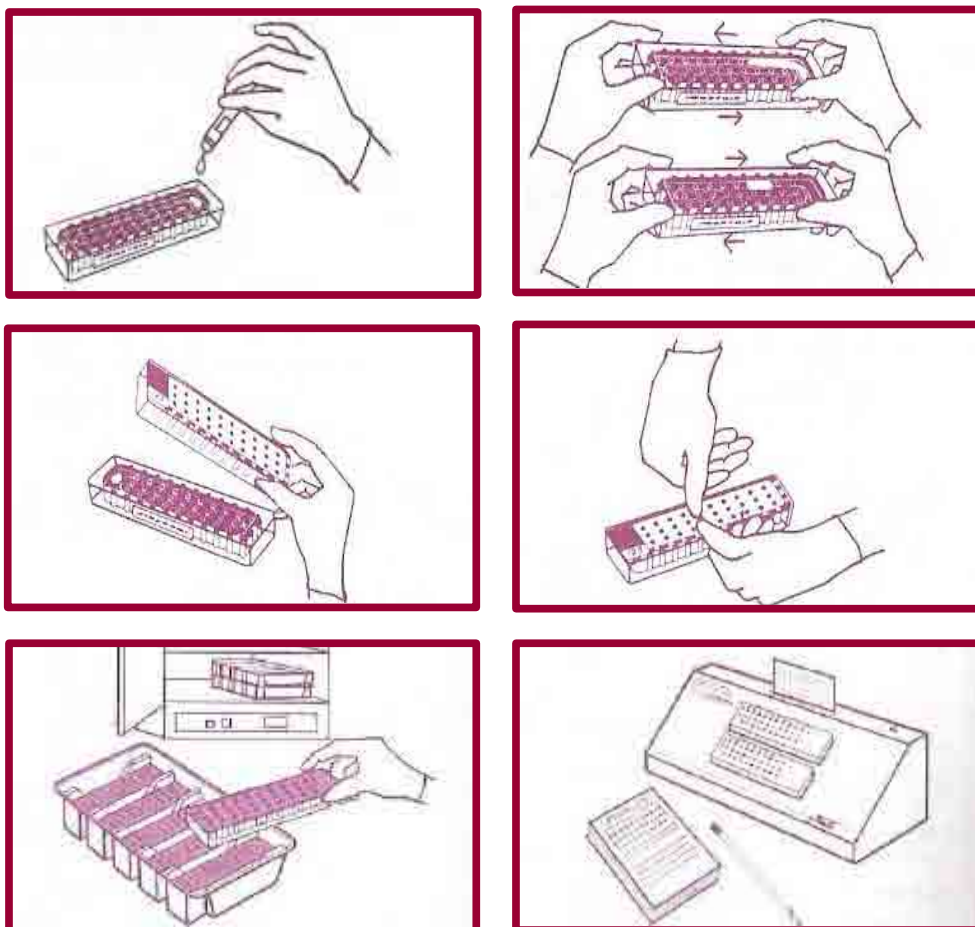


Figura 2- Representação esquemática do procedimento de identificação de bacilos Gram-negativos através do sistema BBL CRYSTAL™

3.2.2- Desenvolvimento da pesquisa

Para o desenvolvimento dessa pesquisa, foram consideradas as urinas que apresentaram crescimento de uma única espécie bacteriana e contagem igual ou superior a 10^5 UFC/mL de urina. Foram estudadas 300 cepas de enterobactérias: *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *C. koseri*, *Enterobacter aerogenes*; *Enterobacter agglomerans*; *Enterobacter cloacae*; *Enterobacter sakazakii*; *Enterobacter gergoviae*, *Escherichia coli*; *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Morganella morganii*; *Proteus mirabilis*; *Proteus penneri*; *Proteus vulgaris*; *Providencia alcalifasciens*; *Providencia rettgeri*, *Serratia marcescens*.

Foi realizado o teste de sensibilidade/resistência aos antimicrobianos conforme Bauer et al. (1966) para as 300 cepas de bacilos Gram-negativos isoladas de amostras de urina. Os antimicrobianos usados foram: Ampicilina (AMP), Ácido pipemídico (PIP), Amoxicilina+ácido clavulânico (AMC), Cefazolina (CFZ), Cefalotina (CFL), Cefuroxima (CRX), Cefoxitina (CFO), Cefotaxima (CTX), Cefepime (CPM), Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO), Aztreonam (ATM), Imipenem (IPM), Amicacina (AMI), Kanamicina (KAN), Gentamicina (GEN), Netilmicina (NET), Tobramicina (TOB), Ácido nalidíxico (NAL), Ciprofloxacina (CIP), Ofloxacina (OFX), Sulfametoxazol-trimetoprim (SUT), Trimetoprim (TRI), Tetraciclina (TET), Cloranfenicol (CLO) e Nitrofurantoína (NIT). A medida dos halos destes antimicrobianos encontram-se no Apêndice A.

Para a detecção de bactérias produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) foi realizada uma triagem com os antimicrobianos (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona e aztreonam) e os testes confirmatórios de produção de ESBL: Teste do sinergismo dupla difusão, E-test[?] ESBL, Discos Combinados-Oxoid.

3.2.2.1-Triagem das cepas produtoras de ESBL

De acordo com os critérios preconizados pelo NCCLS (M100-S13), a triagem presuntiva de cepas potencialmente produtoras de ESBL foi realizada em placas de Petri descartáveis (90X15mm) contendo Ágar Mueller Hinton com 4,0 mm de profundidade através do método difusão em discos. Foram utilizados discos (Cecon, São Paulo, Brasil) contendo os seguintes antimicrobianos: ceftazidima-30?g, cefotaxima-30?g, ceftriaxona-30?g, aztreonam-30?g.

3.2.2.2-Teste do sinergismo dupla difusão com discos e/ou disco aproximação (*Double Disk*) [Sanders e Sanders, 1979; Jarlier et al., 1988].

As cepas estudadas foram inoculadas em caldo BHI (Difco) e incubadas por três horas ou um período suficiente para atingir a turvação correspondente ao padrão 0,5 da escala de MacFarland. Após esse período, a suspensão bacteriana foi semeada, com o auxílio de *swab* em várias direções, como recomendado pelo NCCLS (M100-S9) para o teste de difusão de disco, em placas de Petri (150X15mm) contendo Ágar Mueller Hinton com 4mm de profundidade. Após a secagem das placas foram colocados os discos de amoxicilina+ácido clavulânico (AMC), aztreonam (ATM), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) e ceftriaxona (CRO) Os discos de aztreonam, cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona foram colocados a uma distância de 30mm da amoxicilina/ácido clavulânico (disco central).

As placas foram incubadas à 37°C por 24 horas e, após este período, os halos formados em volta dos cinco discos não foram medidos pelo critério de tamanhos, mas, observados quanto à presença de uma deformação característica, denominada “zona fantasma” ou “zona truncada” ocasionada por um aumento extra

nos halos de inibição entre os discos das cefalosporinas e/ou aztreonam e o disco central de ácido clavulânico/amoxicilina, como apresentado pelas Figuras 3 e 4.

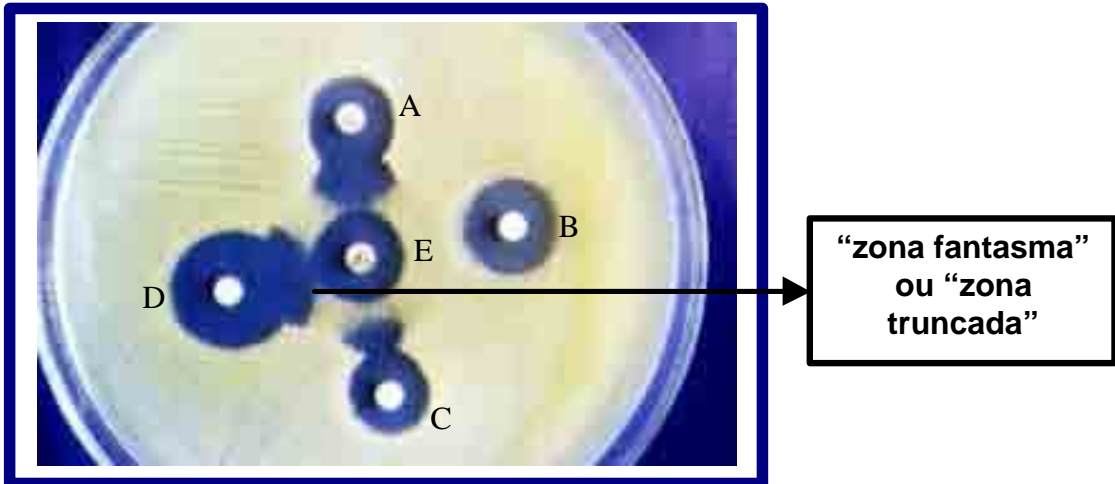


Figura 3- Esquema representativo de um teste do disco aproximação (*double disk*): (A) cefotaxima; (B) aztreonam; (C) ceftazidima; (D) ceftriaxona; (E) amoxicilina+ácido clavulânico. Observar o sinergismo, representado por uma zona fantasma ou truncada, entre os antimicrobianos cefotaxima e amoxicilina+ácido clavulânico; aztreonam e amoxicilina+ácido clavulânico; ceftriaxona e amoxicilina+ácido clavulânico e ceftazidima e amoxicilina+ácido clavulânico. Fonte: Santos (2001).

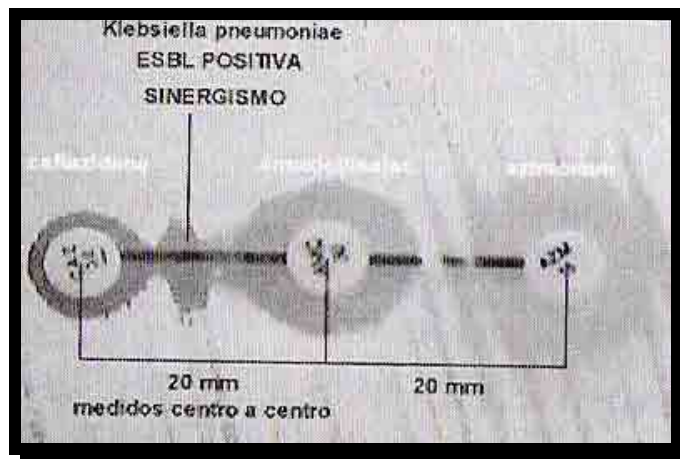


Figura 4- Teste do disco aproximação (*double disk*). Ao centro amoxicilina+ácido clavulânico, ladeado por ceftazidima e aztreonam, a uma distância de 20mm. Observar uma deformação característica (zona fantasma ou truncada) representando o sinergismo entre os discos de ceftazidima e amoxicilina+ácido clavulânico. Fonte: ROSSI & ANDREAZZI (2004)

3.2.2.3-E-test² ESBL

O E-test² ESBL é baseado numa combinação dos conceitos de teste de diluição e difusão. Como os métodos de concentração inibitória mínima (CIM), quantifica diretamente a sensibilidade antimicrobiana. Mesmo sendo processado como teste de difusão em disco, difere do método disco convencional pelo uso de um gradiente pré-formado e estável de antimicrobiano.

E-test² consiste numa fita plástica fina (5x60mm), inerte e não porosa contendo concentrações pré-definidas e decrescentes do antimicrobiano, que rapidamente se difunde, a partir da fita para produzir um gradiente contínuo exponencial da droga no meio, correspondendo a 15 valores de CIM convencional. A concentração dos diversos antibióticos varia de 0,002 a 256²g/mL, valores que permitem avaliar mais precisamente a concentração inibitória da droga testada, quando comparada à técnica tradicional em que existem menos diluições.

As cepas estudadas foram inoculadas em caldo BHI (Difco) e incubadas por um período suficiente para atingir a turvação correspondente ao padrão 0,5 da escala de MacFarland. Após esse período, a suspensão bacteriana foi semeada, com o auxílio de *swab*, como recomendado pelo NCCLS (M100-S9) para o teste de difusão em disco, em placas de Petri descartáveis (150x15mm) contendo Ágar Mueller Hinton com 4mm de profundidade. Após a secagem das placas, as fitas foram aplicadas com o auxílio de uma pinça de metal esterilizada. As placas foram incubadas à 35-37°C por 16-18 horas. Foi realizada a leitura dos valores de CIM no ponto de contato entre a zona de inibição e a escala de diluições impressa na fita teste. A fita fornece uma área de inibição de forma elíptica (Figura 5).

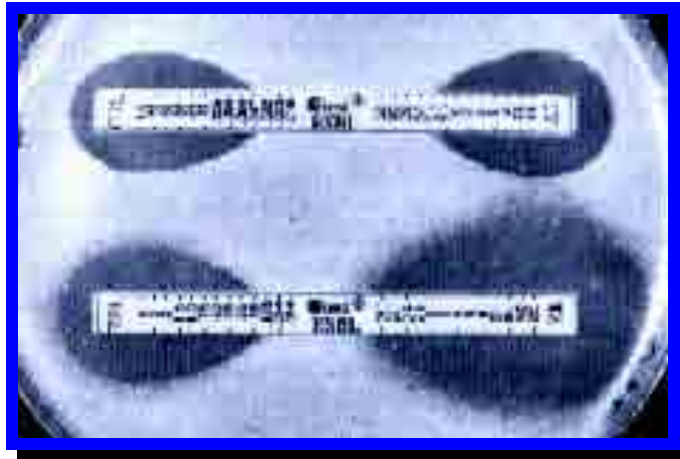


Figura 5- Configuração e interpretação das fitas de E-test ESBL. Fonte: bula do E-test⁷ ESBL

Um resultado em que a relação ceftazidima versus ceftazidima/ácido clavulânico e cefotaxima versus cefotaxima/ácido clavulânico for igual ou maior que 8,0 é indicativo da presença de ESBL (Tabela 2) (HONÓRIO et al., 2001).

Nas Figuras 6 e 7 pode-se observar fitas de E-test caracterizando ESBL positiva e negativa respectivamente.



Figura 6 -E-test: fita impregnada com ceftazidima (TZ) em um extremo e, no outro, ceftazidima + ácido clavulânico (TZL). Houve inibição da cepa na presença do ácido clavulânico (relação maior que 8), caracteriza ESBL positiva. . Fonte: ROSSI & ANDREAZZI

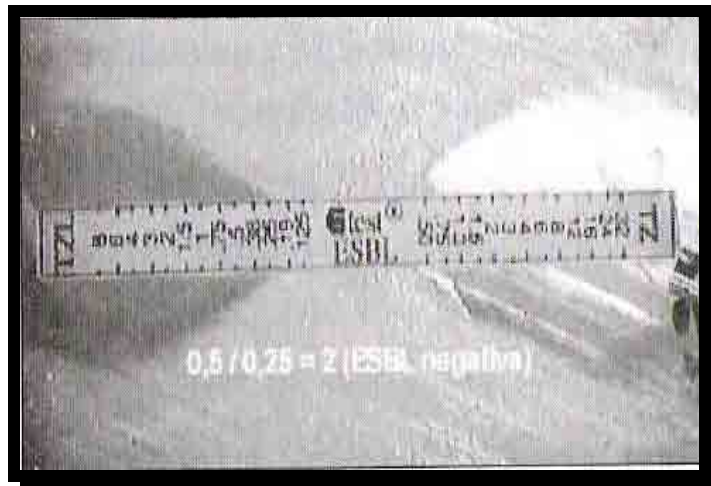


Figura 7- E-test: fita impregnada com ceftazidima em um extremo e, no outro, ceftazidima + ácido clavulânico. Não houve inibição da cepa na presença do ácido clavulânico (relação menor que 8), caracterizando ESBL negativa. .
Fonte: ROSSI & ANDREAZZI

Tabela 2: Interpretação dos resultados do E-test

ESBL	Concentração Inibitória Mínima(CIM µg/mL)
Positivo	CT?0,5 e CT/CTL?8 ou TZ ?1 e TZ/TZL ? 8 ou Deformação na elipse de CT ou TZ
Negativo	CT?0,5 ou CT/CTL? 8 e TZ ?1 ou TZ/TZL? 8
Não determinado	CT?16 e CTL?1 e TZ?32 e TZL?4 ou Quando um lado da fita é ESBL negativo e o outro não determinado (ND)

[CT/CTL] cefotaxima/cefotaxima+ácido clavulânico;
[TZ/TZL] ceftazidima/ceftazidima+ácido clavulânico;
[CIM] Concentração Inibitória Mínima.

3.2.2.4-Discos Combinados (Oxoid)

A maioria dos testes de detecção para ESBL explora o fato de que estas são inibidas pelo ácido clavulânico ou sulbactam. Recentes recomendações do CLSI (2005) detalham o uso de combinação de discos de cefalosporinas com e sem ácido clavulânico. Os resultados positivos são indicados, após leitura de placas incubadas a 37°C por 18 horas, se a diferença do tamanho dos halos obtidos no disco combinado e disco de cefalosporina correspondente for maior ou igual a 5mm. Os resultados são considerados negativos se essa diferença for menor do que 5mm (Figura 8). A presença/ausência de mecanismos de resistência é indicada pela diferença do tamanho dos halos obtidos em discos de cefalosporinas com e sem ácido clavulânico (INFORME TÉCNICO OXOID nº 28 OX/BR).

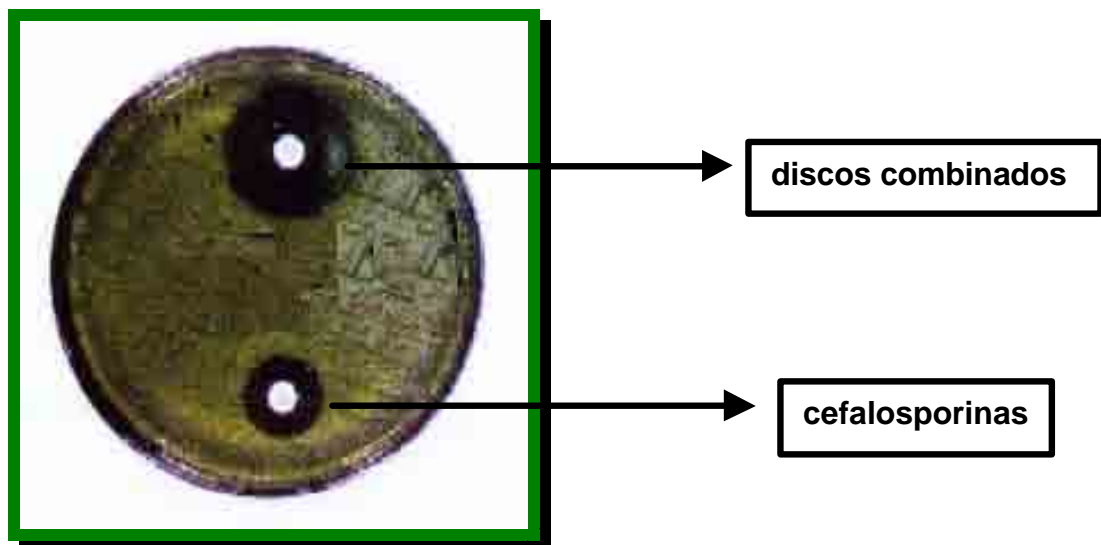


Figura 8- Discos combinados. Fonte: INFORME TÉCNICO OXOID nº 28 OX/BR

As suspensões bacterianas foram distribuídas como descrito no item 3.2.2.2. Nas placas de Petri foram colocados os discos de cefotaxima e o combinado

cefotaxima/ácido clavulânico, ceftazidima e o combinado ceftazidima/ácido clavulânico e cefpodoxima com o combinado cefpodoxima/ácido clavulânico. As placas foram incubadas à 37° por 24 horas. Após esse período realizou-se a leitura dos halos de inibição formados com as cefalosporinas e os discos combinados. A leitura foi caracterizada pela diferença entre os valores obtidos nos halos dos dois discos colocados na placa.

Um microrganismo foi interpretado como produtor de ESBL, quando houve uma diferença ≥ 5 mm entre os halos de inibição do disco combinado comparado ao halo de inibição da cefalosporina correspondente (Figura 9).



Figura 9- Teste com discos combinados beta-lactâmico/inibidor de beta-lactamase e disco do beta-lactâmico não combinado. Na parte superior da placa observa-se um resultado positivo (aumento maior que 5mm em relação ao disco de cefotaxima + ácido clavulânico e cefotaxima isolada). Na parte inferior da placa observa-se um resultado negativo. Fonte: ROSSI & ANDREAZZI

4- RESULTADOS

Do total de 2024 amostras de urina colhidas e analisadas por cultura, 453 foram positivas para a presença de microrganismos, 438 (96,6%) apresentaram $\geq 10^5$ UFC/mL de urina e 15 (3,4%) entre 10^4 - 10^5 UFC/mL de urina.

Das urinas que apresentaram desenvolvimento bacteriano $\geq 10^5$ UFC/mL foram isoladas 300 cepas de bacilos Gram-negativos identificados como *Enterobacteriaceae* relatados a seguir: *Citrobacter amalonaticus* 02 (0,66%), *Citrobacter diversus* 02 (0,66%), *Citrobacter freundii* 03 (0,99%), *Citrobacter koseri* 01 (0,33%), *Enterobacter aerogenes* 18 (5,94%), *Enterobacter agglomerans* 01 (0,33%), *Enterobacter cloacae* 06 (1,98%), *Enterobacter gergoviae* 01 (0,33%), *Enterobacter sakazakii* 01 (0,33%), *Escherichia coli* 218 (71,94%), *Klebsiella oxytoca* 02 (0,66%), *Klebsiella pneumoniae* 05 (1,65%), *Klebsiella rhinoscleromatis* 01 (0,33%), *Klebsiella ozaenae* 01 (0,33%), *Morganella morganii* 5 (1,65%), *Proteus mirabilis* 19 (6,27%), *Proteus penneri* 04 (1,32%), *Proteus vulgaris* 03 (0,99%), *Providencia alcalifasciens* 02 (0,66%), *Providencia rettgeri* 04 (1,32%), *Serratia marcescens* 01 (0,33%).

Das 300 cepas de enterobactérias estudadas, 292 (97,33%) foram isoladas de amostras de urina provenientes de pacientes da comunidade e 8 (2,66%) de amostras recebidas no laboratório provenientes de pacientes hospitalizados. Ainda, 249 (83%) foram isoladas de amostras de urina de pacientes do sexo feminino e 51 (17%) do sexo masculino. A faixa etária desses pacientes está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3- Idade dos pacientes

Idade (anos)	nº	%
0-1	12	4,0
1-9	32	10,7
10-19	39	13,0
20-29	66	22,0
30-39	48	16,0
40-49	34	11,3
50-59	20	6,6
60-69	18	6,0
70-79	26	8,7
80-89	05	1,7
Total	300	100

O resultado do isolamento de microrganismos de pacientes da comunidade com infecção urinária mostra *Escherichia coli* (71,94%) seguido de *Proteus mirabilis* (6,27%).

Os resultados do teste de sensibilidade/resistência *in vitro* aos agentes antimicrobianos dos isolados de comunidade e hospital mostram 161 (53,66%) cepas resistentes a ampicilina, 113 (37,66%) resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim, 140 (46,66%) resistentes ao trimetoprim, 112 (37,33%) resistentes a tetraciclina e 63 (21,00%) resistentes ao cloranfenicol, ver Tabela 4 e Apêndice A.

Mostram ainda, que 02 (0,66%) cepas foram resistentes a amicacina e 03 (1,00%) resistentes ao imipenem. Das três cepas resistentes ao imipenem, duas cepas *Proteus mirabilis* e uma *Morganella morganii*.

Resistentes ao cefepime foram encontradas 05 (1,66%) cepas das quais todas eram suspeitas da produção de ESBL (*Citrobacter freundii* 01, *Enterobacter cloacae* 01, *Enterobacter cloacae* 02, *Klebsiella pneumoniae* 02 e *Serratia marcescens* 01).

O tamanho dos halos dos antimicrobianos usados no teste de sensibilidade/resistência são mostrados no Apêndice A.

Tabela 4- Porcentagem de cepas sensíveis/resistentes aos agentes antimicrobianos dos isolados de comunidade e hospital.

Antimicrobianos	Resistência(%)	Intermediário(%)	Sensibilidade(%)
Ac. nalidíxico	13,00	1,66	85,34
Ac. pipemídico	11,00	2,33	86,67
Amoxicilina+ac. clav.	4,33	2,00	93,67
Amicacina	0,66	0,33	99,01
Ampicilina	53,66	3,00	43,34
Aztreonam	3,33	0,66	96,01
Cefalotina	19,33	12,33	68,34
Cefazolina	10,66	3,66	85,68
Cefepime	1,66	0,66	97,68
Cefotaxima	3,00	0,33	96,67
Cefoxitina	7,66	2,66	89,68
Ceftazidima	2,33	0,66	97,01
Ceftriaxona	2,33	0,99	96,68
Cefuroxima	8,66	1,33	90,01
Ciprofloxacina	24,00	1,33	74,67
Cloramfenicol	21,00	1,00	78,00
Gentamicina	3,33	0,33	96,34
Imipenem	1,00	0,00	99,00
Kanamicina	6,00	2,66	91,34
Netilmicina	2,33	1,33	96,34
Nitrofurantoína	4,66	1,66	93,68
Ofloxacina	8,33	0,33	91,34
Sulfam. -trimetoprim	37,66	1,66	60,68
Tetraciclina	37,33	11,00	51,67
Tobramicina	3,00	0,66	96,34
Trimetoprim	46,66	0,00	53,34

Os resultados desse teste das cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona) e o aztreonam indicaram 35 cepas suspeitas de produção da enzima beta-lactamase de espectro estendido, dos gêneros: *Citrobacter* sp. (2); *Enterobacter* sp. (7); *Escherichia coli* (19); *Klebsiella pneumoniae* (2); *Proteus mirabilis* (3), *Providencia rettgeri* (1) e *Serratia marcescens* (1), como apresentado nas Tabelas 5-6.

Klebsiella pneumoniae (amostra 02) no teste de triagem com o aztreonam (ATM) mostrou halo de sensibilidade menor do que o ponto de corte (?27mm), sugerindo resistência ao aztreonam. A ceftazidima (CAZ) não associada ao ácido clavulânico mostrou halo de sensibilidade de 12mm, abaixo do ponto de corte (?22mm), sugerindo resistência a ceftazidima. A cefotaxima (CTX) mostrou halo de 20mm, menor do que o ponto de corte (?27mm), também sugerindo resistência a este antimicrobiano. A ceftriaxona (CRO) também apresentou halo menor do que o ponto de corte (?25mm), também sugerindo resistência a este antimicrobiano (Tabela 5). Os resultados de triagem de duas cepas *Klebsiella pneumoniae* (01 e 02) sugerem resistência aos antimicrobianos: aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX) e ceftriaxona (CRO), esta bactéria é um potencial produtor da enzima beta-lactamase de espectro estendido.

Escherichia coli: 09 cepas mostraram halo de sensibilidade para aztreonam (ATM) maior do que o ponto de corte (?27mm) e dez cepas dessa espécie mostraram halo menor ou igual ao ponto de corte, sugerindo resistência ao aztreonam. Para ceftazidima (CAZ) cinco cepas apresentaram halo de sensibilidade igual ao ponto de corte (?22mm) e as outras doze halos maiores do que o ponto de corte. Para cefotaxima (CTX) doze cepas mostraram halo de sensibilidade ?27mm (ponto de corte), sugerindo resistência e sete cepas mostraram halo de sensibilidade maior ou igual ao ponto de corte. Para ceftriaxona (CRO) apenas uma cepa apresentou halo de sensibilidade igual ao ponto de corte e 18 cepas apresentaram halo de sensibilidade superior ao ponto de corte (?25mm) (Tabela 5).

O resultado do teste de triagem com a cefotaxima (CTX) para *Escherichia coli* mostrou que doze cepas são suspeitas de produzirem a enzima beta-lactamase de

espectro estendido, para aztreonam (ATM) dez cepas, para ceftazidima (CAZ) cinco cepas e para ceftriaxona (CRO) uma cepa.

Tabela 5- Triagem de cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella* sp. suspeitas de serem produtoras de enzima beta-lactamase de espectro estendido

Cepas (n°)	Antimicrobianos de triagem			
	ATM (=27mm)	CAZ(=22mm)	CTX (=27mm)	CRO (=25mm)
<i>E. coli</i> 01	28	29	27	28
<i>E. coli</i> 02	26	28	28	29
<i>E. coli</i> 03	26	24	28	29
<i>E. coli</i> 04	30	23	24	30
<i>E. coli</i> 05	32	25	27	31
<i>E. coli</i> 06	26	24	26	26
<i>E. coli</i> 07	27	22	28	28
<i>E. coli</i> 08	27	24	23	30
<i>E. coli</i> 09	27	27	26	25
<i>E. coli</i> 10	32	27	25	27
<i>E. coli</i> 11	27	24	28	28
<i>E. coli</i> 12	27	22	26	26
<i>E. coli</i> 13	30	27	26	28
<i>E. coli</i> 14	26	26	28	29
<i>E. coli</i> 15	29	22	31	30
<i>E. coli</i> 16	27	24	27	27
<i>E. coli</i> 17	28	22	27	26
<i>E. coli</i> 18	28	22	29	27
<i>E. coli</i> 19	28	24	27	28
<i>K. pneumoniae</i> 01	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i> 02	16	12	20	18
Total de cepas suspeitas de serem produtoras de ESBL	12	07	14	03

ATM:aztreonam; CAZ:ceftazidima;CTX:cefotaxima;CRO:ceftriaxona; R:resistente

Os resultados dos testes de triagem para *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Providencia* sp. e *Serratia marcescens* estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6- Triagem de cepas de membros *Enterobacteriaceae* suspeitas de serem produtoras de ESBL.

Cepas (n°)	Antimicrobianos de triagem			
	ATM (=27mm)	CAZ(=22mm)	CTX (=27mm)	CRO (=25mm)
<i>C. freundii</i> 01	14	R	R	R
<i>C. freundii</i> 02	R	R	R	R
<i>E. aerogenes</i> 01	R	R	R	R
<i>E. aerogenes</i> 02	30	23	24	30
<i>E. aerogenes</i> 03	20	10	12	16
<i>E. aerogenes</i> 04	15	18	14	18
<i>E. cloacae</i> 01	R	R	R	R
<i>E. cloacae</i> 02	08	16	09	R
<i>E. sakazakii</i> 01	30	22	27	28
<i>P. mirabilis</i> 01	32	30	24	27
<i>P. mirabilis</i> 02	38	30	34	24
<i>P. mirabilis</i> 03	R	24	26	28
<i>P. rettgeri</i> 01	R	21	25	31
<i>S. marcencens</i> 01	R	16	R	R
Total de cepas suspeitas De produzirem ESBL	10	10	13	09

ATM:aztreonam;CAZ:ceftazidima;CTX:cefotaxima;CRO:ceftriaxona; R:resistente

Os resultados do teste de triagem, mostrados na Tabela 6, com o aztreonam (ATM) mostra que 10 cepas de enterobactérias foram resistentes, com a ceftazidima (CAZ) 10 cepas foram resistentes a esse antimicrobiano, com a cefotaxima (CTX) 13 cepas foram resistentes e com ceftriaxona (CRO) 09 cepas, total de 35 são suspeitas de produzirem a enzima ESBL.

Os testes fenotípicos confirmatórios de ESBL para 35 cepas mostraram que o teste do sinergismo (dupla difusão com discos e/ou disco aproximação-*Double Disk*) confirmou a produção de ESBL em 5 (14,28%) cepas de enterobactérias como apresentado na Tabela 7 e Figuras 10-12.

Tabela 7- Cepas de enterobactérias produtoras e não produtoras de ESBL verificado pelo método disco difusão (teste fenotípico confirmatório).

Cepas	formação de "zona fantasma"	ESBL
<i>C. freundii</i> ^P 01	ausente	negativo
<i>C. freundii</i> 02	ausente	negativo
<i>E. aerogenes</i> 01	ausente	negativo
<i>E. aerogenes</i> 02	ausente	negativo
<i>E. aerogenes</i> 03	ausente	negativo
<i>E. aerogenes</i> 04	ausente	negativo
<i>E. cloacae</i>^P 01	presente	positivo
<i>E. cloacae</i> 02	presente	positivo
<i>E. sakazakii</i> 01	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 01	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 02	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 03	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 04	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 05	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 06	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 07	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 08	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 09	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 10	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 11	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 12	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 13	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 14	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 15	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 16	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 17	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 18	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 19	ausente	negativo
<i>K. pneumoniae</i> 01	presente	positivo
<i>K. pneumoniae</i> 02	presente	positivo
<i>P. mirabilis</i> 01	ausente	negativo
<i>P. mirabilis</i> 02	ausente	negativo
<i>P. mirabilis</i> 03	ausente	negativo
<i>P. rettgeri</i> 01	ausente	negativo
<i>S. marcescens</i> 01	presente	positivo
Total ESBL		05

O resultado do sinergismo, método disco difusão (teste fenotípico confirmatório), demonstrou que cinco cepas são produtoras da enzima ESBL: dois

Enterobacter cloacae (5,71%); duas *Klebsiella pneumoniae* (5,71%) e uma *Serratia marcescens* (2,85%).

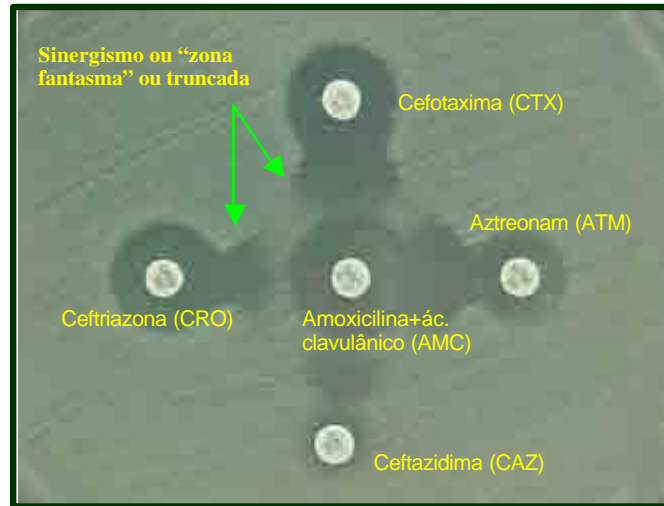


Figura 10 - Demonstração do sinergismo pelo método disco difusão após triagem de *Klebsiella pneumoniae* entre a amoxicilina+ácido clavulânico (disco central), aztreonam (ATM) e as cefalosporinas de terceira geração incluindo a ceftazidima (CAZ); cefotaxima (CTX) e ceftriaxona (CRO) (discos laterais).

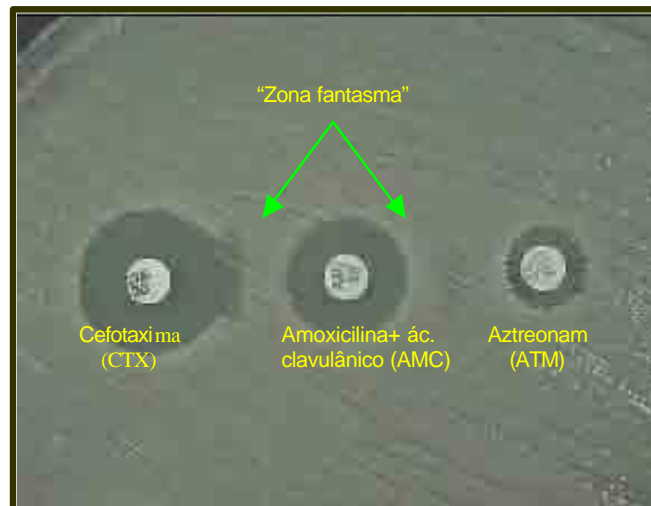


Figura 11 – Demonstração do sinergismo pelo método disco difusão apresentado por *Enterobacter cloacae* entre amoxicilina+ácido clavulânico (disco central) e os antimicrobianos aztreonam (ATM) e cefotaxima (CTX).

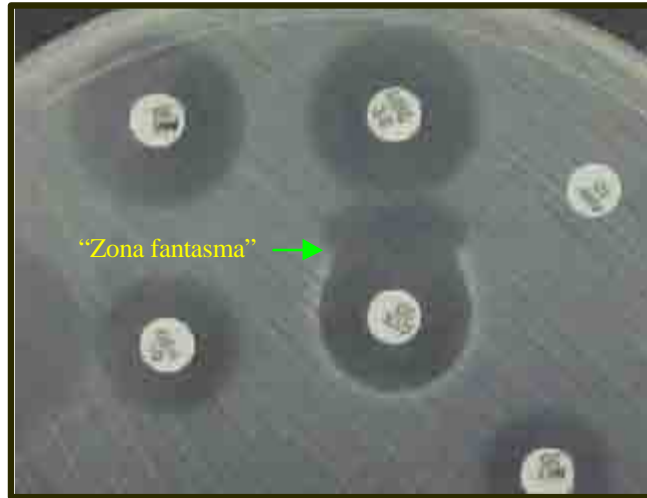


Figura 12 - Demonstração do sinergismo pelo método disco difusão após triagem de *Klebsiella pneumoniae* entre a amoxicilina+ácido clavulânico (AMC) e cefotaxima (CTX).

Os resultados do método do E-test, em 35 cepas de enterobactérias estão apresentados na Tabela 8 e Figuras 13-15.

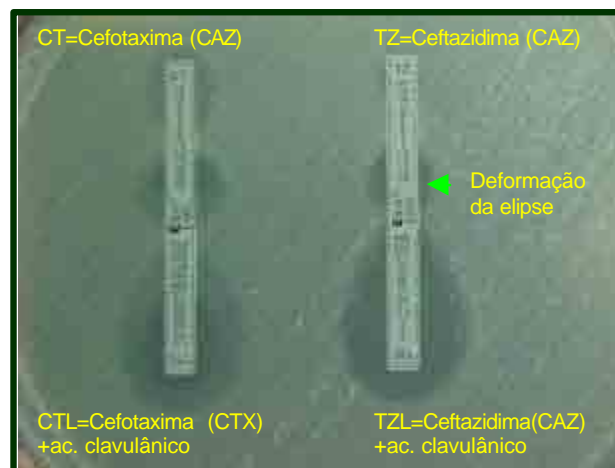


Figura 13 - Demonstração da elipse deformada nas fitas de Etest contendo ceftazidima e ceftazidima+ácido clavulânico; cefotaxima e cefotaxima + ácido clavulânico, fenômeno apresentado por *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL.

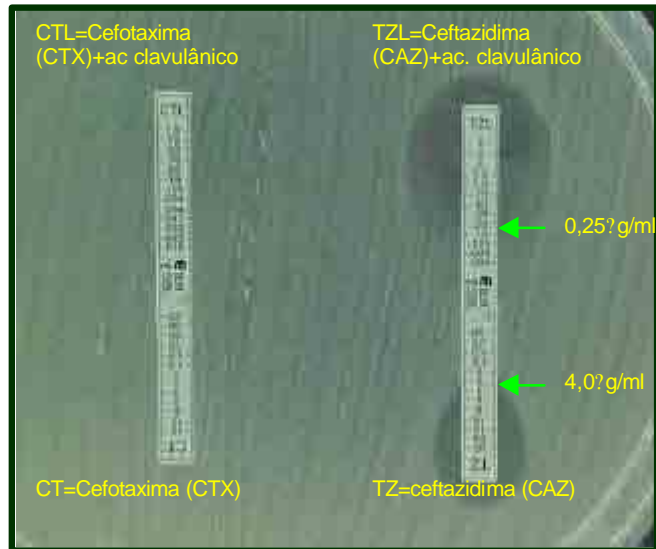


Figura 14 - Foto ilustrativa do método Etest demonstrando a produção de ESBL por *Serratia marcescens* pela fita contendo ceftazidima (4,0?g/ml) e ceftazidima+ácido clavulânico (0,25?g/ml). Os antimicrobianos cefotaxima e cefotaxima+ácido clavulânico foram resistentes.

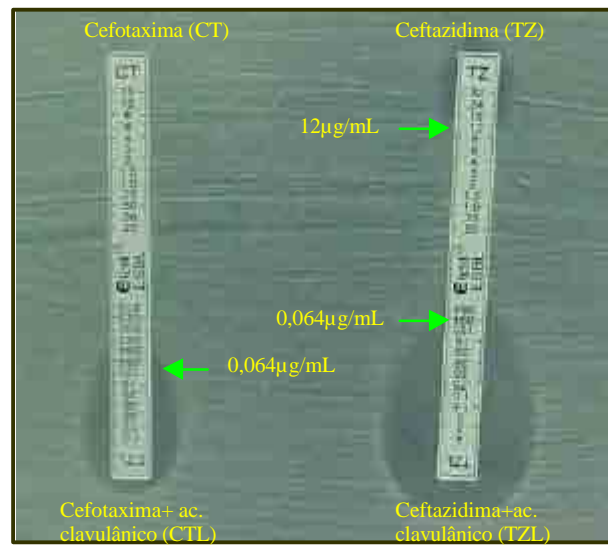


Figura 15 - Foto ilustrativa do método Etest demonstrando a produção de ESBL por *Enterobacter cloacae* pela fita contendo ceftazidima (12,0?g/ml) e ceftazidima+ácido clavulânico (0,064?g/ml). Os antimicrobianos cefotaxima e cefotaxima+ácido clavulânico foram resistentes e cefotaxima+ácido clavulânico (0,064?g/ml).

Tabela 8- Cepas de enterobactérias produtoras e não de ESBL aplicação do método E-test² ESBL (teste fenotípico confirmatório)

Cepas	CAZ-CAZ+AC	CTX-CTX+AC	PM-PM+AC	ESBL
<i>C. freundii</i> 01	indeterminado	indeterminado	indeterminado	indeterminado
<i>C. freundii</i> 02	indeterminado	indeterminado	ausente	indeterminado
<i>E. aerogenes</i> 01	indeterminado	indeterminado	ausente	indeterminado
<i>E. aerogenes</i> 02	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. aerogenes</i> 03	indeterminado	indeterminado	ausente	indeterminado
<i>E. aerogenes</i> 04	indeterminado	indeterminado	indeterminado	indeterminado
<i>E. cloacae</i> 01	presente	indeterminado	indeterminado	positivo
<i>E. cloacae</i> 02	presente	indeterminado	ndeterminado	positivo
<i>E. sakazakii</i> 01	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 01	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 02	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 03	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 04	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 05	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 06	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 07	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 08	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 09	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 10	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 11	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 12	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 13	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 14	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 15	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 16	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 17	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 18	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>E. coli</i> 19	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>K. pneumoniae</i> 01	presente	presente	presente	positivo
<i>K. pneumoniae</i> 02	presente	presente	presente	positivo
<i>P. mirabilis</i> 01	indeterminado	indeterminado	ausente	indeterminado
<i>P. mirabilis</i> 02	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>P. mirabilis</i> 03	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>P. rettgeri</i> 01	ausente	ausente	ausente	negativo
<i>S.marcescens</i> 01	presente	indeterminado	indeterminado	positivo
Total ESBL				05

[CAZ-CAZ+AC] ceftazidima-ceftazidima+ácido clavulânico;

[CTX-CTX+AC] cefotaxima-cefotaxima+ácido clavulânico;

[PM-PML+AC]cefepime-cefepime+ácido clavulânico

Os resultados do Etest mostraram que produzem a enzima ESBL duas cepas de *Enterobacter cloacae*, duas *Klebsiella pneumoniae* e uma *Serratia marcescens*.

Os resultados do método dos discos combinados estão apresentados na Tabela 9 e Figuras 16-17.

Tabela 9- Cepas de enterobactérias produtoras e não de ESBL verificado pelo método Discos Combinados (Teste fenotípico confirmatório)

Cepas	(CPD+AC) - (CPD)= =5mm	(CAZ+AC) - (CAZ)= =5mm	(CTX+AC) - (CTX)= =5mm	ESBL
<i>C. freundii</i> 01	N	N	N	negativo
<i>C. freundii</i> 02	N	N	N	negativo
<i>E. aerogenes</i> 01	N	N	N	negativo
<i>E. aerogenes</i> 02	N	N	N	negativo
<i>E. aerogenes</i> 03	N	N	N	negativo
<i>E. aerogenes</i> 04	N	N	N	negativo
<i>E. cloacae</i> 01	S	S	S	positivo
<i>E. cloacae</i> 02	S	S	S	positivo
<i>E. sakazakii</i> 01	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 01	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 02	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 03	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 04	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 05	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 06	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 07	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 08	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 09	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 10	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 11	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 12	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 13	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 14	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 15	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 16	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 17	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 18	N	N	N	negativo
<i>E. coli</i> 19	N	N	N	negativo
<i>K.pneumoniae</i> 01	S	S	S	positivo
<i>K.pneumoniae</i> 02	S	S	S	positivo
<i>P. mirabilis</i> 01	N	N	N	negativo
<i>P. mirabilis</i> 02	N	N	N	negativo
<i>P. mirabilis</i> 03	N	N	N	negativo
<i>P. rettgeri</i> 01	N	N	N	negativo
<i>S. marcescens</i> 01	S	S	S	positivo
Total ESBL				05

CPD:cefepodoxima; CAZ:ceftazidima; CTX:cefotaxima; AC:ác. Clavulânico

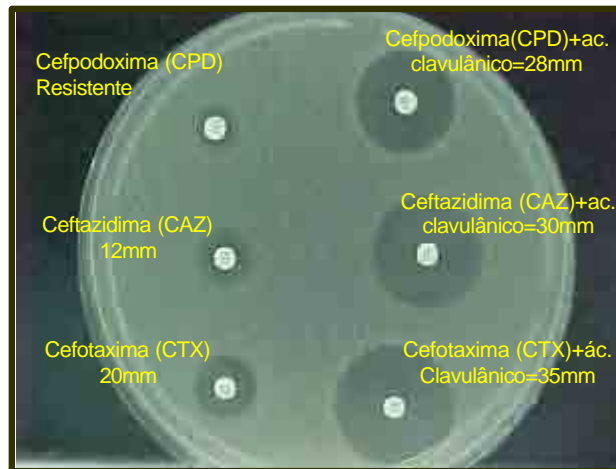


Figura 16 - Foto ilustrativa do método do disco combinado (Oxoid) demonstrando a produção de ESBL por *Klebsiella pneumoniae*, a leitura do teste fenotípico confirmatório baseou-se na resultante (?5mm) entre a diferença do halo do disco contendo cefalosporina combinada com ácido clavulânico e cefalosporina não combinada.

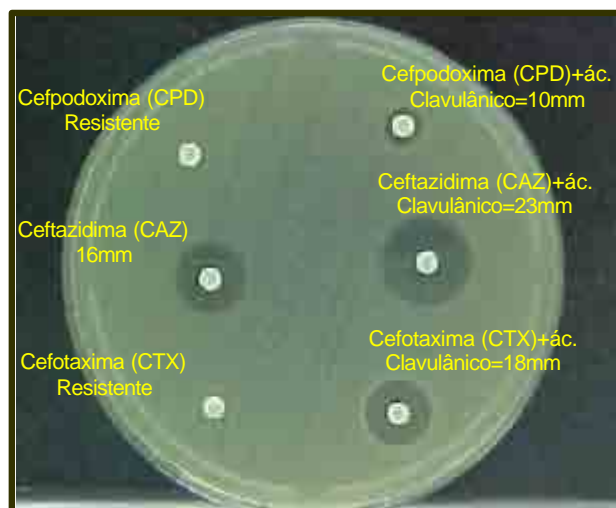


Figura 17 - Foto ilustrativa do método do disco combinado (Oxoid) demonstrando a produção de ESBL por *Serratia marcescens*, a leitura do teste fenotípico confirmatório baseou-se na resultante (?5mm) entre a diferença do halo do disco contendo cefalosporina combinada com ácido clavulânico e cefalosporina não combinada.

Os resultados do método dos discos combinados mostraram que cinco cepas foram produtoras de ESBL, duas cepas *Enterobacter cloacae*, duas *Klebsiella pneumoniae* e uma *Serratia marcescens*.

Os resultados testes de sensibilidade/resistência aos antimicrobianos mostraram que: *Enterobacter cloacae* (amostra 01)

Sensíveis: Amicacina, Imipenem e Tetraciclina.

Resistentes: Amoxicilina+ácido clavulânico, Ampicilina, Cefalotina, Cefazolina, Cefepime, Cefuroxima, Cefoxitina, Kanamicina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Gentamicina, Trimetoprim, Ofloxacina, Ácido Nalidíxico, Tobramicina, Sulfametoxazol-Trimetoprim, Netilmicina, Nitrofurantoina, Ácido Pipemídico.

Enterobacter cloacae (amostra 02)

Sensíveis: Amoxicilina+ácido clavulânico, Amicacina, Cefepime, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Gentamicina, Imipenem, Ofloxacina, Ácido Nalidíxico, Tetraciclina, Nitrofurantoína e Ácido pipemídico.

Resistentes: Ampicilina, Cefalotina, Cefazolina, Cefuroxima, Cefoxitina, Kanamicina, Trimetoprim, Tobramicina, Sulfametoxazol-Trimetoprim, Netilmicina.

Klebsiella pneumoniae (amostra 01)

Sensíveis: Amicacina, Cefepime e Imipenem.

Resistentes: Amoxicilina+ácido clavulânico, Ampicilina, Cefalotina, Cefazolina, Cefuroxima, Cefoxitina, Kanamicina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Gentamicina, Trimetoprim, Ofloxacina, Ácido Nalidíxico, Tobramicina, Sulfametoxazol-Trimetoprim, Netilmicina, Nitrofurantoína e Ácido pipemídico.

klebsiella pneumoniae (amostra 02)

Sensíveis: Amoxicilina+ácido clavulânico, Amicacina, Cefoxitina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Gentamicina, Imipenem, Ofloxacina, Ácido Nalidíxico, Tetraciclina, Nitrofurantoína e Ácido Pipemídico.

Resistentes: Ampicilina, Cefalotina, Cefazolina, Cefuroxima, Kanamicina, Trimetoprim, Tobramicina, Sulfametoxazol-Trimetoprim, Netilmicina.

Serratia marcescens

Sensíveis: Amicacina, Kanamicina, Ciprofloxacina, Gentamicina, Imipenem, Ofloxacina, Ácido Nalidíxico, Tobramicina, Netilmicina e Ácido Pipemídico.

Resistentes: Amoxicilina+ácido clavulânico, Ampicilina, Cefalotina, Cefazolina, Cefuroxima, Cefoxitina, Cloranfenicol, Trimetoprim, Sulfametoxazol-Trimetoprim, Nitrofurantoína.

De todas as *Enterobacteriaceae* testadas, cinco cepas foram capazes de produzir ESBL como ficou demonstrado pela aplicação de testes fenotípicos confirmatórios: *double-disc*, *Etest* e discos combinados. A distribuição de espécies ESBL positivas foram: *Enterobacter cloacae* (duas cepas), *Klebsiella pneumoniae* (duas cepas) e *Serratia marcescens* (uma cepa). Todas as cepas ESBL positivas foram resistentes a ampicilina, cefalotina, cefazolina, cefuroxima, sulfametoxazol-trimetoprim e trimetoprim, 4 cepas resistentes a ceftioxima e cefepime, 3 cepas resistentes a amoxicilina associada ao ácido clavulânico, cloranfenicol e nitrofurantoína, como mostrado na Tabela 10.

Tabela 10 - Medida dos halos dos antimicrobianos para 5 cepas de enterobactérias produtoras de ESBL

Cepas	Antimicrobianos										
	AMC	AMI	AMP	CFL	CFZ	CPM	CRX	CFO	KAN	CIP	CLO
<i>E. cloacae</i> 01	R	19	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>E. cloacae</i> 02	15	17	R	R	R	12	R	R	R	32	28
<i>K.pneumoniae</i> 01	R	18	R	R	R	19	R	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i> 02	22	18	R	R	R	R	R	21	R	32	28
<i>S. marcescens</i> 01	R	27	R	R	R	R	R	R	26	33	R
halos resistentes (mm)	=13	=14	=13	=14	=14	=14	=14	=13	=13	=15	=12

continuação da Tabela 10

Cepas	Antimicrobianos										
	GEN	IPM	TRI	OFX	NAL	TOB	TET	SUT	NET	NIT	PIP
<i>E. cloacae</i> 01	R	28	R	R	R	R	19	R	R	R	R
<i>E. cloacae</i> 02	20	23	R	36	26	R	20	R	R	22	28
<i>K.pneumoniae</i> 01	R	19	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i> 02	19	26	R	30	24	R	22	R	R	25	28
<i>S. marcescens</i> 01	23	24	R	32	16	19	13	R	24	R	14
halos resistentes (mm)	=12	=13	=10	=12	=13	=12	=14	=10	=12	=14	=13

5-DISCUSSÃO

Os estudos da presente pesquisa indicam que a *Escherichia coli* é ainda a mais comum causa de infecção urinária adquirida na comunidade. Dado consistente com o de outros estudos (HENRY et al. 1998; GALES et al. 2000; HRYNIEWICZ et al., 2001). Gales et al. (2000) mostraram que 47,5% do total de microrganismos que causam a infecção urinária foram isolados de pacientes com infecções adquiridas na comunidade, enquanto que 22,1% foram infecções adquiridas em hospital. Ainda, a prevalência da infecção urinária é maior em mulheres adultas do que em homens.

Na presente pesquisa observou-se que 83% das cepas de enterobactérias isoladas eram de pacientes do sexo feminino e 17% do sexo masculino.

A maioria das infecções urinárias da comunidade devido à *E. coli* investigadas neste estudo foram sensíveis aos antimicrobianos como o sulfametoxazol-trimetoprim, norfloxacina, ciprofloxacina, nitrofurantoína, cefepime, ceftioxina, ácido pipemídico e ácido nalidíxico. Dados consistentes com outros autores indicando que *Escherichia coli* é ainda sensível a muitos agentes antimicrobianos comuns usados na prática geral (FLUIT et al., 1997; CUNNEY et al., 1992, JONES et al., 1999; HRYNIEWICZ et al., 2001).

No presente estudo observou-se que outras espécies de *Enterobacteriaceae*, como *Klebsiella pneumoniae* (amostra 01) isolada de paciente hospitalizado foi mais resistente. Dado concordante com estudos de outros autores (CUNNEY et al., 1992; VROMEN et al., 1999).

De acordo com M'Zali et al. (2000) os antibióticos beta lactâmicos de amplo espectro são comumente incluídos nos tratamentos empíricos das infecções causadas por bacilos Gram-negativos. A emergência de bactérias produtoras de

beta-lactamase de espectro estendido constitui-se em séria ameaça ao uso continuado desta família de antibióticos. Cormican et al. (1998) relataram que a multirresistência bacteriana está relacionada com a produção da enzima beta-lactamase de amplo espectro, em cepas isoladas em comunidade e hospital.

Observou-se na presente pesquisa que as ESBLs foram produzidas com mais frequência entre as cepas de *Klebsiella pneumoniae* do que pelas cepas de *Escherichia coli*, concordando com os dados obtidos por outros autores (ZEMMELMAN et al. 2001). Os microrganismos produtores de ESBL estão associados com a assistência à saúde pública (BRADFORD, 2001).

De acordo com Linscott e Brown (2005) o laboratório de microbiologia clínica tem a tarefa de fazer o *screening* e confirmar a produção de ESBL de microrganismos isolados de material biológico. O desafio do laboratório é detectar ESBL em microrganismos Gram-negativos, porque eles podem ser sensíveis *in vitro* para certos agentes antimicrobianos beta-lactâmicos o que resulta na falha clínica do tratamento.

Na presente pesquisa, as trezentas cepas estudadas para a produção de ESBL foram caracterizadas pela análise do padrão de antibiótico resistência (Apêndice A) e para o *screening* inicial de bactérias produtoras de ESBL indicadores foram os seguintes antimicrobianos: aztreonam (30?g), ceftazidima (30?g), cefotaxima (30?g) e ceftriaxona (30?g) em placas contendo ágar Muller Hinton.

O CLSI (NCCLS 2005) recomenda para a triagem inicial de produção de ESBL para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* os antimicrobianos: cefpodoxima (10?g) ou ceftazidima (30?g) ou aztreonam (30?g) ou cefotaxima (30?g) ou ceftriaxona (30?g) em placas contendo ágar Mueller Hinton. O

uso de vários agentes antimicrobianos aumenta a sensibilidade da detecção de ESBL (CLSI [NCCLS] 2005).

Deve-se observar que a terminologia CLSI usada neste texto corresponde a terminologia de NCCLS, o documento passou a ser denominado CLSI em 2005, as tabelas de leitura lançadas em janeiro de 2005 (M100-S15) já contém essa terminologia e o caderno novo será lançado em 2006 (ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

Na presente pesquisa a suspeita de microrganismos produtores de ESBL foi obtida por medida dos halos dos antimicrobianos selecionados para o *screen* teste inicial, a leitura dos halos teve por referência os padrões aztreonam (=27mm); ceftazidima (=22mm); cefotaxima (=27mm); ceftriaxona (=25mm) como indicado por CLSI (2005). Tomando-se por base este indicador, observou-se neste estudo que no *screen* teste inicial de 218 cepas de *E. coli*, 19 (8,71%) eram suspeitas de produzirem ESBL e foram avaliadas com os testes confirmatórios, e as duas cepas de *Klebsiella pneumoniae* foram resistentes e ou apresentaram halos de leitura menores do que o preconizado aos quatro antimicrobianos do teste de triagem (aztreonam =27mm; ceftazidima =22mm; cefotaxima =27mm e ceftriaxona =25mm)(Tabela 5).

Embora o *screen* teste inicial tenha sido padronizado para *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, na presente pesquisa a detecção de ESBL foi considerada para o grupo CESP (*Citrobacter* sp, *Enterobacter* sp., *Serratia* sp. e *Providencia* sp) devido a importância clínica que apresentam. Segundo Rossi e Andreazzi (2005) a detecção de ESBL em outras cepas que não *E. coli* e *Klebsiella* sp. deve ser considerada, pois o grupo CESP (*Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp. e *Providencia* sp.), *Morganella morganii* e *Pseudomonas aeruginosa* possuem o gene que codifica a produção de beta-lactamase AmpC, o que

caracteriza um mecanismo de resistência intrínseco. Estas cepas constituem as cepas de importância clínica que produzem um outro tipo de beta-lactamase a AmpC.

Adicionando outras informações observou-se no presente estudo que cepas de *Proteus mirabilis* (amostras 01, 02 e 03) no *screen* inicial (Tabela 6) eram suspeitas de produzirem ESBL. No entanto, o teste de triagem para produção de ESBL por *Proteus mirabilis* não é recomendado, na rotina. Sugere-se este teste apenas quando o isolado é clinicamente relevante, ou seja, em caso de bacteriemia e os antimicrobianos ceftazidima ($\leq 22\text{mm}$), cefotaxima ($\leq 27\text{mm}$) ou cefpodoxima ($\leq 17\text{mm}$) farão uma identificação presuntiva de produção de ESBL. A confirmação fenotípica do teste será realizada com os antimicrobianos ceftazidima e cefotaxima combinada ou não com ácido clavulânico e poderá confirmar as cepas produtoras de ESBL. Para todas as cepas de *Proteus mirabilis* produtoras de ESBL no resultado do antibiograma será reportado que a cepa é resistente para todas as penicilinas, cefalosporinas e aztreonam (CLSI 2005).

No presente estudo os testes fenotípicos confirmatórios foram realizados em placas contendo Mueller Hinton ágar e os discos cefotaxima (CTX-30?g) ou ceftazidma (CAZ-30?g) sozinhos, ou seja não associado ao ácido clavulânico; cefotaxima (CTX-30?g) associada ao ácido clavulânico (AC-10?g) e ceftazidma (CAZ-30?g) associada ao ácido clavulânico (AC-10?g) CLSI (2005).

Linscott e Brown (2005) notificam que os testes confirmatórios devem ser realizados para o *screening* de microrganismos para indicar produção de ESBL e os testes fenotípicos confirmatórios são direcionados para *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* contra a ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX) não combinadas e

combinados com ácido clavulânico (cefotaxima+ácido clavulânico e ceftazidima+ácido clavulânico).

No presente estudo, a confirmação fenotípica de produção de ESBL foi realizada com três testes confirmatórios disponíveis no comércio: (1) sinergismo ou *double-disk*: em que usa aztreonam, amoxicilina+ácido clavulânico, cefotaxima ceftazidima e ceftriaxona; (2) Etest: fita contendo ceftazidima em uma extremidade e na outra ceftazidima combinada com ácido clavulânico e cefotaxima versus cefotaxima/ácido clavulânico; (3) disco combinado: cefotaxima e cefotaxima+ácido clavulânico, ceftazidima e ceftazidima+ácido clavulânico e cefpodoxima e cefpodoxima+ácido clavulânico. De acordo com Linscott e Brown (2005) os discos de cefotaxima (CTX) e ceftazidima (CAZ) com e sem ácido clavulânico são testados para assegurar a detecção da produção de ESBL.

O teste de aproximação ou *double-disk* ou teste do sinergismo foi usado na presente pesquisa e permitiu detectar 5 (1,66%) cepas produtoras de ESBL, na leitura do teste aparece “zona fantasma” ou “truncada” de uma distância de 30mm entre os discos de cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona) e amoxicilina+ácido clavulânico e aztreonam (Figuras 10-12). Este método indicou que as ESBLs foram produzidas por *K. pneumoniae*, *E. cloacae* e *S. marcescens*. O teste do sinergismo não acusou a presença de *E. coli* produtoras de beta-lactamase de espectro estendido entre as cepas isoladas de infecção urinária de pacientes de comunidade. Todos os antimicrobianos utilizados, neste método, demonstraram atividade alta. Nesta pesquisa a sensibilidade do teste foi de 100% e especificidade 100%. De acordo com Pereira et al. (2003) em 134 isolados de *K. pneumoniae* a ceftazidima apresentou 97,3% de sensibilidade (em duas cepas a ceftazidima não detectou produção de ESBL), a sensibilidade do aztreonam foi de 94,7% (em quatro

cepas não foi detectada a ESBL) e as cefalosporinas (cefotaxima e ceftriaxona) apresentaram 100% de sensibilidade e especificidade.

No presente estudo usou-se o Etest como teste fenotípico confirmatório de produção de ESBL por cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas de infecção do trato urinário de pacientes de comunidade e hospitalar. Observou-se que de 300 cepas estudadas, a produção de ESBL por Etest foi confirmada em cinco cepas (*K. pneumoniae*, *E. cloacae* e *S. marcescens*). A figura 14 ilustra a comparação da concentração inibitória mínima de ceftazidima não combinada com a ceftazidima combinada ao ácido clavulânico para *Serratia marcescens*. Houve a inibição da cepa na presença de ácido clavulânico. É preconizado que a produção de ESBL é considerada positiva quando a relação da ceftazidima (TZ) e ceftazidima+ácido clavulânico (TZL) ou cefotaxima (CT) e cefotaxima+ ácido clavulânico (CTL) for maior do que 8 (ROSSI e ANDREAZZI, 2005). Este estudo mostra que o antimicrobiano ceftazidima detecta mais microrganismos produtores de beta-lactamase do que a cefotaxima. Dados consistentes com Cormican et al. (1996).

Na presente pesquisa foi usado o método do disco combinado (Oxoid) para detectar beta-lactamase de espectro estendido, neste método foram utilizados os discos de cefotaxima (CTX-30?g) e cefotaxima+ácido clavulânico (CTX-30?g+AC-10?g); ceftazidima (CAZ-30?g) e ceftazidima+ácido clavulânico (CAZ-30?g+AC-10?g) e cefpodoxima (CPD-10?g) com cefpodoxima+ácido clavulânico (CPD10?g+AC1?g) e depende da comparação do diâmetro das zonas de inibição dos discos. A diferença de ?5mm entre o diâmetro dos halos de inibição dos discos cefotaxima (CTX-30?g) e o combinado cefotaxima+ácido clavulânico (CTX-30?g+AC-10?g) ou ceftazidima (CAZ-30?g) e ceftazidima+ácido clavulânico (CAZ-30?g+AC-10?g) ou cefpodoxima (CPD-10?g) com cefpodoxima+ácido clavulânico

(CPD10?g+AC1?g) indicaram a produção de ESBL, ou seja, os resultados foram interpretados como positivos, de acordo com as instruções do NCCLS (2005).

Aplicando-se este método, na presente pesquisa, foram consideradas positivas para produção de ESBL cinco cepas (*Enterobacter cloacae* (duas cepas), *Klebsiella pneumoniae* (duas cepas) e *Serratia marcescens* (uma cepa). A figura 16 ilustra um teste positivo de *Klebsiella pneumoniae* para ESBL confirmada por ceftazidima (CAZ-30?g) com cefotaxima+ácido clavulânico (CAZ-30?g+AC10?g), a leitura do halo de inibição de cefotaxima foi igual a 12 e da cefpodoxima+ácido clavulânico igual a 30, a diferença entre 30 e 12=18mm. A figura 17 ilustra a produção de ESBL pelo teste fenotípico confirmatório com ceftazidima (CAZ-30?g) e ceftazidima+ácido clavulânico (CAZ-30?g+AC-10?g) para *Serratia marcescens*. Os dados obtidos utilizando o teste dos discos combinados mostraram que na presente pesquisa os antimicrobianos (cefpodoxima, ceftazidima e cefotaxima) e os seus combinados com ácido clavulânico confirmaram a positividade de ESBL em 14,28% das cepas suspeitas. Dados divergentes de outros autores M'Zali et al.(2000) mostraram que ceftazidima e ceftazidima/ácido clavulânico detectou 86% das cepas produtoras de ESBL e cefotaxima e cefotaxima/ácido clavulânico detectou 66% das cepas produtoras de ESBL. As cepas estudadas na presente pesquisa eram provenientes de pacientes com infecção urinária, daí a notada diferença com outras pesquisas.

De acordo com CLCSI (2005) e Rossi e Andreazzi (2005) as cepas de *E. coli* e *Klebsiella* sp. que produzem a beta-lactamase de espectro estendido (ESBLs) podem ser clinicamente resistentes à terapia com penicilinas, cefalosporinas ou aztreonam, apesar da aparente sensibilidade *in vitro* para quaisquer destes agentes. Após o teste de *screening* e o teste confirmatório, o laboratório clínico deve

interpretar e liberar o resultado de cepas produtoras de ESBL como resistente para: penicilinas, cefalosporinas e aztreonam.

No presente estudo o teste fenotípico confirmatório de produção de ESBL entre as cepas CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* e *Providencia rettgeri*) foi positivo para *Enterobacter cloacae* e *Serratia marcescens* em três testes: *double-disk*, Etest e discos combinados. A detecção de ESBL nestas cepas sugere a presença do gene que codifica a produção de beta-lactamase AmpC, de acordo com Rossi e Andreazzi (2005).

Uma dificuldade encontrada na avaliação de testes para a detecção de cepas produtoras de ESBL é o estabelecimento de um padrão-ouro, uma vez que algumas cepas expressam um grau de resistência muito baixo, ou, ainda, a produção de ESBL pode estar associada a outro mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos. Desta maneira, nenhum teste fenotípico pode ser considerado padrão-ouro, pois poderá apresentar resultados falsos positivos e falsos negativos (PEREIRA et al., 2003).

Para contornar essa situação muitos estudos utilizam uma combinação de testes como padrão-ouro. No presente estudo foram consideradas produtoras de ESBL as amostras que apresentaram teste de triagem positivo para qualquer antimicrobiano e que também foram positivas para pelo menos um dos três testes que avaliam o efeito do ácido clavulânico. O teste de triagem apresenta alta sensibilidade, enquanto os testes que avaliam o efeito do ácido clavulânico apresentam alta especificidade. Assim, essa combinação representa um padrão-ouro bastante adequado (PEREIRA et al., 2003).

Observou-se no presente estudo que os três métodos usados para a detecção de beta-lactamase em *Enterobacteriaceae* são aceitáveis para o uso

clínico. No entanto, os testes do sinergismo e do disco combinado são de execução e leitura fácil. O Etest é mais caro e requer muita habilidade para leitura dos halos de inibição. Todos os testes apresentam resultados confiáveis e pouco discordantes.

Dando continuidade a esta pesquisa outros estudos deverão ser realizados envolvendo outras técnicas, como a de formação de biofilme “in vitro”, resistência aos antimicrobianos e métodos moleculares.

6-CONCLUSÃO

A implementação dos testes fenotípicos na rotina laboratorial é fundamental na confirmação do mecanismo de resistência microbiana mediada por plasmídios, importante na expansão e multiplicação das beta-lactamases de espectro estendido (ESBL).

A interpretação correta do teste de sensibilidade aos antimicrobianos é fundamental para detectar a produção ESBL, auxiliando o clínico em um tratamento adequado e eficaz.

Os três testes fenotípicos utilizados (teste do sinergismo dupla difusão, E-test² ESBL, discos Combinados-Oxoid) detectaram cinco cepas produtoras de ESBL: *Enterobacter cloacae* (duas cepas), *Klebsiella pneumoniae* (duas cepas) e *Serratia marcescens* (uma cepa).

Foram encontradas cepas de bacilos Gram-negativos produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), na comunidade e hospital da região de Araraquara.

7-REFERÊNCIAS

AB BIODISK. Etest ESBL. Solna, 2000. 2 p. (Bula do teste).

AMATO, V. N.; LEVI, G. C.; LOPES, H. V.; MENDONÇA, J. S.; BALDY, J. L. S. **Antibióticos na prática médica**. 4. ed. São Paulo: Roca, 1994. 283p.

AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 289, p. 321-331, 1980.

APPLETON, A.; HALL, S. Comparison of three combination discs the detection of extended spectrum β -lactamases. **Inf. Tec.,Oxoid**, n. 28, p.1, 2001.

BLATT, J. M. Mecanismo de resistência e detecção das beta-lactamases de espectro ampliado. **NewsLab** p. 1-7, 2002. Disponível em <http://www.newslab.com.br/betalactamases.htm>. Acesso em 26 mar. 2002.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21 st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, n. 4, p. 933-951, 2001.

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

BUSH, K.; SINGER, S. B. Biochemical characteristics of extended broad spectrum β -lactamases. **Infection**, v.17, p. 429-433, 1989.

CARTER, M. W.; OAKTON, K. J.; WARNER, M.; LIVERMORE, D. M. Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiellae* with the oxoid combination disk method. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p. 4228-4232, 2000.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; twelfth informational supplement, M100-S15. Clinical Laboratory Standards Institute, Pensilvania.

COPAR, A.; PREVEC, T.; ANZIC, B.; MESAR, T.; SELIC, L.; VILAR, M.; SOLMAJER, T. Design, synthesis and bioactivity evaluation of tribactam β -lactamase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 12, p. 971-975, 2002.

CORMICAN, M. G.; MARSHALL, S. A.; JONES, R. N. Detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 1880-1884, 1996.

COULDRON, P. E.; MOLAND, E. S.; SANDERS, C. C. Occurrence and detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a veterans medical center: seek and you may find. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2593-2597, 1997.

CUNNEY, R. J.; MCNALLY, R. M.; MCNAMARA, E. M.; AL-ANSARI, N.; SMYTH, E. G. Susceptibility of urinary pathogens in a Dublin teaching hospital. **Irish Journal of Medical Science**, v. 161, p. 623-625, 1992.

DUARTE, C. R. P.; ROSA, M. M. C.; FREITAS, A. L. P. Indução de beta-lactamase e perfil de resistência em *Pseudomonas aeruginosa*. **NewsLab.**, v.53, p.92-98, 2002.

EHRHARDT, A. F.; SANDERS, C. C.; MOLAND, E. S. Use of an isogenic *Escherichia coli* panel to design tests for discrimination of β -lactamase functional groups of *Enterobacteriaceae*. **Antimicrob. Agents. Chemother.** v. 43, p. 630-633, 1999.

ESSACK, S. Y. Laboratory detection of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)-the need for a reliable, reproducible method. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 37, p. 293-295, 2000.

Etest: para determinação de CIM de antibióticos. Disponível em <http://www.probac.com.br/etest.html>. Acesso em 16 abr. 2002.

FARMER, T. H.; DEGNAN, B. A.; PAYNE, D. J. Penetration of β -lactamase inhibitors into the periplasm of Gram-negative bacteria. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 176, p. 11-15, 1999.

FLUIT, A. C.; JONES, M. E.; SCHMITZ, F. J.; ACAR, J.; GUPTA, R.; VERHOEF, J. Antimicrobial resistance among urinary tract infection (UTI) isolates in Europe: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, p. 147-152, 1997.

FUNG-TOMC, J. C. Fourth-generation cephalosporins. **Clin. Microbiol. News.** , v. 19, p. 129-136, 1997.

FUNG-TOMC, J. C.; GRADELSKI, E.; HUCZKO, E.; DOUGHTERTY, T. J.; KESSLER, R. E.; BONNER, D. P. Differences in the resistant variants of *Enterobacter cloacae* selected by extended-spectrum cephalosporins. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, p. 1289-1293, 1996.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; GORDON, K. A.; SADER, H. S.; WILKE, W. W.; BEACH, M. L.; PFALLER, M. A.; DOERN, G. V.; SENTRY STUDY GROUP (Latin America). **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 45, p. 295-303, 2000.

GARAU, J.; BLANQUER, J.; COBO, L.; CORCIA, S.; DAGUERRE, M.; LEON, C.; RELLO, J. Prospective, randomized, multicentre study of meropenem versus imipenem/cilastatin as empiric monotherapy in severe nosocomial infections. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 16, p. 789-796, 1997.

GARCIA, P. C. Resistencia bacteriana en Chile. **Rev. Chil. Infect.**, v. 20, p. 11-23, 2003.

GIBB, A. P.; CRICHTON, M. Cefpodoxime screening of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. by Vitek for detection of organisms producing extended-spectrum β -lactamases. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 38, p. 255-257, 2000.

GOMES, A. C. L. F.; MARTINEZ, R. Detecção de enterobactérias produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) em amostras de sangue, cateter e outros materiais biológicos de pacientes do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCFMRP). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: Armazém das Letras, 2001. p.75.

GRUTEKE, P.; GOESSENS, W.; GILS, J.; PEERBOOMS, P.; TOOM, N. L.; SANTEN-VERHEUVEL, M.; BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Patterns of resistance associated with integrons, the extended spectrum β -lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1161-1166, 2003.

HADZIYANNIS, E.; TUOHY, M.; THOMAS, L.; PROCOP, G. W.; WASHINGTON, J. A.; HALL, G. S. Screening and confirmatory testing for extended spectrum β -lactamases (ESBL) in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 36, p. 113-117, 2000.

HALL, M. A. L.; FLUIT, A. C.; PAAUW, A.; BOX, A. T. A.; BRISSE, S.; VERHOEF, J. Evaluation of the E-test and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum β -lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p. 3703-3711, 2002.

HERRERA, M. L.; DUARTE, M. I. Primeros aislamientos de *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasa de efecto expandido (ESBL) en Costa Rica. **Rev. Méd. Hosp.. Nac. Niños Costa Rica**, v. 33, 1998.

HONÓRIO, L. C.; SANTOS I. B.; ASSIS, A. M. L.; SANTOS, FILHO, L. Análise do perfil de resistência de enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) isoladas em João Pessoa, PB. **RBAC**, v. 33, p. 179-182, 2001.

HRYNIEWICZ, K.; SZCZYPA, K.;SULIKOWSKA, A.; JANKOWSKI, K.; BETLEJEWSKA, K.; HRYNIEWICZ, W. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from urinary tract infections in Poland. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, p. 773-780, 2001.

IMPLICAÇÕES terapêuticas da resistência bacteriana: beta-lactamases de espectro ampliado. Disponível em: <http://www.apecih.org.br/page3.html>. Acesso em : 16 abr. 2002.

INFORME TÉCNICO OXOID nº 28 OX/BR

JACOBY, G. A.; CARRERAS, I. Activities of β -lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 34, p. 852-862, 1990.

JACOBY, G. A.; HAN, P. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 908-911, 1996.

JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. More extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrob. Agents. Chemoter.**, v. 35, p. , 1697-1704, 1991.

JARLIER, V.; NICOLAS, M.H.; FOURNIER, G.; PHILIPPON, A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Rev. Infect. Dis.**, v. 10, p. 867-878, 1988.

JONES, R. N.; KUGLER, K.C.; PFALLER, M. A.; WINOKUR, P. L. Characteristics of pathogens causing urinary tract infections in hospitals in North America: results from the sentry antimicrobial surveillance program. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 35, p. , 55-63, 1997.

KATSANIS, G. P.; SPARGO, J.; FERRADO, M. J.; SUTTON, L.; JACOBY, G. A. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 691-696, 1994.

KLIEBE, C.; NIES, B. A.; MEYER, J. F.; TOLXDORFF-NEUTZLING, R. M.; WIEDEMANN, B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.28, p. 302-307, 1985.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465p.

LABORATÓRIO Especial de Microbiologia Clínica - UNIFESP Programa Bristol de qualidade em Microbiologia Clínica LEMC-<http://www.unifesp.br/dmed/dipa/lemc/bristolTeste12.htm>). Acesso em: 4 out. 2004.

LEE, K.; LIM, J. K.; YONG, D.; YUM, J.; CHONG, Y.; OKAMOTO, R; INOUE, M. Evaluation of efficiency of screening extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in hospitals where the bacteria are increasingly prevalent. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 3696-3699, 2001.

LINSCOTT, A. J.; BROWN, W.J. Evaluation of four commercially available extended spectrum beta-lactamase phenotypic confirmation tests. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 1081-1185, 2005.

LIVERMORE, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 557-584, 1995.

MEYER, K. S.; URBAN, C.; EAGAN, J. A.; BERGER, B. J.; RAHL, J. J. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late generation cephalosporins. **Ann. Intern. Med.**, v. 119, p. 353-358, 1993.

MICROBIOLOGIA aplicada: dicas para identificação. Disponível em <http://www.saudetotal.com/microbiologia/dicas.htm>. Acesso em 01 ago. 2002.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia médica.** 2. ed. São Paulo: Manole, 1999. 584p.

MOOSDEN, F. The evolution of resistance to cephalosporins. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 487-493, 1997.

MORALES, R. Terapia de bacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido. **Rev. Chil. Infect.**, v. 20, p. 20-27, 2003.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 604p.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology.** 8. ed. Washington, D.C., USA, ASM Press, 2003, vol 1 & 2.

M'ZALI, F. H.; CHANAWONG, A.; KERR, K.G.; BIRKENHEAD, D.; HAWKEY, P. M. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the MAST DD test, the double disk and the Etest ESBL. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 45, p. 881-885, 2000.

NAMIUK, L.; SAMET, A.; DZIEMASZKIEWICZ, E. Cefepime *in vitro* activity against derepressed extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing and non- ESBL-producing *Enterobacter cloacae* by a disc diffusion method. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 48, p. 321-322, 2001.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; ninth informational supplement M100- S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; twelfth informational supplement, M100-S13. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pensilvania.

NEUWIRTH, C.; SIEBOR, E.; LOPEZ, J.; PECHINOT, A.; KAZMIERCZAK, A. Outbreak of TEM-24 producing *Enterobacter aerogenes* in an intensive care unit dissemination of the extended-spectrum β -lactamase to other members of the family *Enterobacteriaceae*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 76-79, 1996.

NUESCH-INDERBINEN, M. T.; HACHLER, H., KAYSER, F. H. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV β -lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the Etest. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 15, p. 398-402, 1997.

PAGANI, L.; MIGLIAVACCA, R.; PALLECCHI, L.; MATTI, C.; GIACOBONE, E.; AMICOSANTE, G.; ROMERO, E.; ROSSOLINI, G. M. Emerging extended-spectrum β -lactamases in *Proteus mirabilis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1549-1552, 2002.

PATERSON, D.L.; YU, V.L. Extended-spectrum B-lactamases: a call for improved detection and control. **Clin. Infect. Dis.**, v. 29, p. 1419-1422, 1999.

PELOSO, P. F.; LEITE, C. C. F.; SILVA, H. P.; FILHO, H. M. T. Importância da utilização de metodologias para a detecção de ESBL em espécies de enterobactérias. **Labor News**, p. 30-30, 2005.

PEREIRA, A. S.; CARMO, J. R. F.; TOGNIM, M. C. B.; SADER, H. S. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *K. pneumoniae* produtora de betalacamase de espectro estendido. **J. Brás. Patol. Med. Lab.**, v. 39, p. 301-309, 2003.

PERILLI, M.; AMICO, E.; SEGATORE, B.; MASSIS, M. R.; BIANCHI, C.; LUZZARO, F.; ROSSOLINI, G. M.; TONIOLO, A.; NICOLETTI, G.; AMICOSANTE, G. Molecular characterization of extended-spectrum B-lactamases produced by nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from an Italian nationwide survey. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 611-614, 2002.

PHILIPPON, A.; ARLET, G.; LAGRANGE, P. H. Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamases. **J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 13, p. 17-29, 1994.

PITOUT, J. D. D.; SANDERS, C. C.; SANDERS, W. E. Antimicrobial resistance with focus on β -lactam resistance in Gram-negative bacilli. **Am. J. Med.**, v. 103, p. 51-59, 1997.

POOLE, K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. **J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.**, v. 92, p. 55-64, 2002.

POTTUMARTHY, S.; DESHPANDE, L. M.; SADER, H. S.; JONES, R. N. Reevaluation of the cefepime minimal inhibitory concentrations and disk diffusion test zone diameter relationship for a worldwide collection of Enterobacteriaceae enriched for extended-spectrum β -lactamase-producing organisms. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 52, p. , 95-99, 2005.

PUJOL, M.; PEÑA, C. El significado de las betalactamasas de espectro extendido. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 21, p. 69-71, 2003.

QUINTEROS, M.; RADICE, M.; GARDELLA, N. RODRIGUEZ, M. M.; COSTA, N.; KORBENFELD, D.; COUTO, E.; GUTKIND, G. Extended-spectrum B-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, public hospitals. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, p. 2864-2867, 2003.

REIS, A. O.; GALES, A. C.; SADER, H. S. Detecção de betalactamasas pelo laboratório de microbiologia clínica. Disponível em <http://www.bristol.com.br/medicos/infocientifica/o/deteccao.htm> Acesso em 27 mar. 2002.

RICHMOND, M. H.; SYKES, R. B. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. **Adv. Microb. Physiol.**, v. 9, p. 31-88, 1973.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana aplicada à microbiologia diagnóstica**. São Paulo: Atheneu, 2004. 182p.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu, 2005. 118p.

SABATÉ, M.; MIRÓ, E.; NAVARRO, F.; VERGÉS, C.; ALIAGA, R.; MIRELIS, B.; PRATS, G. β -Lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 49, p. 989-997, 2002.

SADER, H. S.; MIMIÇA, I.; ROSSI, F.; ZOCCOLI, C.; MONTELLI, A.C.; SAMPAIO, J. L. M.; SEGURA, A. J. A.; MAGALHÃES, M.; NOWAKONSKI, A.; MENDES, C. M. F. Evaluation of the in vitro activity of cefepime compared to other broad-spectrum cephalosporins against clinical isolates from eighteen Brazilian hospitals by using the Etest. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 28, p. 87-92, 1997.

SALADIN, M.; CAO, V. T. B.; LAMBERT, T.; DONAY, J; HERRMANN, J.; OULD-HOCINE, Z.; VERDET, C.; DELISLE, F.; PHILIPPON, A.; ARLET, G. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. **FEMS. Microbiol. Lett.**, v. 209, p. 161-168, 2002.

SANDERS, C. C.; BARRY, A. L., WASHINGTON, J. A.; SHUBERT, C.; MOLAND, E. S.; TRACZEWSKI, M. M.; KNAPP, C.; MULDER, R. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* with the vitek ESBL test. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 2997-3001, 1996.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B; SPANU, T.; CICCAGLIONE, D.; ROMANO, L.; FIORI, B.; NICOLETTI, G.; ZANETTI, S.; FADDA, G. Characterization of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD Phoenix extended-spectrum β -lactamase detection method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1463-1468, 2003.

SENDA, K.; ARAKAWA, Y.; ICHIYAMA, S.; NAKASHIMA, K.; ITO, H.; OHSUKA, S.; SHIMOKATA, K.; KATO, N.; OHTA, M. PCR detection of metallo β -lactamase gene (bla imp) in Gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 2909-2913, 1996.

SHEHABI, A. A.; MAHAFZAH, A.; BAADRAN, I.; QADAR, F. A.; DAJANI, N. High incidence of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to extended-spectrum β -lactam drugs in intensive care units. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 36, p. 53-56, 2000.

SHEN, D.; BIEDENBACH, D. J.; WINOKUR, P. L.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N. Phenotypic and genotypic characterizations of Chinese strains of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactams. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p. 159-164, 1999.

SILVA, C. H. P. M. **Bacteriologia**: um texto ilustrado. Teresópolis: Eventos, 1999. 531p.

SILVA, C. H. P. M. Beta-lactamase de espectro estendido: definições, importância clínica e detecção laboratorial. **RBAC**, v. 32, n.3, p. 215-219, 2000a.

SILVA, C. H. P. M. Elaboration and evaluation of a new screening medium for detection and presumptive identification of extended-spectrum β -lactamase-producing organisms (ESBL). **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, n. 4, 2000b.

SIQUEIRA, F. S. Mecanismos de resistência a β -lactâmicos em *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev. Biom.**, p. , 24-27, 2002.

TENOVER, F.C., MOHAMMED, M.J.; GORTON, T.S.; DEMBECK, Z.F. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum β -lactamases: survey of laboratories in Connecticut. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 4065-70, 1999.

THOMSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The clustal x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

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

THOMSON, K. S.; MOLAND, E. S. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 3548-2554, 2001.

VAHABOGLU, H.; COSKUNKAN, F.; TANSEL, O.; OZTURK, R.; SAHIN, N.; KOKSAL, I.; KOEYBEK, B.; TATMAN-OTKUN, M.; LEBLEBICIOGLU, H.; OZINEL, M. A.; AKALIN, H.; KOCAGOZ, S.; KORTEN, V. Clinical importance of extended-spectrum β -lactamase (PER-1-type)- producing *Acinetobacter* spp and *Pseudomonas aeruginosa* strains. **J. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 642-645, 2000.

VERCAUTEREN, E.; DESCHEEMAER. P.; LEVEN, M.; SANDERS, C. C.; GOOSSENS, H. Comparison of screening methods for the detection of extended-spectrum β -lactamase and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. In a Belgian teaching hospital. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2191-2197, 1997.

VROMEN, M.; VAN DER VEN, A. J.; KNOLS. A. M.; STOBBERINGH, E. E. Antimicrobial resistance patterns in urinary tract isolates from nursing home residents. Fifteen years of data reviewed. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 44, p. 113-116, 1999.

WALSH, T. R.; BOLMSTRÖM, A.; QWÄRNSTRÖM, A.; GALES, A. Evaluation of a new E-test for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 2755-2759, 2001.

WIEDEMANN, B. An international perspective on antimicrobial resistance. **Am. J. Med.**, v. 99, p. 19-20, 1995a.

WIEDMANN, B. Unchanged antibacterial activity over years? **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, p. 5-12, 1995b.

WINOKUR, P. L.; CANTON, R.; CASELLAS, J. M.; LEGAKIS, N. Variações na prevalência de cepas que expressam um fenótipo da β -lactamase de espectro estendido e caracterização de isolados provenientes da Europa, das Américas e da região do Pacífico Oeste. **Clin. Infect. Dis. Suppl.** v. 32, p. 94-103, 2001.

YONG, D.; LEE, K.; YUM, J. H.; SHIN, H. B.; ROSSOLINI, G. M.; CHONG, Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 3798-3801, 2002.

ZEMELMAN, C.; BELLO, H.; DOMÍNGUEZ, M.; GONZÁLEZ, G; MELLA, S.; ZEMELMAN, R. Activity of cefepime, cefotaxime, ceftazidime, and aztreonam against extended-spectrum-producing isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from Chilean hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 40, p. 41-43, 2001.

8-APÉNDICE

AP

CEPA	AMC	ATM	CAZ	CTX	CRO	AMI	AMP	CFL	CFZ	CPM	CRX	CFK	KAN	CIP	CLO	GEN	IPM	TRI	OFX	NAL	TOB	TET	SUT	NET	NIT	PIP	SEXO	IDADE
E.coli1	18	28	29	27	28	18	R	R	17	23	18	22	R	27	22	18	18	R	26	22	16	20	R	19	20	24	F	24
E.coli2	22	26	28	28	29	24	R	22	26	39	25	28	27	36	30	24	32	R	35	32	22	24	R	25	28	30	F	65
E.coli3	20	26	24	28	29	18	R	16	19	26	20	20	17	24	R	16	20	R	23	21	15	15	R	18	18	19	F	40
E.coli4	24	30	23	24	30	20	16	14	18	27	18	16	20	28	23	20	26	22	30	24	17	20	28	23	19	24	F	17
E.coli5	24	32	25	27	31	22	20	22	20	28	22	20	20	30	24	20	26	22	30	22	18	22	26	21	28	24	F	40
E.coli6	22	26	24	26	26	20	R	20	22	26	20	20	20	28	22	18	26	R	25	22	18	R	R	20	20	21	F	28
E.coli7	20	27	22	28	28	18	20	18	21	30	20	20	19	32	21	22	22	R	24	24	15	18	R	16	19	24	F	41
E.coli8	21	27	24	23	30	17	R	R	18	28	22	23	17	30	24	16	22	25	30	28	14	18	20	16	23	26	F	65
E.coli9	24	27	27	26	25	20	18	19	21	24	19	20	19	30	23	18	22	24	26	22	17	20	24	20	24	25	F	28
E.coli10	22	32	27	25	27	18	R	15	18	30	10	24	19	32	26	19	28	26	32	28	16	21	23	24	27	28	F	28
E.coli11	25	27	24	28	28	19	18	18	23	28	18	21	20	28	21	20	28	21	30	28	18	18	24	20	22	24	F	22
E.coli12	20	27	22	26	26	18	R	18	17	28	18	24	19	27	R	18	21	R	26	28	17	R	R	20	19	26	F	6
E.coli13	24	30	27	26	28	21	20	20	24	28	22	23	21	34	28	20	29	30	32	30	19	22	30	21	22	26	F	33
E.coli14	25	26	26	28	29	20	R	21	21	28	21	20	18	25	28	24	22	18	30	22	18	22	24	20	20	24	F	44
E.coli15	20	29	22	31	30	20	R	16	19	26	19	23	19	31	24	24	24	R	30	24	17	20	R	19	22	24	F	7
E.coli16	17	27	24	27	27	23	R	R	17	24	19	20	17	33	26	20	22	R	27	25	19	20	R	21	18	24	F	5
E.coli17	18	28	22	27	26	25	R	18	19	28	18	22	19	28	28	20	22	R	28	25	19	21	R	20	21	25	F	1
E.coli18	18	28	22	29	27	19	R	R	14	26	20	21	R	R	R	R	24	R	R	R	R	R	R	19	28	R	M	48
E.coli19	20	28	24	27	28	21	R	14	15	26	20	21	20	28	26	21	22	26	26	23	19	R	27	20	20	22	F	7
E.coli20	25	30	28	30	28	19	R	16	20	29	20	22	20	25	24	21	24	R	26	23	17	R	R	22	21	24	F	28
E.coli21	24	30	26	30	30	19	R	R	R	29	19	23	20	27	24	17	25	R	28	26	16	R	R	20	21	26	F	43
E.coli22	24	28	25	29	28	20	R	16	18	28	20	20	19	25	23	18	23	R	25	20	16	R	R	20	21	24	F	37
E.coli23	23	30	26	30	30	20	30	20	24	32	20	24	20	34	26	19	25	20	30	26	22	17	26	22	25	28	F	37
E.coli24	24	34	26	32	30	20	20	20	24	38	20	24	22	40	26	20	30	20	27	30	20	18	28	20	26	26	F	11
E.coli25	24	30	28	29	26	24	20	18	21	28	26	22	22	32	30	22	28	R	32	28	19	R	R	22	23	28	F	56
E.coli26	28	30	26	30	26	20	R	15	19	25	17	20	19	28	22	19	23	R	21	23	17	R	R	20	21	26	F	18
E.coli27	16	32	24	28	29	19	R	17	15	30	18	20	22	29	24	18	28	23	26	30	19	R	R	21	23	25	F	27
E.coli28	22	30	28	28	28	22	22	20	23	30	22	25	20	30	26	21	28	20	26	28	19	17	27	20	22	26	F	22
E.coli28	23	30	28	29	30	17	18	17	20	28	20	20	18	30	24	18	22	24	29	26	16	18	25	19	22	26	F	39
E.coli29	22	30	27	31	32	24	R	21	24	30	20	28	24	35	24	26	31	R	32	28	22	24	R	24	30	26	F	39

E.coli30	28	30	28	30	33	20	22	20	24	32	21	24	20	28	24	18	28	28	30	27	19	20	30	20	30	25	F	39
E.coli31	22	32	31	32	36	20	R	27	22	17	23	28	20	30	R	20	30	R	28	30	19	R	12	22	25	25	F	9
E.coli32	24	31	27	30	32	20	R	19	24	34	20	24	22	34	27	22	30	R	34	32	20	R	12	24	24	31	F	13
E.coli33	22	32	28	31	32	20	R	18	20	26	20	23	19	25	24	20	32	R	29	26	17	18	11	20	24	30	F	31
E.coli34	21	30	26	28	29	22	19	18	20	30	20	22	18	26	R	16	23	R	22	22	17	20	R	20	22	22	F	44
E.coli35	26	34	30	30	30	23	24	22	24	34	24	23	23	34	20	23	30	R	26	24	19	19	22	24	22	24	F	37
E.coli36	20	30	29	29	29	22	R	18	23	34	22	20	23	32	29	20	30	R	29	28	21	R	R	22	30	28	F	64
E.coli37	22	32	30	28	34	20	R	R	16	26	15	R	22	36	25	19	26	R	30	24	19	20	R	22	20	23	F	34
E.coli38	25	30	25	29	31	10	19	18	22	28	20	21	20	26	24	20	24	25	23	24	18	20	24	20	20	23	F	26
E.coli39	25	32	29	32	33	23	20	20	22	32	24	21	21	29	22	22	24	22	26	28	20	20	20	23	26	24	F	45
E.coli40	22	32	28	29	30	24	22	20	24	34	22	26	24	32	26	20	25	R	28	23	21	R	R	22	23	24	F	23
E.coli41	24	30	30	30	31	20	24	18	24	32	24	24	20	36	24	20	29	27	33	27	18	18	28	24	22	R	F	7
E.coli42	24	32	26	30	31	21	14	24	23	28	14	16	16	22	29	19	30	R	20	R	28	17	R	24	22	R	F	62
E.coli43	22	29	24	30	30	24	R	20	24	38	24	26	24	36	36	22	32	R	32	30	22	21	R	24	29	30	F	79
E.coli44	24	30	28	34	30	22	23	21	26	33	21	26	23	33	28	19	28	R	30	25	20	22	24	21	25	28	F	85
E.coli45	24	34	30	32	30	22	R	19	24	34	20	24	21	31	26	21	30	R	33	32	20	19	R	22	23	28	F	33
E.coli46	20	30	30	32	31	22	R	20	23	32	22	24	20	34	R	19	28	30	34	30	20	R	R	22	25	26	F	22
E.coli47	21	31	24	34	30	24	R	19	22	34	20	22	22	34	30	22	30	28	34	30	20	20	32	24	28	30	F	58
E.coli48	21	30	25	30	29	22	R	18	22	34	20	22	R	33	24	21	31	R	34	26	20	R	21	24	28	26	F	48
E.coli49	21	35	27	36	32	23	R	20	22	34	24	24	24	32	R	24	32	R	30	30	22	R	R	25	30	28	F	69
E.coli50	24	32	25	30	31	20	20	20	24	30	22	21	19	30	26	19	28	26	26	28	17	20	30	21	24	22	F	20
E.coli51	24	29	26	30	29	24	19	20	22	34	22	24	24	32	26	22	30	26	33	29	21	20	27	28	26	28	F	33
E.coli52	24	32	26	30	29	20	20	20	23	32	22	26	22	30	24	22	28	22	30	27	21	22	30	20	24	26	F	4
E.coli53	22	33	28	29	32	21	R	22	24	34	24	25	22	34	28	20	26	R	30	30	20	R	R	24	28	28	M	4M
E.coli54	19	30	24	28	27	19	R	17	20	37	20	20	21	30	R	22	23	R	29	24	18	R	R	21	21	22	F	24
E.coli55	24	28	28	29	30	20	R	18	21	30	22	22	20	26	25	19	27	R	26	25	19	18	R	20	23	24	F	32

E.coli56	24	32	29	30	31	22	20	17	24	30	22	21	22	30	30	20	27	23	34	26	18	19	32	22	19	22	F	22
E.coli57	22	31	26	30	30	18	R	14	19	30	18	R	18	R	R	R	28	R	R	R	R	R	R	R	12	R	M	75
E.coli58	21	31	28	29	30	21	R	R	R	31	22	21	20	30	R	20	24	R	28	26	18	R	R	20	21	24	F	32
E.coli59	23	32	26	31	30	19	21	16	22	30	22	20	20	28	23	17	26	R	24	25	16	R	R	20	20	22	F	15
E.coli60	21	31	27	30	30	19	21	13	18	30	17	16	R	R	R	18	25	R	R	R	16	R	16	20	22	R	F	85
E.coli61	19	32	28	30	32	19	R	R	20	32	22	24	19	30	R	19	24	R	29	28	15	R	R	19	24	24	F	30
E.coli62	28	36	31	33	38	25	R	23	26	30	25	26	25	37	26	20	30	R	30	30	18	17	16	20	23	25	F	39
E.coli63	26	36	27	35	38	18	24	18	23	34	22	26	16	26	26	17	28	25	24	R	15	19	30	19	25	15	F	46
E.coli64	21	36	26	29	28	20	R	19	20	34	20	21	20	37	23	17	24	R	30	23	17	19	R	20	22	24	F	77
E.coli65	25	28	24	28	27	22	R	R	R	28	18	21	19	R	17	18	26	R	R	R	16	R	R	19	14	R	M	55
E.coli66	25	33	30	30	34	22	R	22	23	32	20	24	22	33	28	22	30	R	30	26	20	R	R	24	25	34	F	40
E.coli67	21	31	26	30	32	22	R	18	21	32	20	23	22	32	24	22	26	20	30	28	20	R	14	24	26	27	F	28
E.coli68	26	34	31	33	34	21	26	32	24	34	22	25	19	36	30	18	28	R	31	24	18	20	32	21	26	26	F	18
E.coli69	23	30	26	28	31	19	17	18	21	30	20	22	20	28	22	18	24	24	27	25	18	20	26	21	23	26	F	56
E.coli70	34	32	28	30	31	28	R	22	24	33	30	32	25	16	R	30	38	R	15	R	24	R	R	30	32	R	F	53
E.coli71	23	32	28	32	30	18	R	14	20	36	20	22	18	28	R	18	24	26	26	26	18	19	28	22	25	23	F	72
E.coli72	24	34	30	31	32	20	R	17	22	30	21	22	20	30	25	20	28	R	31	30	18	20	R	21	26	28	F	47
E.coli73	25	30	27	29	30	21	22	19	24	31	19	22	18	30	25	20	30	22	28	27	18	20	26	20	25	22	F	24
E.coli74	22	34	31	30	30	21	R	20	23	32	28	24	22	34	R	21	28	R	35	29	20	22	R	24	28	28	F	32
E.coli75	26	32	30	30	32	20	R	21	20	26	22	24	22	30	24	20	25	R	31	27	19	23	R	22	21	27	F	2
E.coli76	21	34	28	31	33	22	R	R	19	32	R	R	22	R	R	20	32	R	R	R	20	R	R	23	27	R	M	53
E.coli77	25	36	29	31	32	25	R	15	18	34	20	22	20	R	R	R	30	R	R	R	18	R	R	19	23	R	F	41
E.coli78	26	34	31	35	38	24	25	20	26	36	27	26	25	34	26	22	27	R	31	28	22	20	30	22	26	28	F	31
E.coli79	22	31	25	30	29	21	17	16	21	30	21	23	19	R	23	19	26	R	R	R	17	17	18	20	24	R	F	24
E.coli80	22	34	28	33	34	21	R	16	22	31	23	22	20	31	26	20	25	R	30	28	18	R	R	22	24	29	F	23
E.coli81	22	36	28	34	35	19	R	19	22	33	24	22	19	35	25	19	28	R	36	29	17	18	R	20	23	26	F	25
E.coli82	28	30	32	29	35	26	20	20	20	28	20	20	21	30	20	24	26	22	30	24	19	22	27	24	24	26	F	82
E.coli83	20	35	30	32	32	22	R	19	20	30	22	23	R	R	R	20	30	R	R	R	19	R	R	23	18	R	M	73
E.coli84	26	35	28	33	32	21	24	21	24	34	23	25	22	31	26	22	28	28	30	28	20	21	31	22	25	26	F	54
E.coli85	27	28	24	28	28	20	19	17	20	25	20	23	19	24	R	19	27	R	22	20	17	16	23	20	22	21	F	37

E.coli86	26	36	30	35	34	22	21	20	25	36	26	25	24	37	27	20	28	R	31	28	20	20	30	22	26	24	M	77
E.coli87	24	33	31	33	33	26	20	18	26	32	18	20	24	31	25	22	30	R	29	24	20	20	28	24	28	25	F	20
E.coli88	20	32	26	30	30	22	R	19	21	28	18	21	22	R	R	20	22	R	R	R	19	R	R	21	23	R	F	57
E.coli89	26	34	32	33	35	22	21	22	24	34	20	22	24	34	28	20	29	29	29	30	20	21	31	20	26	28	M	2
E.coli90	20	34	30	34	33	22	R	R	20	34	23	23	22	32	26	20	27	R	28	27	21	20	R	22	26	25	F	18
E.coli91	24	31	28	30	28	20	R	R	19	28	20	18	18	29	24	20	27	R	30	28	19	18	R	21	24	26	F	40
E.coli92	30	34	30	34	31	23	R	25	26	34	25	24	24	30	29	22	28	26	30	28	20	23	24	24	20	24	F	19
E.coli93	23	28	28	28	31	21	20	18	23	32	23	21	23	30	22	23	22	26	29	26	19	20	29	22	23	24	F	9
E.coli94	22	30	28	30	30	22	18	18	23	32	22	20	22	24	26	22	28	R	21	19	20	R	R	24	26	20	F	82
E.coli95	24	34	29	32	32	22	R	17	22	32	22	23	20	30	R	20	28	R	30	30	20	R	R	24	25	26	F	41
E.coli96	28	33	30	34	34	24	24	20	24	36	24	24	23	34	28	22	28	29	34	26	20	24	30	24	27	28	F	18
E.coli97	30	32	28	30	30	22	20	21	24	32	22	22	22	30	23	22	28	23	29	24	20	22	27	25	25	25	F	30
E.coli98	26	32	28	30	28	23	20	22	24	32	22	22	21	28	28	22	25	27	31	30	21	26	30	25	26	27	F	30
E.coli99	30	28	32	36	32	22	21	22	26	34	24	22	21	38	27	22	28	30	31	28	22	24	32	25	28	26	F	31
E.coli100	25	29	28	30	30	20	19	19	24	28	19	24	22	31	26	20	28	24	32	24	18	22	27	23	25	27	F	31
E.coli101	24	32	26	30	30	20	21	24	24	33	22	22	21	28	27	22	27	21	30	24	20	26	26	22	26	24	F	19
E.coli102	24	30	28	32	32	27	R	15	21	30	26	20	24	30	R	22	32	R	30	26	22	R	R	27	28	26	F	41
E.coli103	23	34	30	31	30	24	R	21	21	30	24	22	23	32	R	24	25	27	30	25	20	R	20	24	26	27	F	21
E.coli104	23	33	29	33	34	26	R	14	20	32	22	21	25	33	26	23	28	R	30	28	24	R	R	29	28	26	F	29
E.coli105	24	30	30	32	31	23	20	22	24	32	26	22	23	30	26	22	26	28	26	20	20	24	30	24	24	20	F	2M
E.coli106	26	32	26	30	32	22	24	24	22	32	24	23	23	31	29	20	29	30	32	28	20	23	30	23	24	27	F	39
E.coli107	20	32	28	31	30	24	R	R	18	30	21	20	22	32	29	23	29	R	30	32	22	R	R	24	26	29	F	1
E.coli108	23	31	26	32	30	21	20	20	22	32	22	22	22	32	23	20	26	24	26	27	20	22	30	23	22	23	F	18
E.coli109	22	30	28	32	32	21	R	17	22	30	21	19	22	32	26	23	24	R	29	26	19	24	R	24	22	26	F	29
E.coli110	22	30	24	30	29	22	R	R	21	32	21	22	20	30	26	20	24	24	28	24	19	24	27	22	24	24	F	19
E.coli111	20	29	23	28	28	22	R	R	20	28	15	R	20	R	R	13	28	R	R	R	R	R	28	16	R	R	M	75
E.coli112	28	34	31	35	32	24	R	20	22	32	26	25	21	33	30	23	27	30	32	28	20	22	22	24	30	28	M	42
E.coli113	24	32	26	34	30	22	R	21	24	32	22	22	22	32	R	26	25	30	35	30	20	25	22	26	24	30	F	1
E.coli114	30	40	31	36	32	24	20	19	26	34	24	19	20	30	28	20	25	27	32	28	22	24	32	24	33	26	F	31
E.coli115	22	31	26	30	30	21	R	19	21	29	20	24	20	28	R	20	24	27	30	26	20	20	29	22	24	26	M	4M

E.coli116	23	28	24	30	28	20	R	14	18	26	21	20	20	34	R	19	22	R	38	29	18	24	R	22	24	28	F	22
E.coli117	22	28	27	28	30	21	20	18	22	30	22	24	21	32	26	20	23	30	30	28	20	23	30	24	24	26	M	3M
E.coli118	24	29	26	30	27	23	20	17	21	32	20	20	24	34	26	26	22	27	28	28	20	20	30	25	30	26	F	41
E.coli119	23	30	24	29	28	18	19	20	22	30	21	11	18	26	22	18	24	24	24	22	16	21	24	20	21	23	F	27
E.coli120	23	34	30	33	34	22	R	20	24	32	22	21	24	32	27	22	25	26	29	28	20	R	30	24	28	27	F	23
E.coli121	27	30	30	30	31	22	R	17	20	30	19	20	R	R	R	19	26	R	R	R	22	22	R	21	25	R	F	22
E.coli122	20	30	26	30	28	21	R	R	20	30	19	24	20	29	28	20	24	R	30	16	19	24	15	21	26	17	F	45
E.coli123	26	31	30	30	32	24	22	22	25	30	20	26	23	36	24	22	26	R	33	30	20	R	R	25	26	30	F	28
E.coli124	28	30	28	30	29	20	22	20	24	30	22	20	20	30	30	19	25	28	30	26	18	22	30	22	23	22	F	9
E.coli125	24	34	27	30	31	20	23	22	24	29	23	22	22	30	26	20	24	28	26	25	20	22	30	24	28	24	M	3
E.coli126	22	31	26	30	31	22	20	18	22	30	20	20	22	28	23	20	26	25	28	R	18	20	30	21	24	16	F	23
E.coli127	21	29	25	28	28	22	12	21	24	28	21	22	24	32	26	22	26	R	28	25	20	23	R	16	27	25	F	24
E.coli128	28	32	28	33	32	24	24	24	26	32	22	24	25	33	24	24	30	26	30	26	22	26	30	27	26	25	F	66
E.coli129	25	34	28	32	32	22	R	20	22	32	24	24	24	35	27	25	25	R	34	29	21	24	R	24	26	28	F	2
E.coli130	24	33	26	30	30	24	22	20	24	34	23	25	24	28	29	22	24	30	31	32	20	22	30	26	30	27	F	41
E.coli131	21	34	26	31	30	22	R	16	20	30	19	26	24	32	R	22	24	R	30	30	20	R	R	24	26	26	F	6
E.coli132	27	34	26	32	32	22	20	18	25	34	20	20	24	R	R	22	24	R	R	R	21	R	R	24	24	R	F	25
E.coli133	26	30	24	29	28	22	22	20	20	30	22	23	20	32	24	20	28	26	30	24	19	20	28	22	22	20	F	45
E.coli134	20	33	25	30	30	21	R	14	19	28	20	18	20	28	R	20	26	24	28	24	19	R	26	22	25	20	F	15
E.coli135	24	30	26	30	30	22	22	20	21	30	19	22	22	32	24	20	20	23	30	27	19	22	26	20	23	24	F	22
E.coli136	20	30	24	29	28	28	R	20	22	30	R	25	20	30	24	20	24	R	28	26	20	R	R	22	25	24	F	61
E.coli137	22	30	24	29	30	20	20	19	20	30	20	20	20	32	24	20	24	24	28	28	20	22	30	21	22	22	F	5M
E.coli138	20	30	26	30	28	22	R	R	20	28	20	21	20	40	28	20	24	R	31	31	18	22	R	24	24	26	F	61
E.coli139	24	34	28	32	32	24	22	18	22	34	22	24	R	36	26	20	26	28	32	30	19	R	22	24	26	28	F	38
E.coli140	26	34	28	34	31	24	R	24	24	33	22	23	23	30	26	22	21	26	30	26	20	22	29	24	23	28	F	30
E.coli141	22	30	24	30	28	22	18	R	23	30	R	R	20	R	R	22	24	R	R	R	20	R	R	24	26	R	F	18
E.coli142	21	30	28	30	29	21	R	17	20	30	20	24	21	28	R	20	25	R	26	28	20	23	R	23	24	27	F	40
E.coli143	23	38	30	36	34	26	R	18	22	36	24	20	20	R	R	R	30	R	R	R	R	28	R	R	26	R	M	76
E.coli144	22	31	26	30	30	24	R	18	20	29	20	22	22	30	28	20	24	R	28	26	18	21	R	22	24	24	F	52
E.coli145	22	32	26	32	32	20	R	R	15	30	24	22	20	28	25	18	26	28	27	R	16	22	22	22	24	16	M	60
E.coli146	28	32	29	34	34	24	24	20	28	32	24	24	22	30	28	23	28	28	30	29	22	24	26	25	28	26	F	20
E.coli147	26	34	30	32	33	23	R	20	18	32	22	25	20	30	26	22	24	24	29	26	20	24	30	24	24	25	M	30

E.coli148	28	32	29	29	29	22	22	19	24	32	18	20	20	29	28	20	29	R	30	28	18	R	R	24	24	28	F	69
E.coli149	24	39	32	28	36	29	R	24	24	33	26	25	24	30	30	24	30	R	30	22	20	28	R	28	30	20	F	39
E.coli150	22	32	28	30	31	22	18	20	22	32	22	24	20	29	26	25	27	26	26	24	20	20	26	22	25	25	F	4
E.coli151	24	30	25	30	30	23	22	20	23	30	21	22	20	30	24	20	24	26	30	30	18	22	30	22	24	25	F	67
E.coli152	26	29	26	30	30	19	19	21	22	29	20	21	20	32	20	27	28	28	30	26	18	20	26	20	23	24	F	39
E.coli153	26	32	30	30	32	24	20	22	24	30	22	22	22	30	26	20	25	28	30	24	20	24	30	22	24	28	F	29
E.coli154	22	34	30	30	31	22	R	20	20	29	26	26	21	28	29	22	22	R	31	30	20	13	R	22	24	29	F	48
E.coli155	26	28	26	28	31	22	R	18	23	26	19	20	20	30	R	24	27	21	26	22	18	R	20	20	22	20	F	11
E.coli156	26	30	28	31	32	24	19	20	26	32	24	25	24	30	28	20	28	26	30	26	20	26	29	24	28	25	F	44
E.coli157	26	28	25	28	29	20	20	18	22	26	20	20	19	30	27	18	25	28	32	26	18	23	28	20	24	22	F	38
E.coli158	27	34	30	34	33	24	20	22	25	31	24	21	24	34	26	29	28	28	30	30	20	26	31	24	25	24	F	39
E.coli159	26	34	30	32	34	24	20	22	26	32	24	26	25	34	30	30	28	26	34	29	20	24	31	24	26	27	F	19
E.coli160	24	33	30	32	31	22	R	19	23	34	22	17	22	38	24	28	28	30	30	26	20	24	24	24	25	21	M	71
E.coli161	26	34	28	32	31	22	19	23	23	30	23	24	22	34	28	28	26	27	34	28	19	R	29	23	26	28	F	46
E.coli162	22	33	29	32	33	23	R	20	20	34	24	22	20	34	28	28	25	R	31	28	20	24	R	25	22	26	F	10
E.coli163	28	32	26	30	32	24	20	22	22	30	24	24	23	36	28	27	25	28	34	28	19	26	26	23	25	26	F	2M
E.coli164	20	30	26	30	30	21	R	19	22	28	21	19	20	30	27	28	24	24	30	24	18	R	20	20	23	20	F	68
E.coli165	24	30	27	29	30	21	19	19	23	32	24	25	21	30	26	24	24	26	30	30	19	23	27	20	24	26	F	37
E.coli166	24	30	24	29	30	22	R	18	22	31	22	23	22	32	24	26	26	23	30	24	20	23	26	23	24	28	F	76
E.coli167	24	33	30	32	34	24	R	16	24	36	24	23	25	34	R	30	26	R	31	30	19	R	R	25	30	26	F	30
E.coli168	26	34	29	32	30	22	19	22	27	32	24	25	22	33	26	28	26	29	34	31	20	23	30	24	28	30	F	31
E.coli169	20	32	27	31	32	22	R	18	20	30	21	20	20	31	26	25	26	28	28	28	18	R	22	21	23	28	F	26
E.coli170	28	34	28	31	30	26	R	22	24	30	24	22	22	32	26	30	25	30	30	30	20	24	26	25	26	26	F	54
E. coli171	24	32	28	32	30	24	R	19	24	31	22	22	24	R	26	20	29	30	R	R	18	R	22	23	26	R	F	17
E.coli172	27	31	27	31	30	24	19	22	25	32	22	23	20	32	24	22	28	28	34	26	19	20	29	23	25	28	F	19
E.coli173	26	30	27	32	31	22	20	24	24	31	23	23	22	30	27	20	28	R	30	26	20	R	R	22	26	24	F	24
E.coli174	24	32	28	30	31	24	19	20	24	32	21	24	23	34	30	21	27	30	32	28	22	24	23	21	28	24	F	16
E.coli175	24	29	25	29	30	19	18	19	23	30	20	22	20	26	22	19	24	28	25	24	17	19	28	18	22	25	F	22
E.coli176	22	34	29	33	34	22	R	16	20	34	22	22	20	30	R	20	25	R	32	30	18	R	R	24	27	28	F	76
E.coli177	26	30	29	30	32	24	20	22	27	34	22	26	24	26	26	21	26	27	26	R	20	25	30	24	26	19	M	42
E.coli178	26	32	30	32	33	22	18	20	22	31	24	24	25	30	30	28	30	30	32	29	20	24	30	26	26	26	F	17

E.coli179	26	31	28	32	32	21	17	20	22	29	23	21	22	27	24	22	25	26	29	24	19	21	30	22	24	25	F	26
E.coli180	20	29	28	30	30	22	R	R	20	28	19	19	24	26	24	27	25	26	32	27	18	23	28	24	24	26	F	7
E.coli181	26	34	29	34	33	23	20	22	24	33	24	26	22	31	25	26	27	24	30	28	19	22	29	24	26	26	F	16
E.coli182	28	32	30	34	30	23	19	18	26	30	22	19	22	32	24	24	26	29	32	30	20	R	22	25	27	28	F	18
E.coli183	24	30	27	30	30	22	20	20	23	31	22	22	20	32	26	20	25	24	30	27	19	22	30	22	24	26	M	4M
E.coli184	21	28	30	29	28	24	R	16	19	28	20	25	21	25	28	20	26	30	30	27	17	23	28	21	24	24	F	36
E.coli185	23	34	28	32	31	24	R	22	22	32	23	24	20	28	24	22	26	28	28	25	20	R	24	25	26	24	F	26
E.coli186	26	32	30	32	33	22	17	21	22	30	23	21	25	28	24	27	26	29	27	25	20	24	30	24	26	25	F	28
E.coli187	24	30	26	30	31	20	R	14	19	30	18	19	16	R	R	11	28	R	R	R	R	R	R	19	24	R	M	44
E.coli188	25	30	25	29	30	22	16	16	24	30	20	20	21	29	22	19	27	22	29	R	19	20	24	22	22	12	F	61
E.coli189	24	33	26	30	34	22	R	19	20	32	18	20	20	30	22	21	29	R	30	25	18	R	R	20	24	25	F	31
E.coli190	25	28	23	28	27	22	18	20	21	28	20	21	19	26	29	19	22	R	24	20	18	R	R	21	25	24	F	33
E.coli191	22	32	26	30	30	21	20	20	21	30	28	R	20	28	29	20	22	22	29	24	19	R	29	24	17	24	F	28
E.coli192	17	33	30	33	32	25	R	R	R	28	25	21	24	R	29	22	28	R	R	R	23	26	24	28	26	R	M	76
E.coli193	28	37	31	30	36	29	R	26	27	30	28	27	29	31	29	27	30	R	28	22	24	27	R	24	29	22	F	39
E.coli194	30	34	31	33	32	24	19	22	24	30	24	26	25	31	27	22	29	R	31	28	22	R	28	27	30	27	F	28
E.coli195	21	34	36	29	35	26	R	14	14	33	27	22	28	R	29	26	28	R	R	R	21	28	27	28	32	R	M	76
E.coli196	28	34	30	34	30	24	R	19	24	33	22	21	24	31	28	23	29	28	32	29	23	R	R	24	27	28	F	34
E.coli197	27	34	30	33	31	26	19	20	24	30	28	27	27	29	27	24	29	29	30	30	20	26	29	26	29	28	F	51
E.coli198	20	33	30	34	30	22	R	16	18	31	24	23	20	29	27	R	30	R	28	29	16	27	R	19	20	24	F	37
E.coli199	24	34	28	28	32	19	18	18	20	33	23	21	21	30	23	17	24	27	29	23	17	20	26	27	24	26	F	19
E.coli200	25	29	24	29	30	21	15	18	21	30	20	21	20	31	24	19	22	24	34	23	17	22	28	21	23	29	F	23
E.coli201	24	32	28	28	28	22	21	20	26	33	20	23	22	31	R	22	28	27	32	28	20	R	31	23	24	30	F	20
E.coli202	21	29	26	30	30	20	R	20	19	29	21	21	20	28	28	19	28	R	30	28	19	22	R	22	25	28	M	41
E.coli203	23	29	26	30	27	20	19	17	21	26	20	21	18	28	21	19	22	20	31	26	16	24	26	19	20	25	M	79
E.coli204	20	31	26	30	29	20	R	19	22	24	19	23	21	27	26	18	25	R	26	24	18	R	R	21	20	26	F	59
E.coli205	22	28	23	28	26	21	18	20	21	23	18	18	21	R	24	20	25	R	R	R	19	R	R	20	22	R	F	76
E.coli206	21	29	25	28	27	22	R	R	19	25	23	20	21	27	25	20	26	R	23	28	24	22	R	23	24	26	F	23
E.coli207	24	29	27	29	28	22	19	27	21	28	23	24	25	29	28	24	23	20	29	25	19	23	21	25	18	24	M	43
E.coli208	25	30	29	28	29	23	17	18	25	26	21	17	22	29	26	17	22	26	23	19	19	27	20	20	20	24	F	7
E.coli209	21	30	28	29	33	20	R	20	19	30	20	24	20	28	R	19	22	R	30	24	18	R	R	27	22	27	F	57
E.coli210	21	32	24	30	31	22	R	14	20	28	18	20	20	26	23	19	28	R	30	25	18	23	R	25	20	26	M	6

<i>E.coli</i> 211	24	30	29	30	29	20	20	19	22	26	20	22	20	31	R	20	29	27	26	24	19	R	21	22	22	25	F	33
<i>E. coli</i> 212	21	32	29	30	30	24	22	20	26	30	20	28	24	30	24	22	26	24	30	29	22	17	27	25	29	27	F	45
<i>E.coli</i> 213	20	30	26	31	30	20	R	17	21	27	20	20	20	29	R	20	23	R	30	24	18	23	R	20	20	28	F	33
<i>E. coli</i> 214	23	30	24	29	28	22	23	19	26	25	20	24	25	28	28	21	25	24	27	20	19	25	30	22	20	24	F	8M
<i>E.coli</i> 215	23	30	26	31	32	21	R	16	20	27	22	21	22	30	R	21	24	27	29	26	20	R	30	25	24	26	F	21
<i>E.coli</i> 216	21	33	26	31	28	22	R	17	24	34	22	24	24	29	30	24	30	30	30	R	19	27	R	27	30	20	F	60
<i>E.coli</i> 217	26	32	30	34	35	24	22	20	26	30	20	28	24	30	24	22	26	25	32	30	20	23	29	27	29	30	F	29
<i>E.coli</i> 218	24	30	29	30	29	20	20	19	220	26	20	22	20	31	R	20	29	27	26	24	19	R	21	22	22	25	F	33
<i>E.aerogenes</i> 1	10	R	R	R	R	21	R	R	R	22	R	R	20	30	23	20	23	24	34	25	19	17	27	20	18	20	F	67
<i>E.aerogenes</i> 2	22	30	23	24	30	17	R	21	21	30	21	22	20	24	24	17	24	22	22	24	16	16	24	21	15	21	F	17
<i>E.aerogenes</i> 3	R	20	10	12	16	22	R	R	R	32	R	R	21	24	22	20	24	R	25	25	16	R	R	19	15	22	F	21
<i>E.aerogenes</i> 4	19	15	18	14	18	22	R	R	R	22	R	R	21	26	R	20	34	R	24	24	19	16	20	22	R	R	F	16
<i>E.aerogenes</i> 5	24	34	28	30	31	24	R	17	18	28	20	R	23	27	24	24	24	R	30	28	23	17	22	24	20	27	F	31
<i>E.aerogenes</i> 6	28	32	28	31	33	21	14	23	23	32	21	24	24	30	R	20	28	R	26	26	20	R	R	23	20	22	F	26
<i>E.aerogenes</i> 7	23	32	26	30	31	24	R	26	30	33	23	24	24	23	16	24	28	R	18	R	20	20	R	24	25	26	F	23
<i>E.aerogenes</i> 8	26	30	26	30	30	22	R	23	22	28	20	22	22	28	24	20	26	R	26	22	18	17	24	21	18	21	F	29
<i>E.aerogenes</i> 9	R	32	30	29	28	24	R	R	R	34	R	R	23	30	21	21	23	R	28	27	16	R	R	22	R	R	M	50
<i>E.aerogenes</i> 10	23	30	24	29	28	20	R	21	21	26	20	21	20	25	25	20	24	19	23	22	17	18	22	19	17	21	F	15
<i>E.aerogenes</i> 11	22	30	25	29	28	22	R	22	24	30	21	22	22	30	26	19	25	20	26	21	18	19	27	20	18	22	F	80
<i>E.aerogenes</i> 12	26	30	28	30	32	22	R	23	24	32	24	21	22	28	28	20	22	22	26	24	19	22	20	21	19	22	F	41
<i>E.aerogenes</i> 13	22	30	26	28	28	20	R	22	22	27	22	21	20	26	24	20	19	22	26	26	17	20	25	20	20	20	F	18
<i>E.aerogenes</i> 14	21	30	24	29	29	16	R	15	18	28	18	15	R	R	R	R	24	R	R	R	16	20	R	20	16	R	M	43
<i>E.aerogenes</i> 15	R	30	30	30	32	22	R	R	R	32	R	R	22	30	19	28	26	26	20	R	20	R	30	22	18	18	M	70
<i>E. aerogenes</i> 16	20	26	25	30	28	20	18	18	21	28	20	20	19	28	20	20	21	21	28	21	18	19	26	20	20	20	F	29
<i>E. aerogenes</i> 17	R	28	26	29	26	R	20	R	R	22	R	R	19	23	20	16	16	24	24	24	16	18	28	20	R	20	M	76
<i>E. aerogenes</i> 18	20	30	26	29	29	22	20	R	R	30	20	R	20	26	29	23	22	23	26	24	19	R	28	22	18	22	F	15
<i>E.agglomerans</i> 1	26	33	30	31	32	23	R	25	23	35	24	23	23	34	25	21	29	R	28	15	19	18	22	18	22	25	F	17
<i>E.cloacae</i> 1	R	R	R	R	R	19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	28	R	R	R	R	19	R	R	R	R	M	14
<i>E.cloacae</i> 2	15	8	16	9	R	17	R	R	R	12	R	R	R	32	28	20	23	R	36	26	R	20	R	R	22	28	F	2
<i>E.cloacae</i> 3	26	34	28	30	32	20	15	22	22	27	22	24	20	30	28	20	22	25	26	28	19	22	27	22	20	25	F	18
<i>E.cloacae</i> 4	28	30	26	31	30	20	15	24	24	28	24	23	22	28	26	20	24	24	30	27	18	24	28	20	22	24	F	24
<i>E.cloacae</i> 5	26	31	26	30	30	22	R	22	22	32	24	20	22	27	26	24	24	22	29	27	18	22	28	23	20	23	F	21

<i>E.cloacae</i> 6	26	34	28	30	32	20	15	22	22	27	22	24	20	30	28	20	22	25	26	28	19	22	27	22	20	25	F	18	
<i>E.gergoviae</i> 1	18	32	30	31	30	24	14	R	R	27	12	18	22	32	20	24	20	25	29	25	16	R	26	21	15	26	F	20	
<i>E.sakazakii</i> 1	22	30	22	27	28	20	18	19	20	26	20	22	19	29	24	18	20	24	29	26	17	21	28	20	22	26	F	23	
<i>P. mirabilis</i> 1	26	32	30	24	27	28	R	R	R	26	R	R	16	20	R	24	25	21	30	R	25	18	R	25	R	19	M	28	
<i>P. mirabilis</i> 2	26	38	30	34	24	24	R	22	20	32	30	22	R	40	R	22	18	R	39	30	21	R	R	24	20	28	F	24	
<i>P. mirabilis</i> 3	23	R	24	26	28	25	17	26	22	26	30	25	R	28	R	18	20	20	26	R	18	16	R	24	20	28	F	55	
<i>P. mirabilis</i> 4	28	30	30	30	31	19	24	21	24	26	24	22	20	30	22	19	20	16	30	19	19	16	30	20	28	24	M	34	
<i>P. mirabilis</i> 5	20	40	32	34	32	20	30	19	20	36	24	22	22	38	24	20	23	R	36	25	20	24	22	24	24	28	F	31	
<i>P. mirabilis</i> 6	24	32	32	30	29	20	27	20	22	30	24	21	21	32	22	18	20	24	26	24	17	R	30	22	23	27	F	49	
<i>P. mirabilis</i> 7	28	38	32	32	36	20	32	20	19	20	24	21	24	30	24	20	22	24	39	24	20	R	32	22	26	24	F	26	
<i>P. mirabilis</i> 8	28	38	30	32	32	18	30	28	22	30	30	24	20	30	24	19	23	R	35	18	16	R	31	20	18	21	F	18	
<i>P. mirabilis</i> 9	28	30	34	35	40	20	R	22	17	36	30	24	R	24	R	R	22	R	28	20	14	R	R	R	25	22	M	1	
<i>P. mirabilis</i> 10	38	38	30	35	36	21	27	24	21	22	26	21	21	26	20	22	R	20	26	21	20	R	27	20	22	24	M	12	
<i>P. mirabilis</i> 11	29	40	32	32	36	20	17	22	20	29	24	20	22	30	R	20	18	R	32	22	20	R	R	20	25	24	F	38	
<i>P. mirabilis</i> 12	26	34	30	34	32	20	30	26	24	32	30	22	20	30	28	24	19	22	31	28	19	14	20	22	26	28	F	17	
<i>P. mirabilis</i> 13	22	32	31	36	41	22	R	20	18	34	26	20	20	30	R	20	18	R	30	28	19	R	R	22	18	26	M	7M	
<i>P. mirabilis</i> 14	21	34	28	30	30	24	R	R	R	28	R	22	22	30	17	21	R	20	32	28	20	26	28	24	12	27	F	33	
<i>P. mirabilis</i> 15	28	34	29	33	34	20	30	24	22	30	26	22	22	31	23	20	22	30	36	26	18	R	30	22	20	26	F	18	
<i>P. mirabilis</i> 16	24	36	30	33	34	24	R	21	20	28	26	24	22	36	R	19	20	R	30	26	20	13	R	27	18	25	M	9M	
<i>P. mirabilis</i> 17	29	38	31	34	39	20	20	26	23	30	29	23	24	31	26	22	22	25	31	23	21	15	31	23	24	28	M	59	
<i>P. mirabilis</i> 18	23	29	26	28	27	21	19	26	20	27	22	25	26	29	28	20	22	R	30	26	20	R	R	25	R	24	F	66	
<i>P. mirabilis</i> 19	28	31	32	31	30	21	20	R	R	30	R	16	22	32	26	24	32	R	30	28	22	11	28	24	14	28	F	76	
<i>P. penneri</i> 1	22	31	26	30	30	21	R	R	20	30	19	25	22	28	R	21	28	28	30	28	18	R	28	23	23	26	M	1	
<i>P. penneri</i> 2	30	36	32	35	35	24	28	24	21	36	28	22	22	28	31	23	20	29	34	27	22	18	34	23	24	24	M	74	
<i>P. penneri</i> 3	22	30	29	30	27	21	R	26	23	25	23	20	24	27	26	20	26	R	27	29	27	R	R	20	26	25	F	74	
<i>P. penneri</i> 4	23	40	30	34	34	25	R	R	R	30	R	20	23	30	21	24	23	R	29	28	20	26	22	24	21	28	F	5	
<i>P. vulgaris</i> 1	13	34	29	29	35	20	19	18	22	29	18	22	18	30	25	18	22	21	30	20	17	20	26	20	22	26	M	53	
<i>P. vulgaris</i> 2	30	33	29	29	34	21	R	23	22	30	27	24	22	20	R	22	34	R	R	R	20	R	18	24	24	R	F	76	
<i>P. vulgaris</i> 3	30	41	30	30	40	26	22	R	R	21	19	28	24	23	24	21	34	R	27	21	20	R	27	24	32	24	F	59	
<i>K.pneumoniae</i> 1	R	R	R	R	R	18	R	R	R	19	R	R	R	R	R	R	19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	M	72
<i>K.pneumoniae</i> 2	22	16	12	20	18	18	R	R	R	R	R	21	R	32	28	19	26	R	30	24	R	22	R	R	25	28	F	2	
<i>k. pneumoniae</i> 3	24	33	28	31	30	24	R	22	26	29	23	24	24	28	28	22	22	24	30	24	20	22	28	22	20	25	F	24	

<i>K.pneumoniae4</i>	26	33	27	30	30	20	R	26	23	26	30	24	24	22	29	28	18	24	24	30	26	19	24	21	18	26	F	80
<i>K.pneumoniae5</i>	20	28	26	29	30	22	R	22	22	25	19	20	18	20	24	17	24	R	22	22	16	20	R	19	18	22	F	7
<i>K. ozaenae1</i>	21	28	24	28	28	21	R	19	21	28	20	19	17	28	26	18	21	22	24	20	18	20	25	20	16	20	F	35
<i>K. oxytoca1</i>	21	35	29	35	34	25	R	17	22	29	22	25	22	30	26	24	29	R	29	26	22	R	19	25	25	24	M	55
<i>K.oxytoca2</i>	21	28	25	29	28	22	R	20	22	26	20	22	20	28	36	19	32	20	25	23	25	20	25	21	19	23	M	40
<i>k. rhinoscleromatis1</i>	21	28	26	28	27	19	18	19	22	27	20	19	20	22	20	19	21	18	20	R	17	R	28	21	R	R	F	20
<i>C.amalonicus1</i>	22	29	32	34	30	24	R	19	R	31	20	28	21	30	30	21	24	30	31	29	22	24	32	24	22	25	M	5M
<i>C. amalonicus2</i>	15	38	30	30	29	22	R	R	16	30	24	22	20	28	27	18	29	R	29	25	19	R	R	22	19	26	F	71
<i>C.diversus1</i>	21	31	26	29	30	20	R	13	17	26	18	17	19	R	R	17	24	R	R	R	17	R	R	20	21	R	F	59
<i>C.diversus2</i>	R	32	29	32	30	26	R	R	R	34	R	R	26	36	27	24	24	30	31	31	24	13	32	27	28	26	F	12
<i>C.freundii1</i>	R	14	R	R	R	22	R	R	R	13	R	R	R	30	R	17	21	R	40	26	20	R	R	25	22	30	M	1
<i>C.freundii2</i>	26	R	R	R	R	16	24	R	R	16	R	R	21	18	22	25	18	18	17	R	20	R	20	22	20	R	F	14
<i>C.freundii3</i>	16	32	30	31	33	23	R	20	16	29	18	19	22	34	R	20	25	26	34	24	19	R	30	22	22	24	M	10M
<i>C. koseri1</i>	13	29	25	28	26	21	R	R	R	26	21	21	R	R	R	18	25	R	R	R	17	R	R	21	20	R	M	77
<i>M.morganii1</i>	30	32	32	30	37	20	24	20	20	26	26	26	21	30	28	22	26	22	30	22	19	R	24	20	22	25	F	18
<i>M.morganii2</i>	26	30	30	32	35	20	22	22	21	28	28	18	22	30	26	18	19	28	36	29	20	R	33	23	24	30	F	24
<i>M.morganii3</i>	30	32	32	30	35	21	R	20	R	25	R	25	20	29	26	23	27	R	28	23	20	18	23	21	20	24	M	1
<i>M.morganii4</i>	R	34	27	30	29	25	R	R	R	30	R	18	28	30	27	22	R	R	30	26	23	R	26	24	18	21	F	29
<i>M.morganii5</i>	30	36	36	35	38	23	30	27	24	36	30	27	22	24	32	22	24	24	38	22	21	16	30	20	30	23	F	24
<i>P.alcalifasciens1</i>	25	34	26	30	30	24	R	22	23	30	21	22	26	34	26	20	23	19	34	24	22	21	26	26	24	28	F	22
<i>P.alcalifasciens2</i>	24	29	26	28	28	21	16	18	22	30	25	20	20	32	25	18	24	22	30	25	17	22	22	17	21	26	F	61
<i>P.rettgeri1</i>	28	R	21	25	31	22	24	24	18	25	28	21	20	24	22	23	20	23	30	18	16	R	32	22	22	17	F	28
<i>P.rettgeri2</i>	28	33	29	31	33	21	24	24	20	30	26	24	24	30	21	20	19	21	30	30	19	14	30	24	17	25	F	74
<i>P.rettgeri3</i>	25	30	27	30	29	20	R	20	20	26	24	24	R	34	R	23	16	R	30	25	18	R	R	20	20	25	M	6
<i>P. rettgeri4</i>	31	34	39	37	37	29	R	R	R	32	26	21	25	30	29	24	31	24	31	26	25	21	27	28	24	29	M	62
<i>S.marcescens1</i>	R	R	16	R	R	27	R	R	R	R	R	R	26	33	R	23	24	R	32	16	19	13	R	24	R	14	F	2

9 ANEXO

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,.....,
 RG:....., estado civil:....., idade.....,
 residente à:....., n°.....,
 bairro....., cidade,
 telefone.....

Concordo em participar do estudo “**Deteção de beta-lactamases de espectro estendido em membros da família Enterobacteriaceae**”, como voluntário(a) e declaro ter sido esclarecido(a) sobre os seguintes pontos:

- ? Este trabalho tem por objetivo estudar as bactérias isoladas de infecção de urina.
- ? Os testes serão realizados em laboratório de análises clínicas.
- ? Estou sabendo que a minha participação na pesquisa é doar minha urina e dela retirar as bactérias que estejam presentes. Caso não seja diagnosticada infecção de urina pelo laboratório, a minha urina será descartada e não será utilizada nesta pesquisa.
- ? Fui esclarecido(a) que a realização da pesquisa não implica em riscos para mim, participante, uma vez que não haverá desconforto adicional.
- ? Estarei contribuindo para o conhecimento da existência de bactérias de difícil controle.
- ? Estou ciente que serei esclarecido durante todo o decorrer da pesquisa sobre quaisquer dúvidas relacionadas às bactérias da infecção de urina.
- ? Estou ciente que possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização por isto.
- ? Não terei nenhuma despesa ao participar deste estudo, nem precisarei retornar ao laboratório por motivo desta pesquisa.
- ? Os procedimentos aos quais serei submetido não serão invasivos, nem provocarão danos físicos ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por este trabalho ou da Instituição (FCF/UNESP).
- ? Estou ciente que os dados e resultados obtidos na pesquisa serão utilizados para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras; porém será garantido o sigilo de minha identidade, assegurando a minha privacidade.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara, _____ de _____ de 200 .

Assinatura do Paciente ou Responsável

Observações:

Este protocolo de pesquisa foi analisado e recebeu parecer favorável à sua execução do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP.

Para solicitação de esclarecimentos entrar em contato com a pesquisadora responsável: Lilian de Oliveira Rodrigues- telefone: 3301-6107 ou 3333-5635.

Para notificação de qualquer situação de anormalidade que não puder ser resolvida pelo pesquisador, o sujeito da pesquisa deverá entrar em contato com a secretaria do Comitê , pelo telefone: (0XX 16) 3301-6897.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(menor de 18 anos)**

Eu,.....L.....,
 RG:....., estado civil:....., idade.....,
 residente à:, n°.....,
 bairro....., cidade, telefone.....

Concordo em participar do estudo “**Deteção de beta-lactamases de espectro estendido em membros da família Enterobacteriaceae**”, como voluntário(a) e declaro ter sido esclarecido(a) sobre os seguintes pontos:

- ? Este trabalho tem por objetivo estudar as bactérias isoladas de infecção de urina.
- ? Os testes serão realizados em laboratório de análises clínicas.
- ? Estou sabendo que a minha participação na pesquisa é doar minha urina e dela retirar as bactérias que estejam presentes. Caso não seja diagnosticada infecção de urina pelo laboratório, a minha urina será descartada e não será utilizada nesta pesquisa.
- ? Fui esclarecido(a) que a realização da pesquisa não implica em riscos para mim, participante, uma vez que não haverá desconforto adicional.
- ? Estarei contribuindo para o conhecimento da existência de bactérias de difícil controle.
- ? Estou ciente que serei esclarecido durante todo o decorrer da pesquisa sobre quaisquer dúvidas relacionadas às bactérias da infecção de urina.
- ? Estou ciente que possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização por isto.
- ? Não terei nenhuma despesa ao participar deste estudo, nem precisarei retornar ao laboratório por motivo desta pesquisa.
- ? Os procedimentos aos quais serei submetido não serão invasivos, nem provocarão danos físicos ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por este trabalho ou da Instituição (FCF/UNESP).
- ? Estou ciente que os dados e resultados obtidos na pesquisa serão utilizados para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras; porém será garantido o sigilo de minha identidade, assegurando a minha privacidade.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo, autorizando meu filho(a)....., impúbere, nascido aos/...../....., a participar deste estudo na qualidade de voluntário.

Araraquara, _____ de _____ de 200 .

Assinatura do Responsável

Observações:

Este protocolo de pesquisa foi analisado e recebeu parecer favorável à sua execução do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP.

Para solicitação de esclarecimentos entrar em contato com a pesquisadora responsável: Lilian de Oliveira Rodrigues- telefone: 3301-6107 ou 3333-5635.

Para notificação de qualquer situação de anormalidade que não puder ser resolvida pelo pesquisador, o sujeito da pesquisa deverá entrar em contato com a secretaria do Comitê , pelo telefone: (0XX 16) 3301-6897.

ANEXO B

Protocolo de coleta de urina

- 1- Coletar a primeira urina da manhã (jato intermediário e no mínimo 40 mL) em frascos de boca larga estéreis.
- 2- Realizar a antissepsia local dos órgãos do aparelho genito-urinário com água e sabão seguido com antiséptico.
- 3- Semear a urina imediatamente após a coleta.

Observação: não administrar pelo menos 24-96 horas, antissépticos, quimioterápicos e antibióticos antes da coleta de urina destinada a cultura. Caso não seja possível, avisar o laboratório.

ANEXO C-

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa