

Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências de Botucatu

**Avaliação de métodos de triagem e de detecção
fenotípica de β -lactamase de espectro ampliado
(ESBL)**

Cinthyá Terumi Ogassavara

Botucatu
2008

Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências de Botucatu

**Avaliação de métodos de triagem e de detecção
fenotípica de β -lactamase de espectro ampliado
(ESBL)**

Monografia de conclusão de curso realizado no laboratório de Microbiologia da Seção de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica.

Cinthyra Terumi Ogassavara

Orientador: Dr. Alessandro Lia Mondelli

Co-Orientador: Profa. Dra. Terue Sadatsune

Botucatu
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Ogassavara, Cinthya Terumi.

Avaliação de métodos de triagem e de detecção fenotípica de β -lactamase de espectro ampliado (ESBL) / Cinthya Terumi Ogassavara. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientador: Alessandro Lia Mondelli

1. Microbiologia 2. Bactérias 3. Antimicrobianos

Palavras-chave: Antibióticos; ESBL; β -Lactamase de espectro ampliado; Resistência bacteriana; Triagem inicial

*Dedico este trabalho a minha mãe,
por sua força em superar grandes dificuldades*

Agradecimentos

- Agradeço à minha mãe Keiko, a grande responsável pela minha educação e pela pessoa que sou hoje. Obrigada pelo incentivo, apoio e por poder contar sempre com você.
- Ao meu orientador Dr. Alessandro Lia Mondelli e co-orientadora Profa. Dra. Terue Sadatsune pela oportunidade de trabalhar no laboratório, pela ajuda e ensinamentos durante o período de estágio.
- Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia da Seção de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP, em ordem alfabética: Adriano Martison Ferreira, Ana Paula Dória, Ana Lúcia da Silva Rosa, Cláudia Maria Prado, Eneida Benato Seabra Spinelli, Manoel Roque Thomaz, Marcos Antonio Bronzato, Regina Adriana de O. Calsolari e Reonice Claudete Paniguel Bariquello. Muito obrigada pelo apoio técnico, pela paciência em ensinar, pelo excelente convívio e pelas horas de alegria e descontração.
- A todos os funcionários da Seção de Análises Clínicas pelo apoio, em especial à Maria Fátima Aparecida Biason pela amizade, confiança e ajuda.
- Ao Prof. Dr. Paulo José Fortes Villas Bôas pela ajuda com a análise estatística do trabalho.
- À minha amiga e companheira de casa Patrícia pela ajuda, pela paciência, pela boa convivência diária, desde a primeira semana de faculdade, literalmente.
- A todos os amigos, em especial à Thaís, Clara, Aline, Michele, Simone, Viviane, Taíse, Priscila (obrigada pela ajuda com a estatística), Heloísa, Bruna e Erika muito obrigada pela amizade e pelos momentos de diversão durante estes quatro anos de faculdade.
- À minha família, obrigada pelo apoio e incentivo.
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	i
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Resumo	vi
<i>Abstract</i>	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico	2
1.2. Antibióticos β -lactâmicos	4
1.3. Mecanismo de resistência aos β -lactâmicos	6
1.4. β -lactamases	7
1.5. Classificação das β -lactamases	8
1.6. β -lactamases de espectro ampliados (ESBL)	10
1.7. Detecção de β -lactamase de espectro ampliado	13
1.7.1. Método da combinação de discos	15
1.7.2. Teste aproximação dos discos (“Double-Disk Screening”)	15
1.7.3. Fitas de Etest ESBL	17
1.7.4. Sistemas automatizados	18
1.7.5. Testes moleculares	19
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivos gerais	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. MATERIAL E MÉTODO	22
3.1. Amostras bacterianas	23
3.2. Triagem das bactérias produtoras de ESBL	23
3.3. Testes para a detecção de ESBL	25

3.3.1. Disco aproximação	25
3.3.2. Etest®	27
3.3.3. Método automatizado	27
3.4. Análise dos resultados	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Frequência de espécies produtoras de ESBL	30
4.2. Avaliação dos antimicrobianos para a triagem da produção de ESBL	32
4.2.1. Avaliação dos antimicrobianos por espécie bacteriana	34
4.3. Detecção da produção de ESBL	39
4.3.1. Teste de disco aproximação	39
4.3.2. Etest® para ESBL Ceftazidima/ Ceftazidima + Ácido clavulânico	40
4.3.3. Método automatizado Vitek®	43
4.4. Comparação dos métodos Etest® e Vitek®	45
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
8. ANEXO	56
Anexo A - Resultado da metodologia do Etest® para a detecção da produção de ESBL	57

Lista de Abreviaturas e Siglas

β	Beta
μg	Micrograma (s)
a.C.	Antes de Cristo
ATCC	“American Type Culture Collection”
ATM	Aztreonam
AMC	Amoxicilina/ácido clavulânico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
CAZ	Ceftazidima
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
CPD	Cefpodoxima
CRO	Ceftriaxone
CTX	Cefotaxima
EC	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	“Ethylene-diamine-tetraacetic acid”, ácido etilenodiaminotetracético
ESBL	“Extended spectrum β -lactamase”, β -lactamase de espectro ampliado
Etest	“Epsilometer test”
FEP	Cefepime
GNS	“Gram Negative Susceptibility”
I	Intermediário
IRT	TEM resistente ao inibidor
KO	<i>Klebsiella oxytoca</i>
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MIC	“Minimal Inhibitory Concentration”, concentração inibitória mínima
mL	Mililitro
mm	Milímetro
ND	Não determinado
PBPs	“Penicillin binding proteins”, proteínas ligadoras de penicilinas
PCR	“Polymerase chain reaction”

pI	Ponto Isoelétrico
PM	<i>Proteus mirabilis</i>
R	Resistente
S	Sensível
UFC	Unidade Formadora de Colônia

Lista de Figuras

	Página
Figura 1 - Estrutura química do anel β -lactâmico e de alguns antibióticos que contêm este anel em sua estrutura	5
Figura 2 - Teste de disco aproximação com formação do sinergismo entre os discos	16
Figura 3 - Fita de Etest [®] para ESBL	17
Figura 4 - Disposição dos antimicrobianos, na placa de ágar Mueller-Hinton, utilizados neste estudo	24
Figura 5 - Teste de disco aproximação	26
Figura 6 - Porcentagem das bactérias produtoras de ESBL selecionadas para o estudo	31
Figura 7 - Porcentagem das amostras resistentes aos antibióticos testados: ceftriaxone (CRO), cefotaxima (CTX), cefpodoxima (CPD), aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ) e cefepime (FEP)	32
Figura 8 - Porcentagem de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes aos antibióticos testados	35
Figura 9 - Porcentagem de <i>Escherichia coli</i> resistentes aos antibióticos testados	35
Figura 10 - Porcentagem de <i>Proteus mirabilis</i> resistentes aos antibióticos testados	36
Figura 11 - Comparação da resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados no estudo em amostras contendo ou não a bactéria <i>Proteus mirabilis</i>	38
Figura 12 - Etest, fita contendo ceftazidima em uma extremidade e ceftazidima associada ao ácido clavulânico na outra	41
Figura 13 - Porcentagens de amostras ESBL positivas e negativas de acordo com a espécie bacteriana detectada pelo método Etest [®] para ESBL	42

Figura 14 -	Porcentagens de amostras ESBL positivas e negativas de acordo com a espécie bacteriana detectada pelo método automatizado do sistema Vitek®	44
Figura 15 -	Comparação entre os métodos de detecção de ESBL Etest® e Vitek®, de acordo com cada espécie bacteriana	46

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1 - Classificação molecular e funcional das β -lactamases bacterianas	9
Tabela 2 - Testes de Triagem e Confirmatório para ESBL em <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Proteus mirabilis</i> recomendado pelo CLSI	14
Tabela 3 - Interpretação dos resultados do Etest [®] para ESBL	18
Tabela 4 - Distribuição das amostras clínicas por sítio de isolamento	31
Tabela 5 - Perfil de sensibilidade das amostras produtoras de ESBL, <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> e <i>K. oxytoca</i> , frente aos 6 antimicrobianos testados para a triagem de ESBL por disco difusão	34
Tabela 6 - Resultado da detecção da produção da enzima β -lactamase de espectro ampliado pela metodologia do Etest [®] para ESBL nas diferentes espécies bacterianas estudadas	42
Tabela 7 - Resultado da detecção da produção da enzima β -lactamase de espectro ampliado pela metodologia do sistema automatizado Vitek [®] nas diferentes espécies bacterianas	43
Tabela 8 - Comparação entre os métodos de confirmação de produção de ESBL utilizados	45

Resumo

A função catalítica das β -lactamases de espectro ampliado é capaz de produzir altos graus de resistência bacteriana aos antimicrobianos β -lactâmicos e o surgimento das ESBL entre os membros da família Enterobacteriaceae, principalmente *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, ocorreu devido à disseminação dessas enzimas e o aparecimento de novas variantes pela grande utilização de antibióticos como cefalosporinas de amplo espectro. As ESBL são β -lactamases capazes de conferir resistência bacteriana contra penicilinas, cefalosporinas de 1ª, 2ª e 3ª gerações e aztreonam (mas não cefamicinas e carbapenens) por hidrólise destes antibióticos. Devido a este fenômeno, a triagem e a detecção exata dos produtores de ESBL são essenciais para a seleção apropriada da antibioticoterapia. Os objetivos deste estudo foram avaliar o melhor antimicrobiano para a triagem de bactérias produtoras de ESBL e o melhor método para detectá-las. Foram avaliadas 200 amostras sequenciais de bactérias pertencentes às espécies *Klebsiella pneumoniae* (56,5%), *Escherichia coli* (34%), *Proteus mirabilis* (8,5%) e *Klebsiella oxytoca* (1%) já caracterizadas como produtoras de ESBL entre Fevereiro a Setembro de 2008 no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP. Para a triagem de bactérias produtoras de β -lactamase de espectro ampliado foram utilizados os discos recomendados pelo CLSI 2008, aztreonam (ATM), cefpodoxima (CPD), ceftriaxone (CRO), cefotaxima (CTX) e ceftazidima (CAZ), além de cefepime (FEP). A produção de ESBL foi confirmada por três métodos, o teste de disco aproximação, Etest® para ESBL e sistema automatizado Vitek®. Os discos utilizados no teste de disco aproximação foram: uma penicilina associada com um inibidor de β -lactamase amoxicilina-ácido clavulânico, e dois antibióticos β -lactâmicos ceftazidima e cefotaxima. Para o Etest® foi utilizada uma fita contendo o substrato ceftazidima em uma extremidade e ceftazidima associado ao ácido clavulânico na outra extremidade e para o Vitek®, cartões de sensibilidade apropriados para a detecção de ESBL. Para *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, 100% das amostras foram resistentes aos antibióticos ceftriaxone, cefpodoxima e cefotaxima, 97% das amostras foram resistentes ao aztreonam, 89% à ceftazidima e 59% ao cefepime. Para *Proteus mirabilis*, 100% das amostras apresentaram resistência aos antibióticos ceftriaxone, cefpodoxima e cefotaxima, 65% à cefepime e 29% à ceftazidima e aztreonam. Dentre os

métodos de detecção, o Etest[®] para ESBL detectou a produção da enzima em 95,5% das amostras e o Vitek[®] em 78,5% em relação à metodologia de referência no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu.

Abstract

The catalytic function of extended-spectrum β -lactamases can result in high degrees of bacterial resistance to β -lactamic antimicrobials and in the emergence of ESBL among the members of Enterobacteriaceae family, especially *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. This occurs due to the dissemination and emergence of new variants of these enzymes caused by the high utilization of antibiotics like broad-spectrum cephalosporins. The ESBL are β -lactamases capable of conferring bacterial resistance to the penicillins, 1st, 2nd and 3rd generation cephalosporins, and aztreonam (but not cephamycins and carbapenems) through the hydrolysis of these antibiotics. In view of this phenomenon, the exact screening and detection of the producers of ESBL are essential for the appropriate selection of the antimicrobial therapy. The purposes of this study were to evaluate the best antimicrobial for the selection of ESBL producers and to determine the best method for the detection of such microorganisms. We evaluated 200 sequential bacterial samples including the species *Klebsiella pneumoniae* (56.5%), *Escherichia coli* (34%), *Proteus mirabilis* (8.5%) and *Klebsiella oxytoca* (1%), previously characterized as ESBL producers between February and September 2008 in the Laboratory of Microbiology, Botucatu Medical School - UNESP, Botucatu, São Paulo State, Brazil. To select the ESBL-producer bacteria, we used the disks recommended by CLSI 2008, aztreonam (ATM), cefpodoxime (CPD), ceftriaxone (CRO), cefotaxime (CTX) and ceftazidime (CAZ), besides cefepime (FEP). ESBL production was confirmed by three methods: double disk screening, ESBL Etest[®], and Vitek[®] automated system. The disks employed in the double disk screening were: penicillin associated with β -lactamase inhibitor, amoxicillin-clavulanic acid, and two β -lactamic antibiotics, ceftazidime and cefotaxime. For the Etest[®], we used a strip containing the substrate ceftazidime in one of its edges and ceftazidime associated with clavulanic acid in the other edge; for Vitek[®], we employed sensitivity cards specific for ESBL detection. Considering *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, 100% samples were resistant to the antibiotics ceftriaxone, cefpodoxime and cefotaxime, 97% to aztreonam, 89% to ceftazidime and 59% to cefepime. As regards *Proteus mirabilis*, 100% samples were resistant to ceftriaxone, cefpodoxime and cefotaxime, 65% to cefepime, and 29% to ceftazidime and aztreonam. Of the employed methods, ESBL Etest[®]

detected the enzyme production in 95.5% samples and Vitek[®] in 78.5% comparing with the reference method of the Laboratory of Microbiology, Botucatu Medical School - UNESP.

Introdução

1. Introdução

1.1. Histórico

As primeiras descrições sobre o uso de antimicrobianos datam de 992 a.C., quando os chineses usavam bolores para tratar tumores inflamatórios e feridas infeccionadas, os sumérios recomendavam emplastos com uma mistura de vinho, cerveja, zimbro e ameixas. O valor terapêutico dos bolores provavelmente decorria da ação de antibióticos produzidos pelos fungos, totalmente desconhecidos na época; já o valor terapêutico do vinho e da cerveja decorria da ação antimicrobiana do álcool (TAVARES, 2001).

O próximo grande passo na história das drogas antimicrobianas ocorreu na década de 1930, com a demonstração da atividade terapêutica das sulfonamidas contra as infecções bacterianas sistêmicas. As sulfas já eram utilizadas como corantes na época e, embora Eisenberg, em 1913, tivesse verificado que estas substâncias exerciam um efeito antibacteriano *in vitro*, os produtos existentes eram muito tóxicos para o homem.

Em 1932, Gerhard Domagk demonstrou, pela primeira vez, a atividade antibacteriana das sulfas *in vivo* utilizando a sulfamidocrisoidina no tratamento de infecções em camundongos. Em 1933 a droga foi experimentada em um paciente com septicemia estafilocócica, curando-o. Logo depois, foi demonstrado que a substância ativa da sulfamidocroidina era a sulfanilamida, composto químico conhecido desde 1908, sintetizado por Gelmo.

Segundo Tavares (2001), o final da década de 1930 e, principalmente, a década de 1940 foram marcadas pelo grande desenvolvimento da indústria químico-farmacêutica de síntese, dando origem a inúmeros quimioterápicos. Foi nesta época que o mundo assistiu ao surgimento de uma nova era no tratamento das infecções, com a introdução dos antibióticos na prática médica.

A penicilina foi o primeiro antibiótico de utilidade clínica, descoberto por Alexander Fleming em 1929. Posteriormente, Chain, Florey et al isolaram a penicilina de culturas de *Penicillium* spp, o antibiótico isolado mostrou-se eficaz contra bactérias Gram-positivas e desprovido de toxicidade no tratamento de infecções em animais de

experimentação. Em 1941, a penicilina foi testada no tratamento de uma infecção humana, mostrando-se eficaz e não tóxica para o organismo.

O uso terapêutico da penicilina tornou-se realidade na prática clínica a partir de 1943. A droga rapidamente revelou-se eficaz no tratamento de pneumonias, sífilis, difteria, amigdalites, sepses, endocardite bacteriana, meningites e outras infecções causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (TAVARES, 2001).

Vários outros antibióticos foram descobertos após a penicilina, como a estreptomicina em 1944, cefalosporina em 1945, o cloranfenicol em 1947 entre outras drogas (ROSSI & ANDRAZZI, 2005). O surgimento destas novas drogas fez com que o mundo científico de então ficasse maravilhado, houve uma grande euforia no mundo todo, na esperança de que se conseguiria debelar a maioria das enfermidades infecciosas graves (GURGEL & AZEVEDO, 1975).

Todavia, num curto período de tempo, verificou-se que estes antibióticos não apresentavam mais a mesma eficácia com o aparecimento de microrganismos resistentes a estas drogas (GURGEL & AZEVEDO, 1975). Segundo Rossi & Andreazzi (2005), os principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos são: alteração do sítio de ação da droga, alteração da permeabilidade, expulsão das drogas (bomba de efluxo) e, principalmente, produção de enzimas inativadoras dos antimicrobianos. Dentre este último mecanismo, a produção de β -lactamase é de grande importância e, há relativamente poucos anos, o surgimento da β -lactamase de espectro ampliado (ESBL) tem causado séria implicação na antibioticoterapia.

As ESBL são β -lactamases capazes de conferir resistência bacteriana contra penicilinas, cefalosporinas de 1^a, 2^a e 3^a gerações e aztreonam (mas não cefamicinas e carbapenens) por hidrólise destes antibióticos; e são inibidos por inibidores de β -lactamase como o ácido clavulânico (PATERSON & BONOMO, 2005).

Estas enzimas são produzidas, principalmente, por bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, porém podem ser observadas também em *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenza* e *Neisseria gonorrhoeae* (BRADFORD, 2001; LIVERMORE, 1995). Apesar da família Enterobacteriaceae abranger 30 gêneros e mais de 120 espécies (FARMER III, 1999), as bactérias majoritariamente produtoras de ESBL pertencem aos seguintes gêneros: *Klebsiella* spp, *Escherichia* spp e *Proteus* spp.

As espécies pertencentes à família Enterobacteriaceae são bacilos Gram-negativos, não esporulados, imóveis ou apresentam flagelos peritríquios para sua motilidade, e exibem crescimento em condições aeróbias e anaeróbias (são anaeróbios facultativos). Fermentam a glicose, quase sempre com produção de gás, reduzem nitrato a nitrito e são oxidase negativas, com exceção da *Plesiomonas* sp.

1.2. Antibióticos β -lactâmicos

O grupo dos β -lactâmicos reúne alguns dos antimicrobianos mais importantes e mais utilizados na prática clínica para o tratamento de infecções hospitalares e comunitárias. Pertencem a este grupo drogas das seguintes classes antimicrobianas: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenens (SANDERS & SANDERS, 1992).

A estrutura básica desses antimicrobianos é composta por três componentes principais: o anel β -lactâmico, o anel tiazolidínico (penicilinas) ou diidrotiazina (cefalosporinas) e a cadeia lateral, sendo esta última responsável pela maior parte das características farmacodinâmicas e do espectro de ação do antimicrobiano. Embora a classificação seja baseada nas diferenças da estrutura molecular dos diferentes compostos, subdivisões mais práticas têm sido propostas baseando-se no espectro antimicrobiano do composto e na sua estabilidade diante dos mecanismos de resistência bacteriana, como por exemplo, a divisão das cefalosporinas em 1ª, 2ª, 3ª e 4ª gerações, classificando-as de acordo com sua crescente potência em atuar contra bacilos Gram-negativos (LIVERMORE & WILLIAMS, 1996) (Figura 1).

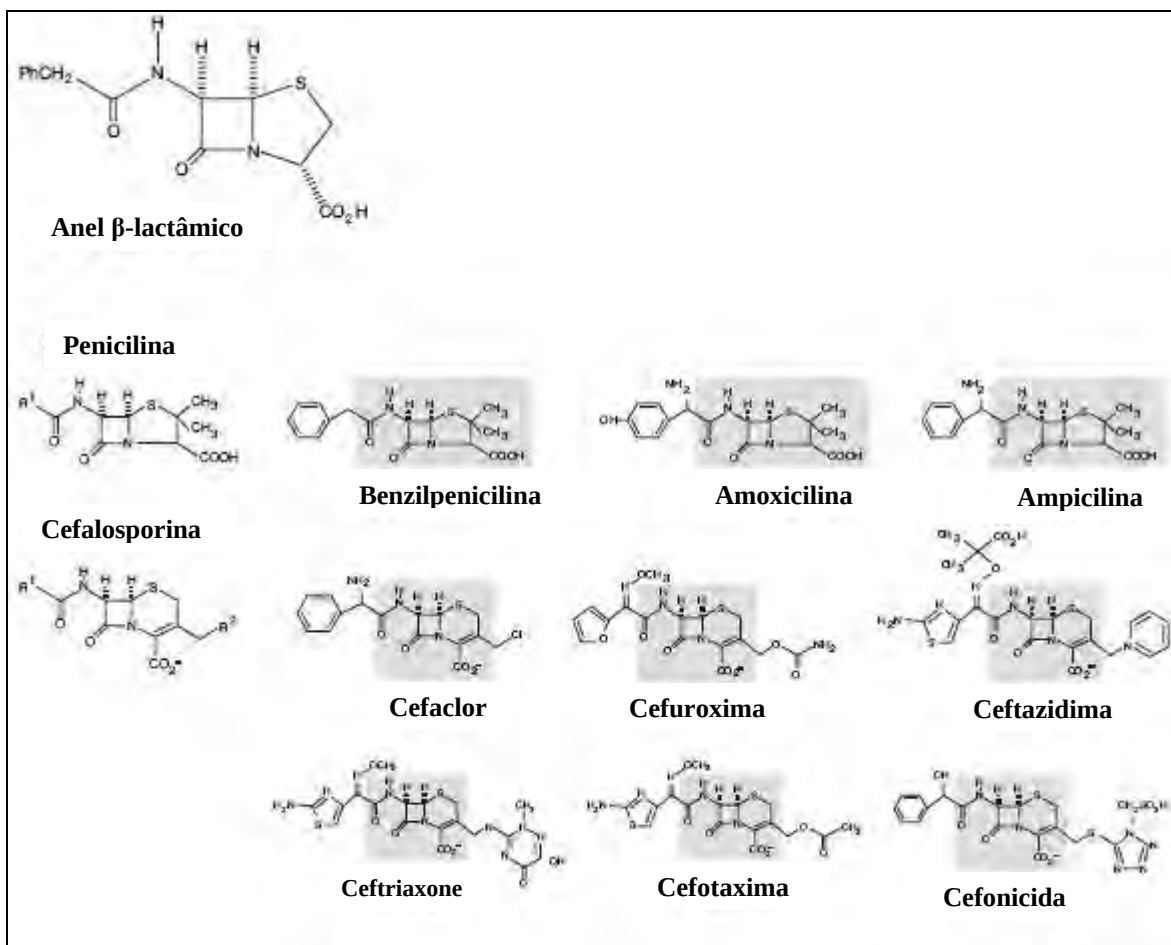


Figura 1. Estrutura química do anel β -lactâmico e de alguns antibióticos que contêm este anel em sua estrutura (Adaptado de ANTUNEZ et al, 2006).

Os β -lactâmicos atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana, através da inibição proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs: “penicillin binding proteins”) uma transpeptidase que sintetiza o peptidoglicano, um importante componente da parede celular bacteriana (QUINTILIANI et al, 1999).

Durante a síntese da parede celular bacteriana, a pressão osmótica interna é mantida pela rígida estrutura desta parede. A união de precursores da parede celular ocorre por catálise de enzimas específicas e de proteínas reguladoras, as PBPs. Quando a bactéria é exposta ao antibiótico, este se liga às PBPs na membrana celular bacteriana e enzimas autolíticas são liberadas na membrana da célula, degradando a parede celular levando à lise celular e conseqüente morte bacteriana (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

1.3. Mecanismo de resistência aos β -lactâmicos

A resistência bacteriana aos antimicrobianos β -lactâmicos está relacionada à síntese da parede celular ou à degradação da droga. Os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos podem envolver a alteração do sítio de ligação, diminuindo a afinidade pelos alvos da droga (PBP); a alteração da permeabilidade da membrana externa bacteriana; o efluxo ativo de antibióticos e a inativação ou degradação da droga pela hidrólise do anel β -lactâmico (RICE, 2001).

A modificação das PBPs é o principal mecanismo de resistência bacteriana aos β -lactâmicos nos cocos Gram-positivos e em algumas bactérias fastidiosas Gram-negativas como *Neisseria gonorrhoeae* (SANDERS & SANDERS, 1992).

A afinidade dos agentes antimicrobianos às diversas PBPs é variável. Mutações podem alterar as PBPs pré-existentes que passam então a apresentar baixa afinidade de ligação aos β -lactâmicos, ou levar a produção de PBPs suplementares que apresentam baixa afinidade aos β -lactâmicos e são capazes de substituir as PBPs que se encontram inibidas. Essas PBPs alteradas não permitem a ligação do antibiótico β -lactâmico e, com isso, este não poderá agir (LIVERMORE, 1991).

A alteração de permeabilidade da membrana externa bacteriana pode constituir um mecanismo de resistência nas Gram-negativas, mas não nas Gram-positivas, pois estas não possuem membrana externa. A perda de uma proteína de membrana ou porina da membrana externa pode reduzir o acesso do antibiótico ao espaço periplasmático, uma vez que os β -lactâmicos têm que cruzar a membrana externa das bactérias Gram-negativas através de porina de membrana externa. Em bactérias mutantes esta porina pode não ser produzida e ocorre a impermeabilidade da membrana (NIKAIDO, 1994; BRADFORD, 2001; RICE, 2001).

A impermeabilidade da membrana externa é um dos poucos mecanismos de resistência bacteriana no qual uma alteração estrutural pode conferir resistência à diversas classes de antimicrobianos (LIVERMORE, 1991).

Algumas bactérias possuem a propriedade de expulsar os antibióticos para fora da célula de uma maneira ativa, contribuindo para uma concentração inadequada da droga e, conseqüentemente, para uma ação não efetiva dela (bomba de efluxo) (ROSSI &

ANDREAZZI, 2005).

A produção de enzimas que inativam os antimicrobianos é um dos principais mecanismos de resistência bacteriana. Dentre as enzimas produzidas, destacam-se as β -lactamases, principalmente as β -lactamases de espectro ampliado (ESBL).

1.4. β -lactamases

As β -lactamases são enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico e são produzidas por diferentes espécies bacterianas com características distintas. Nas bactérias Gram-positivas estas enzimas são secretadas para o meio extracelular, possuindo menor atividade quando comparada às β -lactamases produzidas pelas bactérias Gram-negativas. Nas bactérias Gram-negativas estas enzimas são armazenadas no espaço periplasmático, podendo alcançar grandes concentrações e ter uma ação mais eficaz sobre os β -lactâmicos que estão atravessando este espaço para atingir seu alvo (ROSSI & ANDREAZZI, 2005). Este é o principal mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos pois diminuem a habilidade destes de atingirem as proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs).

O principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas aos β -lactâmicos é decorrente da produção de β -lactamase (SANDERS et al, 1996, BABIC, 2006). Os genes que transcrevem β -lactamases podem estar localizados no cromossomo bacteriano, nos plasmídios ou nos transposons (BABIC, 2006). Estas enzimas atuam via éster de serina em que o anel β -lactâmico é atacado pela hidroxila livre da cadeia lateral do resíduo de serina que ativa o sítio da enzima, produzindo um éster acil covalente. O anel β -lactâmico é rompido em sua cadeia lateral pelo radical hidroxil livre do resíduo de serina da β -lactamase (sítio ativo da enzima). Após a hidrólise do éster ocorre a liberação da enzima ativa e da droga inativada (LIVERMORE, 1995; ROSSI & ANDREAZZI, 2005; BABIC et al, 2006).

1.5. Classificação das β -lactamases

Devido a grande diversidade de enzimas produzidas, vários esquemas foram propostos para classificá-las (RICHMOND & SYKES, 1973; SYKES & MATTHEW, 1976), porém as duas classificações mais utilizadas para a classificação das β -lactamases são as classificações de Ambler e de Bush-Medeiros-Jacoby (AMBLER, 1980; BUSH et al, 1995).

Ambler classifica as enzimas conforme a estrutura molecular separando as β -lactamases em quatro classes moleculares distintas, baseada na homologia da sequência de aminoácidos. As classes A, C e D são serinas β -lactamases e as enzimas da classe B são metalo- β -lactamases dependentes de zinco para sua ativação (RICE & BONOMO, 2007).

A classificação de Bush-Jacoby-Mediros também separa as β -lactamases em quatro grupos, e múltiplos subgrupos, de acordo com sua similaridade funcional. O grupo 1 inclui as β -lactamases que não são inibidas por ácido clavulânico; as β -lactamases do grupo 2 podem ser subdivididas em vários subgrupos de acordo com o perfil do substrato (2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e, 2f); no grupo 3 estão as metalo- β -lactamases, que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas e não possuem atividade sobre o aztreonam, e ainda são inibidas pelo EDTA e compostos do grupo tiol; no grupo 4 estão as enzimas ainda não seqüenciadas e que não estão incluídas nos grupamentos citados (BUSH et al, 1995; BUSH, 2001) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação molecular e funcional das β -lactamases bacterianas

Grupo Funcional Bush-Jacoby- Medeiros	Subgrupos Bush-Jacoby- Medeiros	Classe Molecular Ambler	Ácido Clavulânico ¹	Características Funcionais
1		C	R	Enzimas cromossômicas e plasmidiais de Gram-negativos. Conferem resistência a todos os β -lactâmicos, exceto carbapenêmicos.
2		A, D		Grande maioria das enzimas é inibida por ácido clavulânico.
2	2a	A	S	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos níveis de resistência às penicilinas.
2	2b	A	S	β -lactamases de espectro reduzido de bactérias gram-negativas. Inclui TEM-1, TEM-2 e SHV-1.
2	2be	A	S	β -lactamases de espectro ampliado conferem resistência a cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
2	2br	A	S /R	β -lactamases derivadas da TEM resistentes ao inibidor de β -lactamases.
2	2c	A	S	Enzimas que hidrolisam a carbenecilina.
2	2d	D	S/R	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina).
2	2e	A	S	Cefalosporinas inibidas pelo ácido clavulânico.
2	2f	A	S	Enzimas que hidrolisam carbapenems com sítio ativo serina.
3	3a, 3b, 3c	B	R	Metalo- β -lactamases que conferem resistência aos carbapenems e todos os outros β -lactâmicos com exceção dos monobactâmicos.
4		ND ²	R	Enzimas não seqüenciadas que não se encaixam em outros grupos.

1. Abreviaturas: R – resistente (enzimas não inibidas pelo ácido clavulânico); S – sensível (enzimas inibidas pelo ácido clavulânico).

2. ND: não determinado. (Adaptado do artigo de BUSH, 2001).

1.6. β -lactamases de espectro ampliados (ESBL)

A função catalítica das β -lactamases de espectro ampliado é capaz de produzir altos graus de resistência bacteriana aos antimicrobianos, e o surgimento das ESBL entre os membros da família Enterobacteriaceae, principalmente *Klebsiella* sp. e *Escherichia coli*, ocorreu devido à disseminação dessas enzimas e o surgimento de novas variantes pela grande utilização de antibióticos como cefalosporinas de amplo espectro. (SADER et al, 1999; ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

A definição mais utilizada é a de que as ESBL são β -lactamases capazes de conferir resistência bacteriana contra penicilinas, cefalosporinas de 1^a, 2^a e 3^a gerações e aztreonam (mas não cefamicinas e carbapenens) por hidrólise destes antibióticos e são inativados por inibidores de β -lactamase como o ácido clavulânico (PATERSON & BONOMO, 2005). O ácido clavulânico, apesar de possuir o anel β -lactâmico em sua estrutura, apresenta baixa atividade antibacteriana e alta afinidade pelas β -lactamases, esta afinidade impede a hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos.

São enzimas mediadas por genes plasmidiais, não induzíveis, capazes de hidrolisar a cadeia oximino- β -lactâmica presente na estrutura da droga. Frequentemente, na mesma cepa, podem existir muitos plasmídios e múltiplas ESBL (BUSH, 2001; ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

As ESBL estão no grupo funcional 2be de Bush e no grupo molecular A de Ambler. Esta classificação 2be mostra que estas enzimas derivam do grupo 2b β -lactamases (por exemplo, TEM-1, TEM-2 e SHV-1); a letra e do subgrupo 2be indica que a β -lactamase possui um amplo espectro. TEM-1 é a mais comum β -lactamase plasmidial que confere resistência à ampicilina em *Escherichia coli*, SHV-1 é produzido majoritariamente por *Klebsiella pneumoniae* e TEM-2 é o membro menos comum do grupo e possui propriedades bioquímicas semelhantes a TEM-1 (PATERSON & BONOMO, 2005).

As ESBL foram descobertas na Alemanha em 1983 em isolados de *Klebsiella pneumoniae* (SHV-2), logo após a introdução das oximino-cefaloporinas como a cefotaxima; posteriormente estas enzimas foram encontradas na Europa, EUA e Ásia. Devido ao amplo espectro de ação, principalmente contra oximino-cefalosporinas estas

enzimas foram chamadas de β -lactamase de espectro ampliado (ESBL) (SANDERS et al, 1996; BRADFORD, 2001; ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

A produção de ESBL ocorre predominantemente em *Klebsiella* spp. e em menor grau em *Escherichia coli*, mas pode ser encontrada em vários outros patógenos clinicamente importantes sendo um problema significativo no tratamento de infecções graves por estes agentes. A predileção pelo gênero *Klebsiella* é explicada pelo fato destes organismos apresentarem fatores para sobrevivência maior do que outras enterobactérias em tecidos como a pele e superfícies, facilitando a disseminação da infecção de cepas com esse tipo de resistência (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

A evolução das ESBLs, com múltiplas mudanças de aminoácidos, reflete o acúmulo de mutações aleatórias que gradativamente aumentam a atividade destas cefalosporinases até a expressão de resistências clinicamente significativas. Mesmo com o desenvolvimento de novos β -lactâmicos há a emergência de novas β -lactamases de todas as linhagens causando resistência às novas drogas (BRADFORD, 2001; RICE, 2001; PATERSON & BONOMO, 2005).

Apesar de amostras produtoras de ESBL serem classificadas como sensíveis a vários antibióticos β -lactâmicos, vários relatos de falhas terapêuticas têm sido descritos. Isso porque a resistência a esse agente pode não ser identificada durante o antibiograma, visto que a produção da enzima ocorre em pequenas quantidades e varia conforme o tempo de incubação. Além disso, o grau de resistência aos β -lactâmicos é variável e depende da quantidade de enzima produzida, do inóculo, de sua habilidade em hidrolisar o antimicrobiano e da velocidade com que o antibiótico penetra na membrana externa da bactéria (SADER, 2000).

Ainda que a detecção destas amostras seja difícil, vários estudos têm demonstrado a importância dessas infecções por todo o mundo. As falhas na detecção de amostras produtoras de ESBL dificultam a identificação de surtos e a tomada de medidas de controle para prevenir a disseminação destas amostras (THOMSON et al, 1996).

Existem diversos tipos de ESBL, a maioria delas é derivada das enzimas TEM ou SHV, atualmente existe uma grande variedade de ESBL distinguidas pelo perfil do substrato, reação com inibidores e ponto isoelétrico. Todos os tipos de enzimas podem ser encontrados no site <http://www.lahey.org/Studies/>. Os tipos TEM e SHV são mais

encontrados em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, porém eles também podem ser encontrados em *Proteus* spp., *Providencia* spp e em outras bactérias da família Enterobacteriaceae (BRADFORD, 2001).

As variantes de ESBL de maior interesse clínico provêm da família TEM, o nome desta enzima deriva de **Temoniera**, uma paciente grega da qual foi isolado o primeiro microrganismo com esta característica, que ficou conhecida como TEM-1 (BRADFORD, 2001; ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

A β -lactamase TEM é encontrada em bactérias Gram-negativas, principalmente em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Porém, ela também é encontrada em outras espécies da família Enterobacteriaceae como *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* e *Salmonella* spp (BRADFORD, 2001).

A TEM-1 é capaz de hidrolisar penicilinas e algumas cefalosporinas como cefalotina e cefaloridina. TEM-2 é o primeiro derivado de TEM-1, possui uma única substituição da β -lactamase original levando a uma mudança no ponto isoelétrico de um pI de 5,4 para 5,6 (BRADFORD, 2001; PATERSON & BONOMO, 2005).

O nome da enzima SHV refere-se a sua estrutura química “**sulfhydryl variable**”. A maioria das ESBL tipo SHV é encontrada em amostras de *Klebsiella pneumoniae*, porém podem ser encontradas em *Citrobacter diversus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (BRADFORD, 2001) e *Acinetobacter* spp. (PATERSON & BONOMO, 2005).

A β -lactamase SHV-1 é mais comum na espécie *Klebsiella pneumoniae*, sendo responsável por mais de 20% de resistências plasmidial à ampicilina (BRADFORD, 2001).

As enzimas CTX-M são encontradas principalmente em amostras de *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e *Escherichia coli*, são também descritas em outras espécies da família Enterobacteriaceae. Estas enzimas são plasmidiais e hidrolisam preferencialmente cefotaxima. A CTX-M apresenta somente 40% de semelhança com os dois tipos de β -lactamase mais comuns (TEM e SHV).

Amostras de CTX-M foram isoladas em muitas partes do mundo, principalmente em alguns locais do leste europeu, América do Sul e Japão (BRADFORD, 2001). Na América do Sul, o tipo CTX-M-2 é o mais prevalente (LIVERMORE & BROWN, 2001).

A β -lactamase tipo OXA possui este nome devido a capacidade de hidrolisar oxacilina (PATERSON & BONOMO, 2005). Enquanto a maioria das ESBL pode ser

encontrada em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e em outras enterobactérias, as ESBL do tipo OXA são encontradas principalmente em *Pseudomonas aeruginosa* (BRADFORD, 2001).

Estas β -lactamases diferem das enzimas TEM e SHV por pertencer à classe molecular Ambler D e grupo funcional Bush 2b. As β -lactamases do tipo OXA conferem resistência à ampicilina e cefalotina, são caracterizadas pela atividade elevada de hidrólise contra oxacilina e cloxacilina, e são pouco inibidas pelo ácido clavulânico (BRADFORD, 2001).

1.7. Detecção de β -lactamase de espectro ampliado

O aumento da prevalência de enterobactérias produtoras de ESBL gerou uma grande necessidade para o laboratório testar métodos para a identificação da presença destas enzimas em isolados clínicos (BRADFORD, 2001).

O CLSI (“Clinical and Laboratory Standards Institute”) 2008 padroniza metodologias somente para *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*, descrevendo o teste em duas etapas, a primeira delas é o teste de *screening* inicial e depois o teste confirmatório (Tabela 2).

Tabela 2. Testes de Triagem e Confirmatório para ESBL em *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* recomendado pelo CLSI

Teste	Teste de Triagem Inicial	Teste de Confirmação Fenotípica
Método	Disco difusão	Disco difusão
Meio	Ágar Mueller-Hinton	Ágar Mueller-Hinton
Concentração do Disco Antimicrobiano	Para <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> e <i>E. coli</i> :	Ceftazidima 30 µg
	Cefpodoxima 10 µg ou	Ceftazidima – Ácido Clavulânico 30/10 µg
	Ceftazidima 30 µg ou	E
	Aztreonam 30 µg ou	
	Cefotaxima 30 µg ou	Cefotaxima 30 µg
	Ceftriaxone 30 µg	Cefotaxima – Ácido Clavulânico 30/10 µg
	Para <i>P. mirabilis</i> :	(O teste confirmatório requer o uso de cefotaxima e ceftazidima, e associados com ácido clavulânico)
	Cefpodoxima 10 µg ou	
	Ceftazidima 30 µg ou	
	Cefotaxima 30 µg	
	(O uso de mais de um agente antimicrobiano na triagem aumenta a sensibilidade da detecção)	
Inoculo	Recomendação padrão para disco difusão	Recomendação padrão para disco difusão
Condições de Incubação	35 ± 2 °C; ar ambiente	35 ± 2 °C; ar ambiente
Tempo de Incubação	16 - 18 horas	16 - 18 horas
Resultados	Para <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> e <i>E. coli</i> :	Um aumento ≥ 5 mm no diâmetro de cada agente antimicrobiano testado associado com ácido clavulânico vs. o diâmetro de cada agente testado sozinho = ESBL
	Halo de Cefpodoxima ≤ 17 mm	
	Halo de Ceftazidima ≤ 22 mm	
	Halo de Aztreonam ≤ 27 mm	
	Halo de Cefotaxima ≤ 27 mm	
	Halo de Ceftriaxone ≤ 25 mm	(Diâmetro da Ceftazidima = 16; Ceftazidima – Ácido Clavulânico = 21)
	Para <i>P. mirabilis</i> :	
	Halo de Cefpodoxima ≤ 22 mm	
	Halo de Ceftazidima ≤ 22 mm	
	Halo de Cefotaxima ≤ 27 mm	
	Halos de inibição abaixo podem indicar produção de ESBL.	
Recomendações para o Controle de Qualidade	Quando o teste de triagem antimicrobiana é realizado, <i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 é utilizado para o controle de qualidade (teste de treinamento, competência ou avaliação).	Quando o teste confirmatório para ESBL é realizado, <i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 e <i>E. coli</i> ATCC® 25922 devem ser testados rotineiramente (semanalmente ou diariamente).
	Outras cepas, <i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603 ou <i>E. coli</i> ATCC® 25922, podem ser utilizadas na rotina do controle de qualidade (semanalmente ou diariamente).	<i>E. coli</i> ATCC® 25922: aumento ≤ 2 mm no diâmetro do agente antimicrobiano testado sozinho vs. o diâmetro do agente associado com o ácido clavulânico.

<i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603:		<i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603:
Halo de Cefpodoxima	9-16 mm	aumento ≥ 5 mm no diâmetro de
Halo de Ceftazidima	10-18 mm	ceftazidima-ácido clavulânico;
Halo de Aztreonam	9-17 mm	aumento ≥ 3 mm no diâmetro de
Halo de Cefotaxima	17-25 mm	cefotaxima-ácido clavulânico.
Halo de Ceftriaxone	16-24 mm	

Adaptado de CLSI 2008. O CLSI 2008 também recomenda o teste de microdiluição em caldo, tanto para a triagem quanto para a confirmação, porém ela não foi colocada nesta tabela.

Além dos testes padronizados pelo CLSI existem métodos alternativos para a detecção de ESBL como o teste de aproximação dos discos, Etest® e sistemas automatizados.

1.7.1. Método da combinação de discos

Este teste depende da comparação dos halos de inibição dos discos, um contendo cefalosporina sozinha e outro associado ao ácido clavulânico. Se a produção de ESBL ocorrer, os halos de inibição do disco contendo o inibidor aumentam. O CLSI 2008 recomenda a comparação dos halos de inibição entre os discos contendo cefotaxima 30µg vs. cefotaxima associada com ácido clavulânico 30/10µg e ceftazidima 30µg vs. ceftazidima associada ao ácido clavulânico 30/10µg. Um aumento ≥ 5 mm no disco contendo ácido clavulânico, em comparação ao disco contendo a cefalosporina sozinha, indica a produção de ESBL (LIVERMORE & BROWN, 2001).

1.7.2. Teste aproximação dos discos (“Double-Disk Screening”)

Este teste foi descrito por Jarlier et al em 1988, sendo considerado um dos primeiros testes para a detecção de ESBL. O método utiliza dois discos de antibióticos contendo agentes de triagem recomendados pelo CLSI, como ceftazidima e cefotaxima, e um disco contendo um inibidor de β -lactamase, como amoxicilina/ácido clavulânico. Os discos são colocados a uma distância de 20mm, centro a centro, em relação ao disco contendo o inibidor de β -lactamase.

O aumento ou a distorção da zona de diâmetro, com a formação de uma zona extra de sinergismo (chamada de zona fantasma ou “ghost” zone) indicará a presença de ESBL, pois o ácido clavulânico, apesar de possuir o anel β -lactâmico em sua estrutura, apresenta baixa atividade antibacteriana e alta afinidade pelas β -lactamases sendo considerado um inibidor de β -lactamase (Figura 2).

Com isso, o ácido clavulânico contido no disco de amoxicilina + ácido clavulânico vai se difundir pelo meio, inibindo a enzima β -lactamase produzida pela bactéria. O antibiótico β -lactâmico, contido nos discos de cefotaxima e ceftazidima, vai agir formando a zona de inibição (zona fantasma) entre os discos.

A vantagem deste método simples é o baixo custo, a desvantagem é a de que a distância ótima entre os discos pode variar entre as amostras (LIVERMORE & BROWN, 2001).



Figura 2. Teste de disco aproximação com formação do sinergismo entre os discos. Um disco contendo amoxicilina+ácido clavulânico e outro aztreonam são colocados a uma distância de 20mm na placa de ágar Mueller-Hinton. Observar uma deformação característica (zona fantasma) representando o sinergismo entre os discos. Fonte: ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

1.7.3. Fitas de Etest para ESBL

As tiras de Etest[®] (AB Biodisk, Suécia) são fitas plásticas impregnadas com antibióticos específicos em um gradiente de concentração. Diversos antibióticos podem ser testados com estas fitas e, normalmente são utilizadas para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC: “Minimal Inhibitory Concentration”).

Já as fitas de Etest[®] para ESBL são utilizadas para a confirmação da presença da produção de ESBL, existem as fitas contendo ceftazidima (0,5-32µg/mL) / ceftazidima + ácido clavulânico (0,064-4µg/mL) (CAZ/CAZL), cefotaxima (0,25-16µg/mL) / cefotaxima + ácido clavulânico (0,016-1µg/mL) (CTX/CTXL) (Figura 3) e cefepime (0,25-16µg/mL) / cefepime + ácido clavulânico (0,064-4µg/mL) (FEP/FEPL).



Figura 3. Fita de Etest[®] para ESBL. Uma extremidade impregnada com concentrações crescentes de cefotaxima (CT) e a outra com concentrações crescentes de cefotaxima+ácido clavulânico (CTL).

Na Tabela 3 podemos verificar a interpretação dos resultados do Etest[®] para ESBL. Pode ocorrer a formação de uma zona fantasma abaixo do gradiente de concentração de CTXL, CAZL ou FEPL ou uma deformação da elipse de CTX, CAZ ou FEP, indicando a produção de ESBL. Isto ocorre devido o sinergismo entre o antibiótico β -lactâmico da fita (CTX, CAZ ou FEP) com o ácido clavulânico que se difundiu da extremidade CTXL, CAZL ou FEPL.

Tabela 3. Interpretação dos resultados do Etest[®] para ESBL

ESBL	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Resultado
Positivo	CTX $\geq 0,5$ e CTX/CTXL ≥ 8 Ou CAZ ≥ 1 e CAZ/CAZL ≥ 8 Ou FEP $\geq 0,25$ e FEP/FEPL ≥ 8 Ou Formação de uma zona fantasma ou deformação da elipse de CTX, CAZ ou FEP.	Produtor de ESBL e resistência a todas as penicilinas, cefalosporinas e aztreonam.
Negativo	CTX $< 0,5$ ou CTX/CTXL < 8 E CAZ < 1 ou CAZ/CAZL < 8	Não produtor de ESBL e reportar os MICs das drogas relevantes.
Não Determinado (ND)	CTX > 16 e CTXL > 1 E CAZ > 32 e CAZL > 4 E FEP > 16 e FEPL > 4 Ou Quando uma fita é ESBL negativo e a outra ND.	ESBL não determinado e reportar os MICs das drogas relevantes. Confirmar com resultados com testes moleculares.

Adaptado de AB Biodisk.

1.7.4. Sistemas automatizados

Existem alguns aparelhos automatizados que realizam a identificação do microrganismo e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

O sistema Vitek[®] (BioMérieux, França) é um aparelho automatizado para identificação de bactérias, leveduras e testes de sensibilidade aos antimicrobianos de bactérias não fastidiosas. Este sistema funciona com cartões específicos para a identificação e sensibilidade, que analisa também a produção de ESBL.

O cartão de identificação possui de 30 a 45 poços contendo diferentes tipos de substratos utilizados para a realização das provas bioquímicas. O cartão de sensibilidade possui 45 poços contendo alíquotas de um agente antimicrobiano específico em concentrações crescentes combinados com meio de cultura microbiológico.

O teste de ESBL é composto por dois poços, um com cefotaxima e o outro com ceftazidima a uma concentração de 0,5µg/mL e dois poços, um com uma combinação de cefotaxima e ácido clavulânico e no outro ceftazidima e ácido clavulânico, em ambos, a concentração de ácido clavulânico é de 4 µg/mL.

O aparelho Vitek[®] analisa automaticamente os poços e o poço de controle de crescimento entre 4 a 15 horas de incubação. Uma redução pré-determinada no crescimento da bactéria no poço contendo cefotaxima ou ceftazidima e ácido clavulânico, quando comparada com o nível de crescimento nos poços contendo o antibiótico isolado indica a presença da produção de ESBL (SANDERS et al, 1996).

1.7.5. Testes moleculares

O método molecular mais fácil e comum para detectar a presença de β-lactamase e identificar o tipo de enzima é a reação de polimerase em cadeia (PCR do inglês “polymerase chain reaction”) com seqüências iniciadoras (“primers”) de oligonucleotídeo específico para o gene da β-lactamase (BRADFORD, 2001).

Podem ser utilizados “primers” específicos para cada gene (*tem-1*, *tem-2*,...) das diversas enzimas descritas (TEM-1, TEM-2,...) ou, triagem inicial com “primers” específicos para cada família de enzimas (TEM, SHV, CTX,...), para posterior seqüenciamento dos genes específicos (HANSON et al, 1999).

Este teste identifica especificamente qual ESBL está presente no isolado clínico.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Comparar as metodologias de triagem e de detecção fenotípica de β -lactamase de espectro ampliado (ESBL) nas espécies de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella oxytoca* isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu no período de Fevereiro a Setembro de 2008.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a triagem de cepas potencialmente produtoras de ESBL, de acordo com os critérios padronizados pelo CLSI 2008.
2. Avaliar três metodologias disponíveis no mercado para detecção fenotípica de ESBL:
 - a) Teste de disco aproximação
 - b) Etest[®] para ESBL
 - c) Método automatizado Vitek[®]

Material e Método

3. Material e Método

3.1. Amostras bacterianas

Para este estudo foram estudadas amostras de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* isoladas de culturas de urina, sangue e secreções em geral de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, no período de Fevereiro a Setembro de 2008.

O isolamento destes microrganismos foi realizado semeando os materiais clínicos em placas de ágar sangue (Columbia Agar - Oxoid) e ágar McConkey (Merck). Para a identificação, foram utilizados os meios de cultura EPM (Escola Paulista de Medicina), MILI (Movimento, Indol e Lisina) e citrato (TOLEDO et al, 1982) e, quando necessário, provas bioquímicas adicionais. O antibiograma foi realizado pelo método de Kirby-Bauer (1966) e a leitura, segundo o CLSI.

As amostras selecionadas sequencialmente, no total de 200, foram as que apresentaram resistência à ceftriaxone, droga utilizada como triadora de ESBL pelo laboratório de Microbiologia da Seção de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas de Botucatu.

3.2. Triagem das bactérias produtoras de ESBL

O CLSI recomenda a utilização dos seguintes discos de antibióticos para a triagem de ESBL: cefpodoxima 10µg ou ceftazidima 30µg ou aztreonam 30µg ou cefotaxima 30µg ou ceftriaxone 30µg para *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*; e cefpodoxima 10µg ou ceftazidima 30µg ou cefotaxima 30µg para *Proteus mirabilis*.

Após a confirmação da produção de ESBL por, no mínimo, duas metodologias anteriormente citadas, as amostras foram repicadas em ágar Mueller-Hinton (Difco) suplementado com 5% de sangue de carneiro e em ágar MacConkey para a verificar a pureza da cultura. Após este procedimento, foi realizada uma suspensão em caldo Mueller-Hinton (Difco) com uma concentração equivalente a 0,5 da escala de McFarland utilizando-

se do colorímetro da marca Colorimeter Vitek (BioMérieux) e, com o auxílio de um “swab”, foi semeada em uma placa (15 X 150mm) de ágar Mueller-Hinton (Difco) e em seguida os discos de antibióticos foram dispensados na placa.

Além dos discos de antibióticos recomendados pelo CLSI (aztreonam 30µg, cefpodoxima 10µg, ceftazidima 30µg, cefotaxima 30µg e ceftriaxone 30µg), foram utilizados ainda uma cefalosporina de 4^a geração (cefepime 30µg), todos da marca Oxoid®, em todas as amostras (Figura 4). Esta triagem foi utilizada para a verificação do melhor antibiótico a ser utilizado na triagem de bactérias produtoras de ESBL na rotina laboratorial.

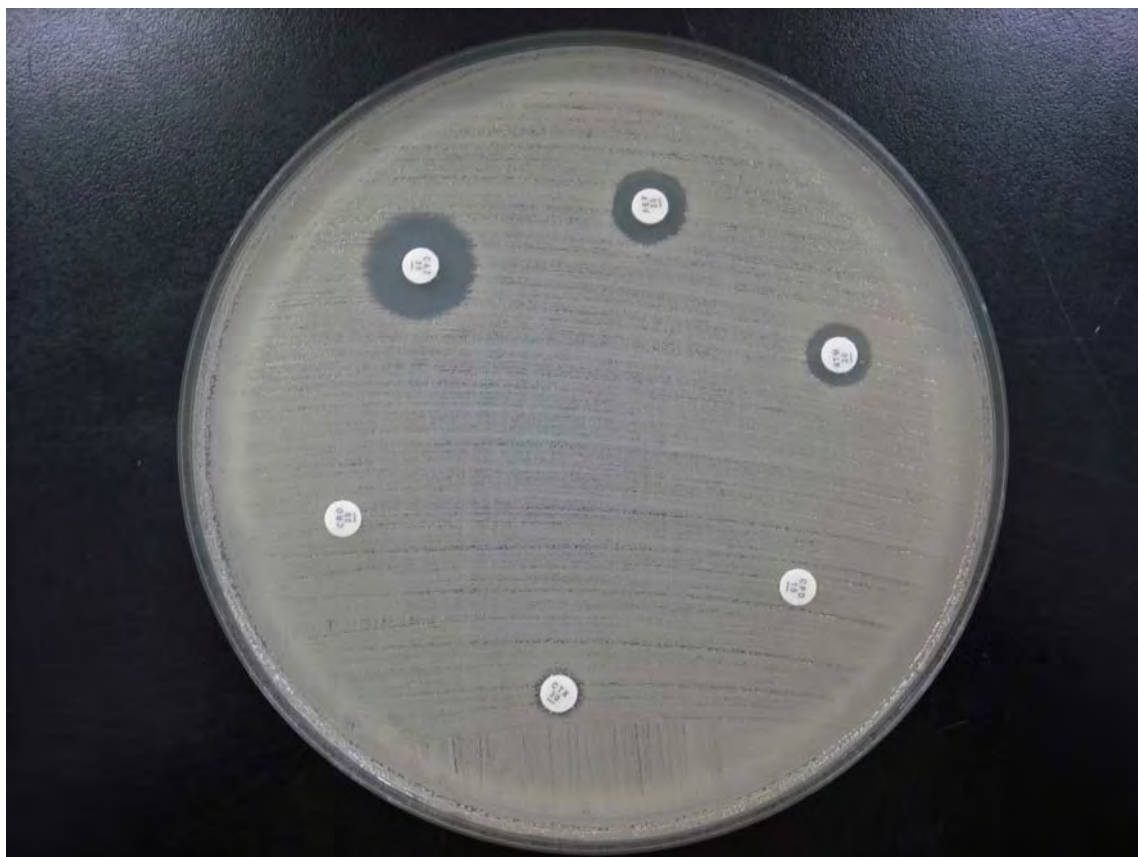


Figura 4. Disposição dos antimicrobianos, na placa de ágar Mueller-Hinton, utilizados neste estudo.

3.3. Testes para a detecção de ESBL

Apesar da metodologia PCR ser considerada padrão-ouro para a detecção de ESBL, seu alto custo e tempo prolongado do teste a torna inviável para ser utilizada em laboratório de rotina. Com isso, neste estudo foram consideradas produtoras de ESBL as amostras que apresentaram disco aproximação positivo e que, posteriormente, foram comparadas com método do Etest[®] para ESBL ou Vitek[®] positivos.

3.3.1. Disco aproximação

O teste de disco aproximação foi realizado em todas as amostras suspeitas de produzirem ESBL, isto é, ceftriaxone resistente. Uma suspensão bacteriana foi preparada em caldo Mueller-Hinton (Difco) com uma concentração equivalente a 0,5 da escala de McFarland, utilizando-se do colorímetro Colorimeter Vitek (BioMérieux) e com o auxílio de um “swab” foi semeada em uma placa de ágar Mueller-Hinton (BD, França) e foram dispensados os seguintes discos de antibióticos: amoxicilina-ácido clavulânico, ceftazidima e cefotaxima (Oxoid).

O disco de amoxicilina com ácido clavulânico foi colocado no centro e as outras duas drogas foram colocadas a uma distância de 20mm do centro, conforme padronização do teste pelo CLSI 2008. As placas foram incubadas por 16 a 18 horas a 35°C e, após este período, analisadas para a verificação da formação da zona de sinergismo ou a chamada zona fantasma (“ghost zone”) (JARLIER, 1988) (Figura 5).

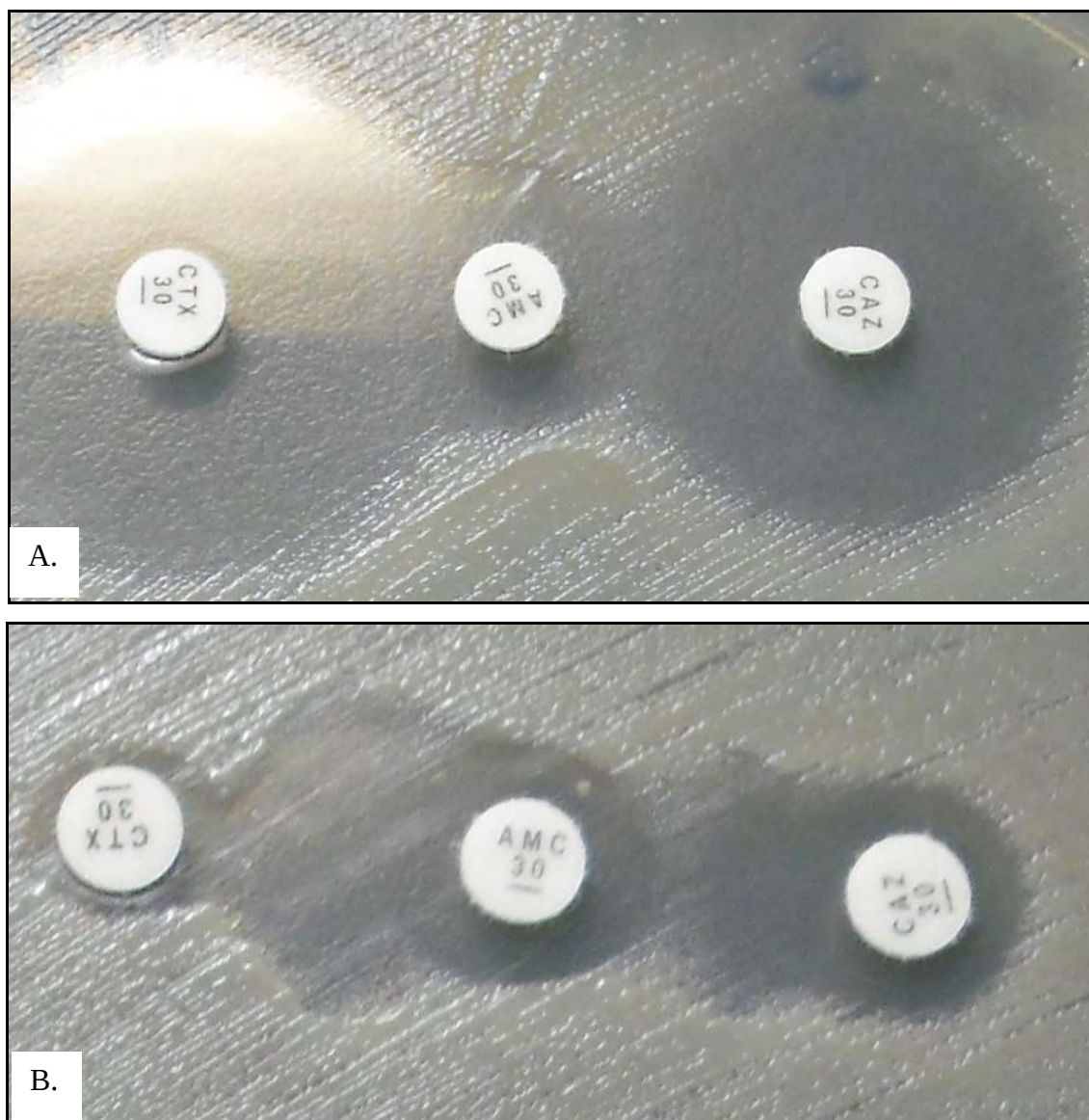


Figura 5. Teste de disco aproximação. No centro, disco contendo amoxicilina-ácido clavulânico (AMC) separado a uma distância de 20mm dos discos de cefotaxima (CTX) e ceftazidima (CAZ). A. Resultado negativo. B. Resultado positivo, com a formação do sinergismo entre os discos.

3.3.2. Etest®

Devido ao alto custo das fitas de Etest®, apenas a fita de Etest® para ESBL Ceftazidima/ Ceftazidima + Ácido Clavulânico (AB Biodisk) foi utilizado, permitindo observar a presença da produção de ESBL e também a concentração inibitória mínima (“minimal inhibitory concentration” – MIC).

A suspensão bacteriana ajustada a uma concentração de 0,5 da escala de McFarland foi semeada em uma placa (90 X 15mm) de ágar Mueller-Hinton (Difco) e a fita de Etest® para ESBL Ceftazidima/ Ceftazidima + Ácido Clavulânico (AB Biodisk, Suécia), retirada do freezer trinta minutos antes de ser utilizada, foi disposta na placa com o auxílio de uma pinça, até quinze minutos após a semeadura. As placas foram incubadas por 16 a 18 horas a 35°C e posteriormente foi realizada a leitura.

O MIC foi determinado como a primeira concentração acima da intersecção entre a elipse de inibição de crescimento bacteriano e a fita de Etest® para ESBL. As amostras que apresentaram uma razão entre o MIC para ceftazidima e o MIC para ceftazidima com ácido clavulânico maior ou igual a oito, ou aquelas que apresentaram a formação de uma zona fantasma ou deformação na elipse foram consideradas produtoras de ESBL.

3.3.3. Método automatizado

A detecção da produção de ESBL por meio de um sistema automatizado foi realizada através do Vitek® (BioMérieux), este método consiste de testes de sinergismo automatizados.

Os cartões GNS (“Gram Negative Susceptibility”) podem testar uma série de antibióticos como amicacina, ampicilina, ampicilina/sulbactam, aztreonam, cefepime, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, cefalotina, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina/tazobactam e trimetropina/sulfametoxazol. Possuem ainda locais especiais para a detecção de ESBL: ceftazidima, ceftazidima + ácido clavulânico, cefotaxima e cefotaxima + ácido clavulânico.

A leitura é realizada automaticamente pelo aparelho e sua interpretação é baseada na diferença de crescimento bacteriano nos orifícios com e sem inibidor de β -lactâmico (ácido clavulânico). Uma amostra será considerada produtora de ESBL se a diferença entre os MIC do antibiótico isolado e do antibiótico associado ao ácido clavulânico for maior ou igual a quatro diluições.

3.4. Análise dos resultados

A estatística para a comparação das drogas utilizadas na triagem de bactérias produtoras de ESBL e para a comparação dos métodos de detecção fenotípica de ESBL foi realizada através do teste do Qui-Quadrado e o teste t de Student. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e o intervalo de confiança utilizado para avaliação do risco relativo foi de 95%.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

A pesquisa de bactérias produtoras da enzima β -lactamase de espectro ampliado é muito importante nos laboratórios de microbiologia clínica devido à existência de bactérias multirresistentes aos antibióticos. A bactéria resistente pode ser selecionada durante o uso inadequado de determinados antimicrobianos, além do que, os genes que codificam esta resistência podem ser adquiridos de outras espécies bacterianas (LIVERMORE, 1991; SANDERS & SANDERS, 1992).

As infecções causadas por bactérias multirresistentes normalmente necessitam de um tempo maior de hospitalização e de agentes terapêuticos mais potentes, que geralmente são mais tóxicos e caros, além de apresentarem uma maior taxa de morbidade e mortalidade que infecções causadas por germes sensíveis ao antibiótico (JACOBY & ARCHER, 1991).

A detecção da enzima ESBL é dificultada pelo fato de a acurácia do teste estar relacionada ao tipo de enzima produzida, já que as ESBL possuem uma expressão fenotípica variável. Enquanto um tipo específico de enzima ESBL possui maior capacidade para hidrolisar drogas como o ceftriaxone ou a cefotaxima, outro tipo pode possuir maior capacidade para hidrolisar a ceftazidima ou aztreonam. Por isso, a detecção laboratorial de cepas produtoras da enzima é desafiadora, sendo necessários múltiplos substratos de detecção específicos (BUSH et al, 1995). Dessa maneira, o perfil de sensibilidade e os substratos empregados nos testes de detecção de ESBL podem variar de região para região, de acordo com a prevalência dos diferentes tipos de ESBL.

4.1. Frequência de espécies produtoras de ESBL

No período de Fevereiro a Setembro de 2008 foram obtidas, consecutivamente da rotina laboratorial, 200 amostras bacterianas produtoras de β -lactamase de espectro ampliado, caracterizadas pela análise do padrão de sensibilidade aos antimicrobianos utilizados na rotina laboratorial e para a triagem inicial de bactérias produtoras de ESBL, foi utilizado o antibiótico ceftriaxone em placas com ágar Mueller-Hinton (Difco). A

suspeita de microrganismos produtores de ESBL foi obtida por medida dos halos de inibição do antimicrobiano ceftriaxone ($\leq 25\text{mm}$).

Das amostras estudadas, 114 foram isoladas de urina (57%), 70 de secreções diversas (35%), 15 de sangue (7,5%) e 1 de líquido (0,5%) (Tabela 4).

Neste estudo, foram analisadas 200 bactérias produtoras de ESBL avaliando qual antimicrobiano recomendado pelo CLSI 2008 é o melhor para ser utilizado na triagem destas bactérias e qual o melhor método para a detecção delas. Observou-se que as ESBL foram produzidas com maior frequência entre as cepas de *Klebsiella pneumoniae* (113 amostras, 56,5%), concordando com os dados obtidos por outros autores (ZEMELMAN et al, 2001; NOGUERIA et al, 2006), seguida por *Escherichia coli* (68, 34%), *Proteus mirabilis* (17, 8,5%) e *Klebsiella oxytoca* (2, 1%). A porcentagem está representada na Figura 6.

Tabela 4. Distribuição das amostras clínicas por sítio de isolamento.

Sítio de Isolamento	Número de microrganismos	Porcentagem (%)
Urina	114	57
Secreções	70	35
Hemoculturas	15	7,5
Líquor	1	0,5
Total	200	100

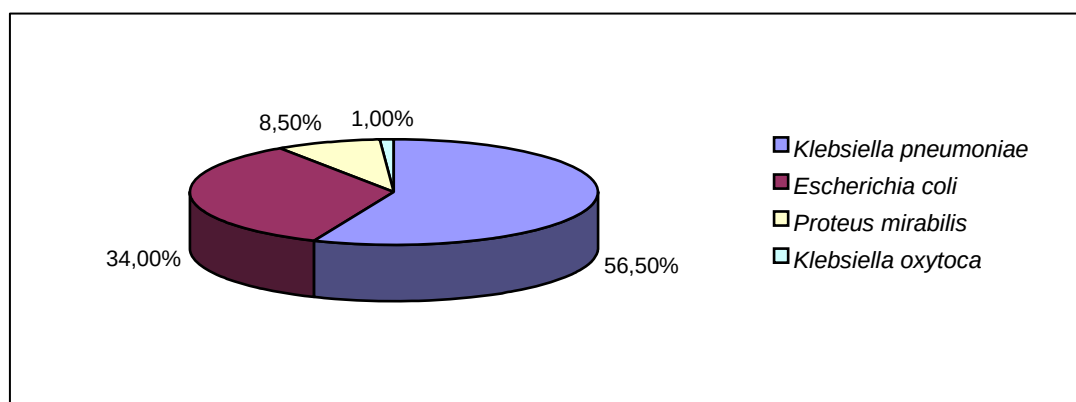


Figura 6. Porcentagem das bactérias produtoras de ESBL selecionadas para o estudo.

4.2. Avaliação dos antimicrobianos para a triagem da produção de ESBL

Testes de triagem e de confirmação são recomendados na tentativa de investigar a produção de ESBL. O CLSI 2008 recomenda a utilização das drogas cefpodoxima 10µg, ceftazidima 30µg, aztreonam 30µg, cefotaxima 30µg ou ceftriaxone 30µg em placas contendo ágar Mueller-Hinton para a triagem inicial de ESBL em *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*. Para *Proteus mirabilis* é recomendado o uso de cefpodoxima 10µg, ceftazidima 30µg ou cefotaxima 30µg em ágar Mueller-Hinton.

De acordo com Schwaber et al (2004), a identificação e a aplicabilidade dos critérios do CLSI pra a detecção de β -lactamase de espectro ampliado em outras bactérias Gram-negativas que não a *Klebsiella* spp. ou a *Escherichia coli*, que são as produtoras mais comuns de ESBL, é incerta e inconclusiva.

Dos seis antibióticos testados, os discos contendo cefpodoxima, cefotaxima e ceftriaxone apresentaram os melhores resultados em relação às outras drogas.

Das 200 amostras estudadas, 100% apresentaram resistência à ceftriaxone, o que já era esperado, cefotaxima e cefpodoxima. As mostras estudadas foram resistentes à aztreonam (182 / 91%), ceftazidima (167 / 84%) e cefepime (119 / 60%) (Figura 7).

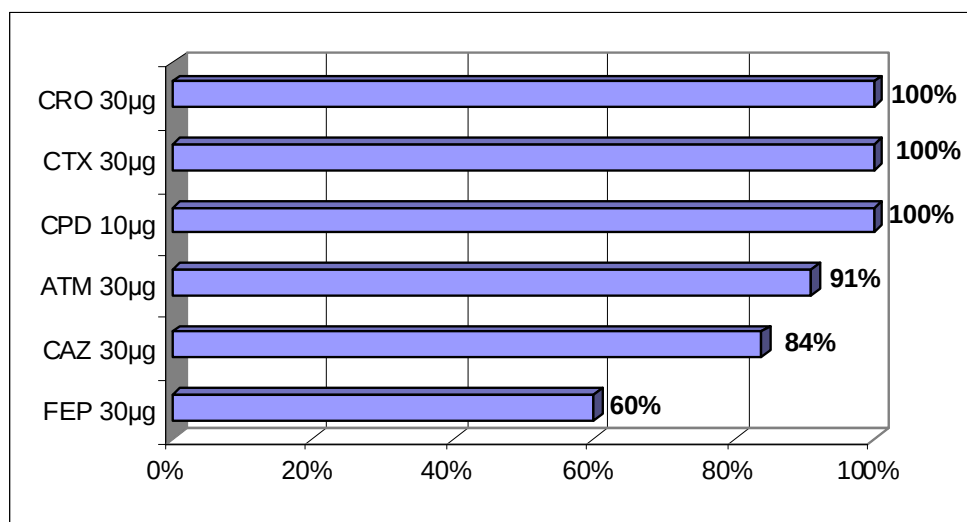


Figura 7. Porcentagem das amostras resistentes aos antibióticos testados: ceftriaxone (CRO), cefotaxima (CTX), cefpodoxima (CPD), aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ) e cefepime (FEP).

O Laboratório de Microbiologia onde foi realizado este estudo utiliza ceftriaxone para a triagem inicial de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella oxytoca*. A triagem de *Proteus mirabilis* também é realizada com o ceftriaxone, apesar desta droga não ser recomendada pelo CSLI 2008. Como consequência, neste presente estudo, o substrato ceftriaxone foi considerado como base de comparação para a triagem inicial de ESBL e a análise de *Proteus mirabilis* será realizada separadamente.

Os antimicrobianos ceftriaxone, cefpodoxima, e cefotaxima apresentaram melhores resultados para a triagem em todas as espécies bacterianas estudadas. O antibiótico aztreonam apresentou 91% das amostras resistentes ($p=0,00$), uma diferença significativa com relação às drogas que apresentaram 100% de resistência, não podendo, portanto, ser utilizada na triagem de bactérias produtoras de ESBL. Analisando as duzentas amostras, o antibiótico ceftazidima apresentou o pior resultado, dentre as recomendadas pelo CLSI 2008, com 84% ($p=0,00$) das amostras bacterianas resistentes, portanto sua utilização única não é recomendada para a triagem de ESBL.

Nogueira et al avaliaram, entre outros aspectos, a eficiência dos substratos utilizados nos testes de triagem e de confirmação para ESBL em enterobactérias. O trabalho mostrou melhor sensibilidade de triagem para os antimicrobianos ceftriaxone e cefotaxima com 99,2% cada, bons resultados foram encontrados com cefpodoxima e aztreonam com sensibilidade de 95,9% e 94,2% respectivamente, e os resultados menos satisfatórios foram obtidos com ceftazidima com 85,1% de sensibilidade. Estes dados confirmam os resultados obtidos para o antibiótico ceftazidima, porém, o antimicrobiano aztreonam apresentou melhor resultado que este presente estudo.

A cefalosporina de 4ª geração utilizada (cefepime) apresentou 60% ($p=0,00$) das amostras resistentes a ela, não podendo ser utilizada para a triagem de ESBL. Apesar de 40% das amostras serem sensíveis a cefepime, *in vitro*, este antibiótico não deve ser indicado no tratamento de infecções por bactérias produtoras de ESBL, pois *in vivo* ela pode ser resistente.

4.2.1. Avaliação dos antimicrobianos por espécie bacteriana

A Tabela 5 mostra o perfil de sensibilidade de cada espécie bacteriana estudada frente aos antimicrobianos utilizados neste estudo.

Tabela 5. Perfil de sensibilidade das amostras produtoras de ESBL, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis* e *K. oxytoca*, frente aos 6 antimicrobianos testados para a triagem de ESBL por disco difusão.

Drogas	Amostras Bacterianas			
	<i>K. pneumoniae</i> (113)	<i>E. coli</i> (68)	<i>P. mirabilis</i> (17)	<i>K. oxytoca</i> (2)
	R (nº / %)	R (nº / %)	R (nº / %)	R (nº / %)
CPD	113 (100%)	68 (100%)	17 (100%)	2 (100%)
CAZ	112 (99%)	49 (72,1%)	5 (29%)	1 (50%)
ATM	111 (98%)	65 (95,6%)	5 (29%)	1 (50%)
CTX	113 (100%)	68 (100%)	17 (100%)	2 (100%)
CRO	113 (100%)	68 (100%)	17 (100%)	2 (100%)
FEP	89 (79%)	19 (28%)	11 (65%)	0

Abreviações: CPD - cefpodoxima, CAZ - ceftazidima, ATM - aztreonam, CTX - cefotaxima, CRO - ceftriaxone, FEP - cefepime.

O CLSI recomenda a utilização de cefpodoxima ou ceftazidima ou aztreonam ou cefotaxima ou ceftriaxone para *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*. Os resultados deste estudo demonstraram que, para *Klebsiella pneumoniae*, estes cinco antimicrobianos apresentaram um bom resultado com cefpodoxima, cefotaxima e ceftriaxone com 100% das amostras resistentes, 99% ($p=0,31$) das amostras apresentaram resistência à ceftazidima e 98% ($p=0,15$) ao aztreonam. Além das drogas recomendadas, o antimicrobiano cefepime apresentou 79% ($p=0,00$) das amostras de *Klebsiella pneumoniae* resistentes (Figura 8).

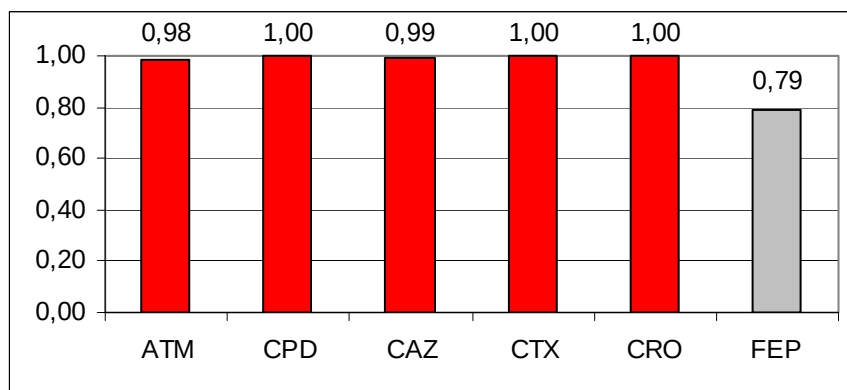


Figura 8. Porcentagem de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos antibióticos testados.

Para *Escherichia coli*, apenas quatro dos antibióticos recomendados, cefpodoxima, cefotaxima, ceftriaxone e aztreonam obtiveram um resultado significativo (Figura 9).

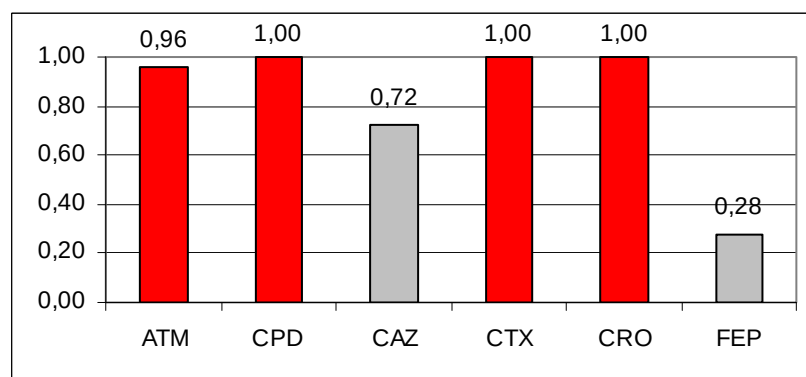


Figura 9. Porcentagem de *Escherichia coli* resistentes aos antibióticos testados.

Analizando apenas as amostras de *Escherichia coli*, cefpodoxima, cefotaxima e ceftriaxone apresentaram os melhores resultados, com 100% de amostras resistentes e aztreonam apresentou um bom resultado com 96% de resistência ($p=0,24$), uma diferença não significativa com relação às drogas que apresentaram 100% de resistência bacteriana. Dentre as drogas recomendadas pelo CLSI, ceftazidima apresentou o pior resultado com apenas 72% ($p=0,00$) das amostras de *Escherichia coli* resistentes, sendo o menos adequado para triagem de ESBL em *E.coli*, dado concordante com Nogueira et al (2006). O antibiótico cefepime apresentou 20% de resistência ($p=0,00$), uma diferença significativa demonstrando que não pode ser utilizado na triagem de ESBL. A quantidade de amostras de *Klebsiella oxytoca* foi muito baixa para se realizar uma análise estatística adequada.

Para triagem de ESBL em *Proteus mirabilis*, o CLSI recomenda a utilização de cefpodoxima ou ceftazidima ou cefotaxima. O Laboratório de Microbiologia do HC-FMB utiliza a droga ceftriaxone para triagem de *Proteus mirabilis*, apesar desta droga não ser recomendada pelo CLSI 2008. Como a quantidade desta bactéria não foi grande, a análise foi realizada separadamente. No presente estudo, apenas a cefpodoxima e cefotaxima apresentaram um resultado significativo para a triagem, junto com ceftriaxone. O antibiótico ceftazidima apresentou apenas 29% de resistência dentre as amostras de *Proteus mirabilis* testadas (Figura 10).

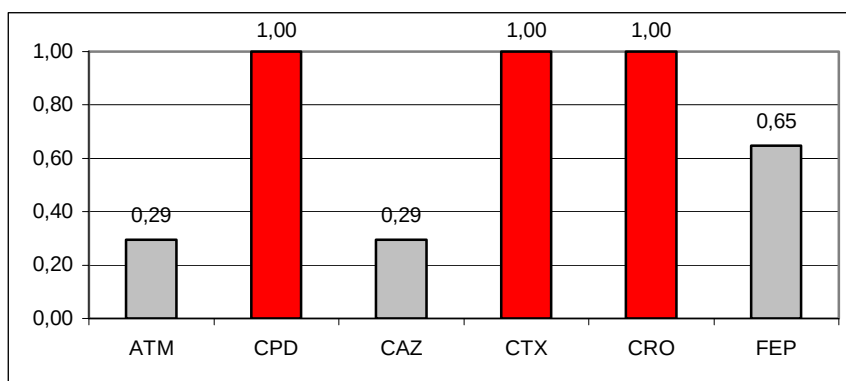


Figura 10. Porcentagem de *Proteus mirabilis* resistentes aos antibióticos testados.

Os resultados obtidos para *Proteus mirabilis* foram que, das três drogas recomendadas, cefpodoxima e cefotaxima apresentaram 100% das amostras resistentes e ceftazidima apresentou apenas 29% de resistência ($p=0,00$), uma diferença significativa com relação às outras drogas, por isso este antibiótico não é o mais indicado para a triagem de ESBL em *Proteus mirabilis* na rotina laboratorial. A droga ceftriaxone também apresentou 100% das amostras resistentes, já esperado, 65% ($p=0,00$) das amostras de *Proteus mirabilis* foram resistentes ao cefepime e 29% ($p=0,00$) foram resistentes ao aztreonam.

A partir dos resultados obtidos para *Proteus mirabilis*, observa-se que o antimicrobiano ceftriaxone, mesmo não sendo recomendado pelo CLSI para a triagem de *Proteus mirabilis*, apresentou resultado melhor que a ceftazidima.

Analisando todas as amostras selecionadas, excluindo-se *Proteus mirabilis*, observa-se que dentre as 183 amostras (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella oxytoca*), 100% delas foram resistentes aos antibióticos cefpodoxima, cefotaxima e ceftriaxone. O valor de amostras resistentes ao aztreonam subiu de 91% ($p=0,00$) para 97% ($p=0,24$), portanto, este antibiótico passou a ter uma diferença não significativa com relação às drogas com 100% de resistência. Já ceftazidima aumentou de 84% ($p=0,00$) para 89% ($p=0,019$) das amostras resistentes a ela. Uma porcentagem um pouco melhor, porém a diferença continua sendo significativa. O antimicrobiano cefepime manteve uma taxa semelhante de resistência (Figura 11).

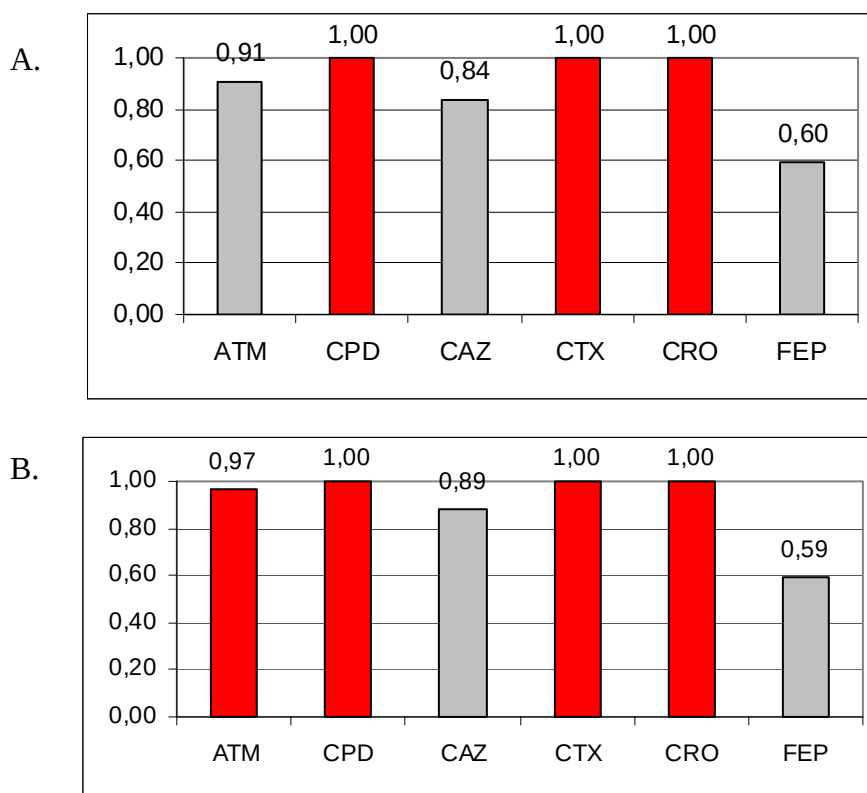


Figura 11. Comparação da resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados no estudo em amostras contendo ou não a bactéria *Proteus mirabilis*. A. Todas as espécies bacterianas estudadas. B. Apenas *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*.

De acordo com o CLSI 2008 e Rossi & Andreazzi (2005) as cepas de *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli* que produzem β -lactamase de espectro ampliado podem ser clinicamente resistentes à antibioticoterapia com penicilinas, cefalosporinas ou aztreonam, apesar da aparente sensibilidade in vitro para quaisquer destes agentes. Após a triagem inicial e o teste confirmatório, o laboratório clínico deve liberar o resultado de cepas produtoras de ESBL como resistentes para estes antibióticos.

Os resultados aqui obtidos são de extrema importância, uma vez que uma triagem bem realizada e uma rápida detecção de amostras produtoras de ESBL na rotina laboratorial permitem uma melhor escolha terapêutica e dificulta a disseminação deste tipo de resistência.

4.3. Detecção da produção de ESBL

A confirmação fenotípica da produção de ESBL foi realizada com três testes confirmatórios disponíveis no mercado: (1) teste de disco aproximação utilizando amoxicilina + ácido clavulânico, ceftazidima e cefotaxima (Oxoid); (2) fitas de Etest[®] para ESBL (AB Biodisk) contendo ceftazidima em uma extremidade e ceftazidima associada ao ácido clavulânico na outra; (3) sistema automatizado Vitek[®] (BioMérieux) utilizando cartões contendo uma série de antibióticos incluindo ceftazidima, ceftazidima + ácido clavulânico, cefotaxima e cefotaxima + ácido clavulânico específicos para a detecção de ESBL.

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 β -lactâmicos (PEREIRA et al, 2003).

Neste estudo foram consideradas produtoras de ESBL as amostras que apresentaram teste de triagem positivo para ceftriaxone e que também foram positivas no teste de disco aproximação associado, e posteriormente comparado, ao Etest[®] para ESBL e/ou Vitek[®] positivo. Com isso, o teste de disco aproximação, apesar de não ser adequado, foi considerado como base de comparação neste estudo.

4.3.1. Teste de disco aproximação

Todas as 200 amostras bacterianas selecionadas para o estudo apresentaram uma área de sinergismo entre os discos de antibióticos utilizados: amoxicilina com ácido clavulânico, ceftazidima e cefotaxima. Neste estudo esta metodologia foi considerada como base de comparação, visto que é a metodologia utilizada pelo laboratório.

4.3.2. Etest® para ESBL Ceftazidima/ Ceftazidima + Ácido clavulânico

Das 200 amostras bacterianas, 191 (95,5%) apresentaram resultado positivo para produção de ESBL utilizando esta fita de Etest®, 6 (3%) apresentaram resultado não determinado e 1,5% (3 amostras) apresentaram resultado negativo (Anexo A). Dentre as espécies bacterianas estudadas, 108 (54%) amostras de *Klebsiella pneumoniae*, 64 (32%) amostras de *Escherichia coli*, 17 (8,5%) amostras de *Proteus mirabilis* e 2 (1%) amostras de *Klebsiella oxytoca* apresentaram resultado positivo.

Não foi possível determinar a concentração inibitória mínima (MIC) de todas as amostras devido a formação de uma zona fantasma (área de sinergismo) na extremidade da fita que continha o antibiótico ceftazidima isolado. Esta formação, segundo instruções do fabricante (AB Biodisk), é um indicativo claro da produção de ESBL (Figura 12).

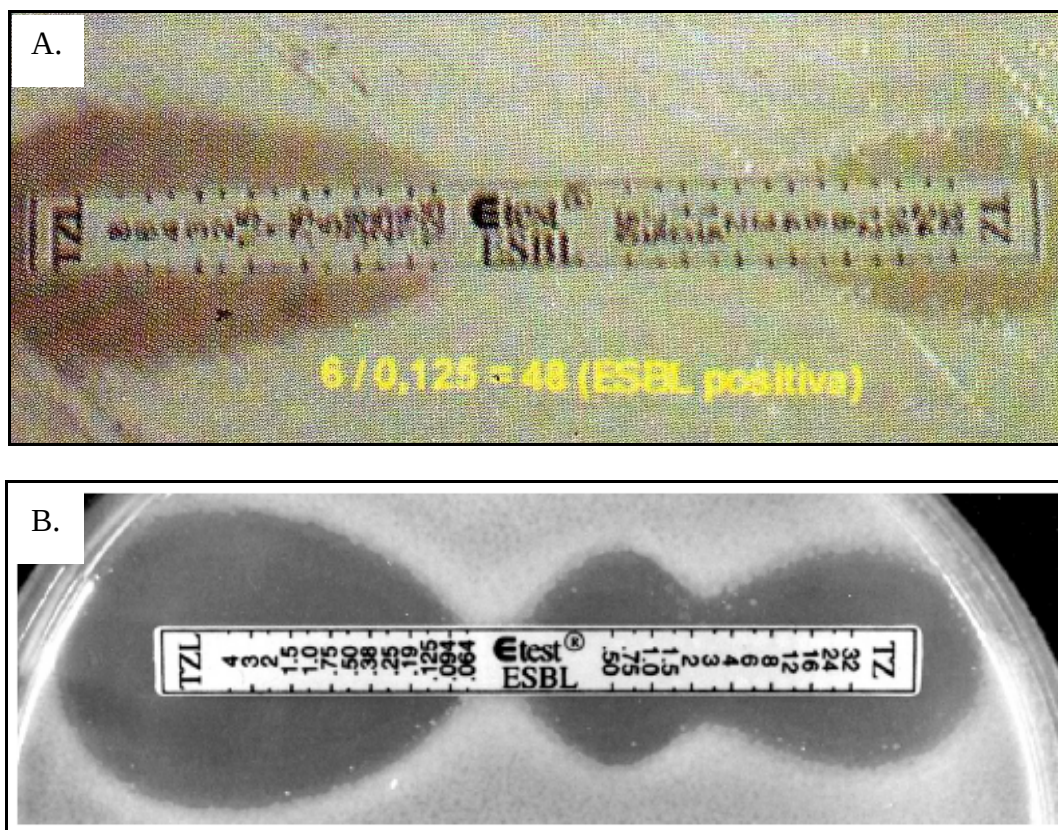


Figura 12. Etest, fita contendo ceftazidima (TZ) em uma extremidade e ceftazidima associada ao ácido clavulânico (TZL) na outra. A. Positivo (Fonte: ROSSI & ANDREAZZI, 2005), B. Formação do sinergismo (Fonte: bula do Etest® ESBL).

A Tabela 6 mostra uma análise de cada espécie bacteriana separadamente frente ao método de detecção de ESBL Etest®. Das 113 *Klebsiella pneumoniae*, 108 (95,5%) apresentaram resultado positivo; dentre as 68 *Escherichia coli*, 64 (94%) apresentaram resultado positivo; e nas 17 (100%) amostras de *Proteus mirabilis* e nas 2 (100%) amostras de *Klebsiella oxytoca* foram detectadas a produção de ESBL (Figura 13).

Tabela 6. Resultado da detecção da produção da enzima β -lactamase de espectro ampliado pela metodologia do Etest[®] para ESBL nas diferentes espécies bacterianas estudadas.

Espécie Bacteriana	Detecção de ESBL – Etest		
	Positivo	Não Determinado	Negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (113)	108 (95,5%)	5 (4,5%)	0
<i>Escherichia coli</i> (68)	64 (94%)	1 (1,5%)	3 (4,5%)
<i>Proteus mirabilis</i> (17)	17 (100%)	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i> (2)	2 (100%)	0	0

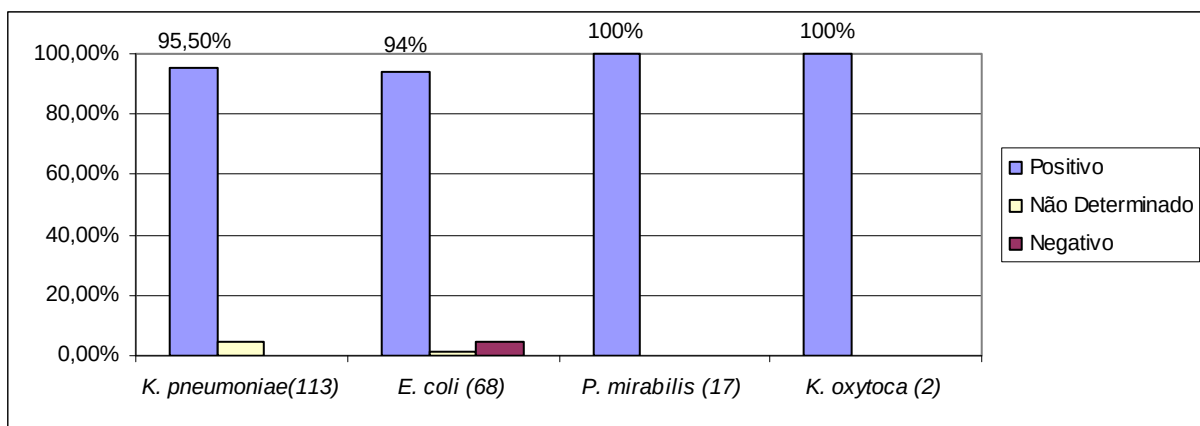


Figura 13. Porcentagens de amostras ESBL positivas e negativas de acordo com a espécie bacteriana detectada pelo método Etest[®] para ESBL.

Esta metodologia apresentou um resultado significativo, detectando 191 amostras (95,5%) produtoras de ESBL, um resultado significativo ($p=0,24$).

Este valor obtido foi semelhante ao estudo realizado por Pereira et al em São Paulo no ano de 2003, que apresentou 96% de sensibilidade utilizando duas tiras contendo ceftazidima e cefotaxima, sendo que a fita com o substrato ceftazidima apresentou 90% de sensibilidade. A porcentagem de amostras detectadas foi maior do que o trabalho de

Vercauteren et al (1997) que também utilizaram a fita de Etest[®] ceftazidima/ceftazidima + ácido clavulânico e detectou 81,2% das amostras produtoras de ESBL.

4.3.3. Método automatizado Vitek[®]

Pelo método automatizado Vitek[®] - BioMérieux das 200 amostras testadas, 157 (78,5%) apresentaram resultado positivo, sendo 76 (38%) *Klebsiella pneumoniae*, 65 (32,5%) *Escherichia coli*, 15 (7,5%) *Proteus mirabilis* e 1 (0,5%) *Klebsiella oxytoca*.

Esta metodologia possui uma limitação, com isso, dentre as amostras negativas para ESBL, a presença de outras β -lactamases como adenosina monofosfato cíclico (AMPc) ou TEM resistente ao inibidor (IRT) pode mascarar a produção de ESBL (manual do aparelho Vitek[®] - BioMérieux).

A partir da Tabela 7 pode-se analisar cada espécie bacteriana separadamente frente ao método de detecção de ESBL Vitek[®]. Apresentaram resultado positivo 76 (67,3%) das 113 amostras de *Klebsiella pneumoniae*, 65 (95,6%) das 68 *Escherichia coli*, 15 (88,2%) das 17 amostras de *Proteus mirabilis* e 1 amostra de *Klebsiella oxytoca* (Figura 14).

Tabela 7. Resultado da detecção da produção da enzima β -lactamase de espectro ampliado pela metodologia do sistema automatizado Vitek[®] nas diferentes espécies bacterianas.

Espécie Bacteriana	Detecção de ESBL – Vitek	
	Positivo	Negativo
<i>K. pneumoniae</i> (113)	76 (67,3%)	37 (32,7%)
<i>E. coli</i> (68)	65 (95,6%)	3 (4,4%)
<i>P. mirabilis</i> (17)	15 (88,2%)	2 (11,8%)
<i>K. oxytoca</i> (2)	1 (50%)	1 (50%)

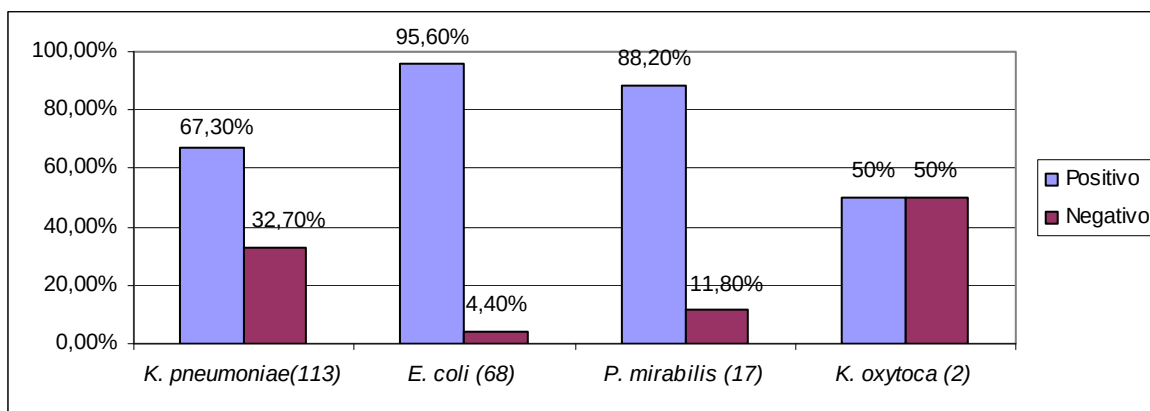


Figura 14. Porcentagens de amostras ESBL positivas e negativas de acordo com a espécie bacteriana detectada pelo método automatizado do sistema Vitek®.

Neste estudo, o sistema Vitek® (BioMérieux) apresentou um resultado satisfatório na detecção de ESBL, com 78,5% ($p=0,00$) das amostras apresentando resultado positivo. Analisando cada espécie bacteriana separadamente, o Vitek® apresentou melhor resultado para *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* com 95,6% ($p=0,24$) e 88,2% ($p=0,48$), respectivamente, na detecção de ESBL.

A principal divergência ocorreu entre as amostras de *Klebsiella pneumoniae*, de 113 amostras apenas 76 apresentaram resultado positivo por este teste ($p=0,00$). De acordo com o estudo em 1996 de Sanders et al, o sistema Vitek® apresentou uma sensibilidade de 99,5% na detecção de amostras produtoras da enzima β -lactamase de espectro ampliado, já no trabalho de Wiegand et al (2007), que trabalhou com o Vitek® 2, este sistema detectou a produção de ESBL em 84,5% das amostras tipicamente produtoras desta enzima. Esta baixa porcentagem de detecção de ESBL talvez possa ser explicada pela produção de outro tipo de enzima que o sistema não consegue detectar ou ainda por diferenças regionais ou temporais.

4.4. Comparação dos métodos Etest[®] e Vitek[®]

O Etest[®] para ESBL (AB Biodisk) apresentou uma eficácia maior na detecção da enzima β -lactamase de espectro ampliado (96%), enquanto que o sistema Vitek[®] (BioMérieux) apresentou 78,5% de eficácia (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação entre os métodos de confirmação de produção de ESBL utilizados.

Produção de ESBL	Metodologia para detecção de ESBL	
	Etest [®] para ESBL	Vitek [®]
Produtoras de ESBL	192 (95,5%)	157 (78,5%)
Não determinado	5 (3%)	-
Não produtoras de ESBL	3 (1,5%)	43 (21,5%)
Total	200 (100%)	200 (100%)

Para as espécies bacterianas, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* o método de detecção de ESBL Etest[®] apresentou melhores resultados principalmente para *Klebsiella pneumoniae*. Na detecção de ESBL em *Escherichia coli*, o sistema Vitek[®] apresentou uma porcentagem maior, porém, não significativa. Já para *Proteus mirabilis* os métodos apresentaram taxa de detecção equivalente (Figura 15).

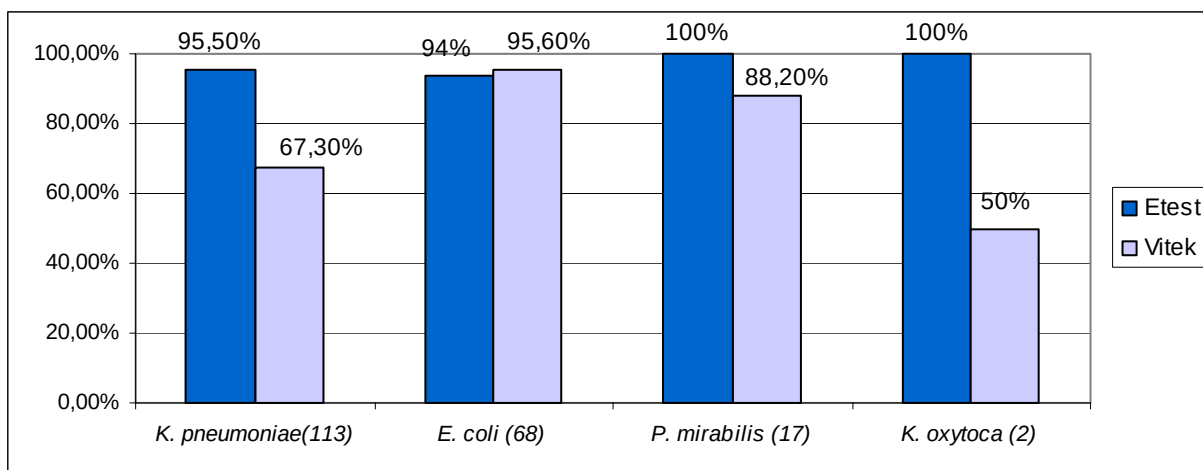


Figura 15. Comparação entre os métodos de detecção de ESBL Etest® e Vitek®, de acordo com cada espécie bacteriana.

Dentre os métodos estudados, o teste de disco aproximação é de execução e leitura fácil, o Etest® é o melhor método para a detecção de ESBL quando comparado ao Vitek®. O Vitek® apresentou o pior resultado para a detecção fenotípica de ESBL quando comparado aos métodos estudados, talvez pelo fato das bactérias produzirem algum outro tipo de enzima que interfira na detecção de ESBL.

Dando continuidade a esta pesquisa outros estudos envolvendo outras técnicas, como resistência aos antimicrobianos e métodos moleculares forneceriam subsídios valiosos para a confirmação da presença do gene das enzimas ESBL.

Conclusões

6. Conclusões

1. Dentre os antimicrobianos recomendados pelo CLSI 2008, cefpodoxima, ceftriaxone e cefotaxima podem ser utilizados na rotina laboratorial para a triagem de ESBL.
2. O antibiótico ceftazidima, a partir dos resultados obtidos, não seria o mais indicado para a triagem inicial de ESBL em *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*.
3. O antimicrobiano aztreonam apresentou bons resultados na triagem de bactérias produtoras de ESBL em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*.
4. Ficou comprovado a ineficiência do antibiótico cefepime para a triagem de ESBL em todas as espécies bacterianas.
5. Para *Klebsiella pneumoniae* todos os antibióticos para a triagem de ESBL recomendados pelo CLSI apresentaram ótimos resultados. Para *Escherichia coli*, apenas cefpodoxima, ceftriaxone, cefotaxima e aztreonam apresentaram bons resultados.
6. Para a triagem de *Proteus mirabilis* os melhores antimicrobianos foram cefotaxima e cefpodoxima. O antibiótico ceftriaxone, apesar de não ser recomendado pelo CLSI apresentou bons resultados podendo ser utilizado na triagem de ESBL nesta espécie bacteriana ou ser mais profundamente testado.
7. Dentre os testes de confirmação da produção de ESBL utilizados, o teste de disco aproximação e Etest[®] para ESBL apresentaram os melhores resultados.
8. Das 200 amostras bacterianas produtoras de ESBL, a principal espécie isolada foi *Klebsiella pneumoniae*, seguida por *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella oxytoca*.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

AMBLER, R.P. “The structure of β -lactamases”. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London (Biological Sciences)*, v.289, p. 321-331,1980.

ANTUNEZ, C., BLANCA-LOPEZ, N., TORRES, M.J., MAYORGA, C., PEREZ-INESTROSA, E., MONTAÑES, M.I., FERNANDEZ, T., BLANCA, M. “Immediate allergic reactions to cephalosporins: evaluation of cross-reactivity with a panel of penicillins and cephalosporins”. *Journal Allergy Clin. Immunol.*, v.117, p. 404-410, 2006.

BABIC, M., HUJER, A.M., BONOMO, R.A. “What’s new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases”. *Drug Resistance Update*, v.9, p. 142-156, 2006.

BAUER, A.W., KIRBY, W.M., SHERRIS, J.C., TURCK, M. “Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method”. *American Journal of Clinical Pathology*, v.45. p. 493-496, 1966.

BRADFORD, P.A. “Extended-spectrum β -lactamases in 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat”. *Clinical Microbiology Reviews*, v.14, n.04, 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”. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v.39, n.06, p. 1211-1233, 1995.

BUSH, K. “New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy”. *Clinical Infectious Diseases*, v.32, p. 1085-1089, 2001.

Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Eighteenth Informational Supplement (M100-S18), v.28, n.01.

FARMER III, J.J. "Enterobacteriaceae: introduction and identification". In: MURRAY, F.C., YOLKEN, R.H. "Manual of Clinical Microbiology". 7th ed., Washington American Society for Microbiology, v.117, p. 442-458, 1999.

GURGEL, J.T.A., AZEVEDO, J.L. "Resistência de microrganismos aos antibióticos". In: LACAZ, C.S. "Antibióticos". 3ª edição, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 234-253, 1975.

HANSON, N.D., THOMSON, K.S., MOLAND, E.S., SANDERS, C.C., BERTHOLD, G., PENN, R.G. "Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.44, p. 377-380, 1999.

JACOBY, G.A., ARCHER, G.L. "New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents". *New England J Med*, v.324, p. 601-612, 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.

Lahey Studies Clinic (on line). EUA, Novembro de 2008. Disponibilidade e acesso: internet <http://www.lahey.org/Studies/>.

LIVERMORE, D.M. "Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics". *Scand J Infect Dis.*, v.78, p. 7-16, 1991.

LIVERMORE, D.M. " β -lactamases in laboratory and clinical resistance". *Clinical Microbiology Reviews*, v.8, p. 557-584, 1995.

LIVERMORE, D.M., WILLIAMS, J.D. " β -lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance". In: "Antibiotics in Laboratory Medicine". 4th ed., p.502-578, 1996.

LIVERMORE, D.M., BROWN, D.J. "Detection of β -lactamase-mediated resistance". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.48, supl. S1, p. 59-64, 2001.

NIKAIDO, H. "Prevention of drugs access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux". *Science*, v.264, p. 382-388, 1994.

NOGUEIRA, K.S., HIGUTI, I.H., NASCIMENTO, A.J., TERASAWA, L.B., OLIVEIRA, S., MATOS, A.P., SOUZA, H.A.P.H.M., COGO, L.L., COSTA, L.M.D. "Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase in Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil". *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.10, p. 390-395, 2006.

PATERSON, D.L., BONOMO, R.A. "Extended-spectrum β -lactamases: clinical update". *Clinical Microbiology Reviews*, v.18, p. 657-686, 2005.

PEREIRA, A.S., CAMARGO FILHO, J.R., TOGNIM, M.C.B., SADER, H.S. "Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido". *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n.4, p. 301-308, 2003.

PODSCHUN, R., ULLMANN, U. "*Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors". *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, n.04, p.589-603, 1998.

QUINTILIANI, J.R., SAHM, D.F., COURVALIN, P. "Mechanisms of resistance to antimicrobial agents". In: MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A., TENOVER, F.C., YOLKEN, R.H. "Manual of Clinical Microbiology". 7th ed., Washington American Society for Microbiology, p. 1505-1525, 1999.

RICE, L. "Evolution and clinical importance of extended-spectrum β -lactamases". *Chest*, v.119, p. 391S-396S, 2001.

RICE, L.B., BONOMO, R.A. "Mechanisms of resistance to antibacterial agents". In: MURRAY, P.R., BARON, E.J., JORGENSEN, J.H., LANDRY, M.L., PFALLER, M.A. "Manual of Clinical Microbiology". 9th ed., Washington American Society for Microbiology, v.1, p. 1114-1129, 2007 .

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

ROSSI, F., ANDREAZZI, D.B. "Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma". Editora Atheneu, 2005.

SADER, H.S., SAMPAIO, J.L.M., ZACCOLI, C., JONES, R.N. "Results of the 1997 SENTRY antimicrobial surveillance program in three Brazilian medical centers". *Braz. J. Infect. Dis.*, v.3, p. 63-79, 1999.

SADER, H.S. "Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies". *Braz. J. Infect. Dis.*, v.4, p. 91-99, 2000.

SANDERS, C.C., SANDERS, W.E.Jr. " β -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact". *Clinical Infectious Diseases*, v.15, p. 824-839, 1992.

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". *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, p. 2997-3001, 1996.

SCHWABER, M.J., RANEY, P.M., RASHEED, J.K., BIDDLE, J.W., WILLIAMS, P., MCGOWAN JR., J.E., TENOVER, F.C. "Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum β -lactamases in non-*Escherichia coli* and non-*Klebsiella* spp. of Enterobacteriaceae". *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 294-298, 2004.

SYKES, R.B., MATTHEW, M. "The β -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics". *J. Antimicrobial Chemoter*, v.2, p. 115-157, 1976.

TAVARES, W. "Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos". Editora Atheneu, 3ª edição, São Paulo, p. 03-17, 2001.

THOMSON, K.S., PREVAN, A.M., SANDERS, C.C. "Novel plasmid mediated β -lactamase in Enterobacteriaceae: emerging problems for new betalactam antibiotic". *Current Clin. Infect. Dis.*, v.16, p. 151-163, 1996.

TOLEDO, M.R.F., FONTES, C.F., TRABULSI, L.R. "Revista de Microbiologia". Sociedade Brasileira de Microbiologia, v.13, n.3 e 4, p. 230-235 e p. 309-315, 1982.

VERCAUTEREN, E., DESCHEEMAER, P., IEVEN, M., SANDERS, C.C., GOOSSENS, H. "Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum β -lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital". *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, n.9, p. 2191-2197, 1997.

WIEGAND, I., GEISS, H.K., MACK, D., STÜRENBURG, E., SEIFERT, H. "Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures". *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, n.4, p. 1167-1174, 2007.

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”. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.40, p. 41-43, 2001.

Anexo

8. Anexo

Anexo A. Resultado da metodologia do Etest[®] para a detecção da produção de ESBL.

Amostra	MIC CAZ ¹	MIC CAZL ²	CAZ/CAZL ³	Sinergismo	ESBL Etest
ESBL - 3	16	0,125	128	-	POS
ESBL - 4	32	3	10	-	POS
ESBL - 6	32	1	32	-	POS
ESBL - 7	4	0,25	16	-	POS
ESBL - 8	32	1	32	-	POS
ESBL - 11	32	4	8 (ND) ⁴	-	POS
ESBL - 12	32	0,25	128	-	POS
ESBL - 13	4	0,38	10	-	POS
ESBL - 14	1	0,064	15	-	POS
ESBL - 15	32	2	16	-	POS
ESBL - 16	12	0,25	48	-	POS
ESBL - 19	32	0,5	64	-	POS
ESBL - 20	0,5	0,064	7,8	+	POS
ESBL - 23	0,5	0,125	4	+	POS
ESBL - 24	8	0,75	10	-	POS
ESBL - 25	8	0,5	16	-	POS
ESBL - 26	1	0,125	8	-	POS
ESBL - 27	3	0,25	12	-	POS
ESBL - 28	0,75	0,94	0,79	+	POS
ESBL - 29	4	0,38	10,5	-	POS
ESBL - 30	32	2	16	-	POS
ESBL - 33	8	0,38	21	-	POS
ESBL - 34	0,75	0,38	1,97	-	NEG
ESBL - 35	32	0,5	64	-	POS
ESBL - 36	0,5	0,125	4	+	POS
ESBL - 37	32	0,5	64	-	POS
ESBL - 38	2	0,125	16	-	POS
ESBL - 39	0,5	0,125	4	+	POS
ESBL - 40	6	0,094	63,8	-	POS
ESBL - 41	0,5	0,125	4	+	POS
ESBL - 42	0,78	0,064	11,7	-	POS
ESBL - 43	0,75	0,25	3	-	NEG
ESBL - 44	32	0,38	84	-	POS

Continua

Amostra	MIC CAZ ¹	MIC CAZL ²	CAZ/CAZL ³	Sinergismo	ESBL Etest
ESBL - 45	32	1	32	-	POS
ESBL - 48	32	0,25	128	-	POS
ESBL - 49	0,5	0,064	7,8	+	POS
ESBL - 50	32	4	8 (ND)	-	POS
ESBL - 51	0,5	0,064	7,8	+	POS
ESBL - 53	32	0,125	256	-	POS
ESBL - 54	0,75	0,064	11,7	-	POS
ESBL - 55	32	0,38	84	-	POS
ESBL - 56	32	0,5	64	-	POS
ESBL - 57	32	4	8 (ND)	-	POS
ESBL - 58	32	0,5	64	-	POS
ESBL - 60	32	4	8 (ND)	-	POS
ESBL - 61	3	0,19	15,7	-	POS
ESBL - 62	32	0,5	64	-	POS
ESBL - 64	32	0,75	42	-	POS
ESBL - 66	32	0,5	64	-	POS
ESBL - 67	0,5	0,19	2,63	+	POS
ESBL - 68	32	0,94	34	-	POS
ESBL - 69	2	0,19	10,5	-	POS
ESBL - 71	32	0,064	500	-	POS
ESBL - 73	16	0,25	64	-	POS
ESBL - 74	32	1	32	-	POS
ESBL - 75	16	0,5	32	-	POS
ESBL - 78	32	1	32	-	POS
ESBL - 79	16	0,5	32	-	POS
ESBL - 80	32	0,19	168	-	POS
ESBL - 83	3	0,75	4	-	NEG
ESBL - 86	0,5	0,094	5,3	+	POS
ESBL - 87	0,5	0,094	5,3	+	POS
ESBL - 88	32	0,75	42,6	-	POS
ESBL - 89	32	0,38	84,2	-	POS
ESBL - 90	0,5	0,064	7,8	+	POS
ESBL - 92	32	0,38	84,2	-	POS
ESBL - 95	16	0,5	32	-	POS
ESBL - 97	24	0,75	32	-	POS
ESBL - 98	32	1	32	-	POS

Continua

Amostra	MIC CAZ ¹	MIC CAZL ²	CAZ/CAZL ³	Sinergismo	ESBL Etest
ESBL - 99	12	0,38	31,57	-	POS
ESBL - 100	32	0,75	42,6	-	POS
ESBL - 101	3	0,19	15,78	+	POS
ESBL - 103	32	0,38	84,21	+	POS
ESBL - 104	6	0,75	8	-	POS
ESBL - 105	3	0,25	12	-	POS
ESBL - 108	12	0,38	31,57	-	POS
ESBL - 111	32	4	8 (ND)	-	POS
ESBL - 112	32	0,38	84,2	-	POS
ESBL - 113	12	0,75	16	-	POS
ESBL - 114	32	0,25	128	-	POS
ESBL - 117	2	0,25	8	-	POS
ESBL - 118	32	0,75	42,6	-	POS
ESBL - 119	32	0,5	64	-	POS
ESBL - 120	32	0,75	42,6	-	POS
ESBL - 121	32	0,38	84,2	-	POS
ESBL - 122	32	0,25	128	-	POS
ESBL - 123	12	0,19	63,16	-	POS
ESBL - 124	24	0,5	48	-	POS
ESBL - 125	12	0,5	24	-	POS
ESBL - 126	6	0,094	10,63	-	POS
ESBL - 127	16	0,5	32	-	POS
ESBL - 128	16	0,5	32	-	POS
ESBL - 130	32	0,25	128	-	POS
ESBL - 131	24	0,5	48	-	POS
ESBL - 132	32	0,75	42,6	-	POS
ESBL - 134	8	0,38	21	-	POS
ESBL - 135	8	0,25	32	-	POS
ESBL - 136	0,5	0,19	2,63	+	POS
ESBL - 137	0,5	0,125	4	+	POS
ESBL - 139	0,5	0,25	2	+	POS
ESBL - 140	0,5	0,094	5,32	+	POS
ESBL - 141	24	0,38	63,1	-	POS
ESBL - 143	12	0,38	31,58	-	POS
ESBL - 144	4	0,19	21,05	-	POS
ESBL - 145	3	0,19	15,79	-	POS

Continua

Amostra	MIC CAZ ¹	MIC CAZL ²	CAZ/CAZL ³	Sinergismo	ESBL Etest
ESBL - 146	4	0,25	16	-	POS
ESBL - 147	0,5	0,125	4	+	POS
ESBL - 148	32	0,38	84,2	-	POS
ESBL - 149	32	0,19	168	-	POS
ESBL - 150	32	0,75	42,6	-	POS
ESBL - 151	2	0,25	8	-	POS
ESBL - 152	8	0,5	16	-	POS
ESBL - 153	32	0,25	128	-	POS
ESBL - 154	24	0,5	48	-	POS
ESBL - 156	32	0,75	42,6	-	POS
ESBL - 157	0,5	0,094	5,3	+	POS
ESBL - 158	12	0,5	24	-	POS
ESBL - 159	0,5	0,094	5,3	+	POS
ESBL - 160	0,5	0,094	5,3	+	POS
ESBL - 161	16	0,38	42,1	-	POS
ESBL - 162	2	0,19	10,5	-	POS
ESBL - 163	0,5	0,25	2	+	POS
ESBL - 164	0,5	0,094	5,3	+	POS
ESBL - 165	2	0,25	8	+	POS
ESBL - 166	3	0,38	7,89	+	POS
ESBL - 167	32	1,5	21,33	-	POS
ESBL - 168	24	0,5	48	-	POS
ESBL - 169	0,5	0,094	5,3	+	POS
ESBL - 170	32	0,75	42,6	-	POS
ESBL - 171	32	0,38	84,2	-	POS
ESBL - 172	0,5	0,094	5,3	+	POS
ESBL - 173	32	0,75	42,6	-	POS
ESBL - 174	3	0,19	15,78	-	POS
ESBL - 175	32	0,125	256	-	POS
ESBL - 176	32	0,125	256	-	POS
ESBL - 177	32	0,064	500	-	POS
ESBL - 178	2	0,125	16	-	POS
ESBL - 179	32	0,5	64	-	POS
ESBL - 180	8	0,38	21	-	POS
ESBL - 181	0,5	0,064	7,8	-	POS
ESBL - 182	0,5	0,064	7,8	-	POS

Continua

Amostra	MIC CAZ ¹	MIC CAZL ²	CAZ/CAZL ³	Sinergismo	ESBL Etest
ESBL - 183	12	0,5	24	-	POS
ESBL - 184	32	1	32	-	POS
ESBL - 185	32	0,125	256	-	POS
ESBL - 186	32	0,38	84,2	-	POS
ESBL - 187	32	0,38	84,2	-	POS
ESBL - 188	1,5	0,094	15,9	-	POS
ESBL - 189	32	2	16	-	POS
ESBL - 191	4	0,19	21	-	POS
ESBL - 192	12	0,38	31	-	POS
ESBL - 193	0,5	0,064	7,8	+	POS
ESBL - 194	0,5	0,19	2,6	+	POS
ESBL - 195	12	1,5	8	-	POS
ESBL - 196	8	0,25	32	-	POS
ESBL - 198	32	0,5	64	-	POS
ESBL - 200	32	0,5	64	-	POS
ESBL - 201	3	0,25	12	-	POS
ESBL - 202	32	0,5	64	-	POS
ESBL - 203	12	0,5	24	-	POS
ESBL - 204	8	0,38	21	-	POS
ESBL - 205	2	0,19	10	-	POS
ESBL - 206	4	0,25	16	-	POS
ESBL - 207	32	0,25	128	-	POS
ESBL - 208	32	1,5	21,3	-	POS
ESBL - 209	2	0,25	8	-	POS
ESBL - 210	8	0,25	32	-	POS
ESBL - 211	0,5	0,25	2	+	POS
ESBL - 212	32	2	16	-	POS
ESBL - 213	0,5	0,064	7,8	+	POS
ESBL - 214	32	1	32	-	POS
ESBL - 215	0,5	0,19	2,6	+	POS
ESBL - 216	32	2	16	-	POS
ESBL - 217	4	0,5	8	+	POS
ESBL - 218	0,5	0,064	7,8	+	POS
ESBL - 219	12	0,25	48	-	POS
ESBL - 220	32	0,19	168	-	POS
ESBL - 221	32	1,5	21,3	-	POS

Continua

Amostra	MIC CAZ ¹	MIC CAZL ²	CAZ/CAZL ³	Sinergismo	ESBL Etest
ESBL - 222	0,5	0,19	2,63	+	POS
ESBL - 223	32	1	32	-	POS
ESBL - 224	32	0,25	128	-	POS
ESBL - 225	32	4	8 (ND)	-	POS
ESBL - 226	32	1	32	-	POS
ESBL - 227	1	0,25	4	+	POS
ESBL - 228	32	0,5	64	-	POS
ESBL - 229	0,5	0,25	4	+	POS
ESBL - 230	32	0,75	42,6	-	POS
ESBL - 231	32	1	32	-	POS
ESBL - 232	4	0,5	8	-	POS
ESBL - 233	0,5	0,064	7,8	+	POS
ESBL - 234	4	0,38	10,53	-	POS
ESBL - 235	12	0,5	24	-	POS
ESBL - 236	8	0,5	16	-	POS
ESBL - 237	32	2	16	-	POS
ESBL - 238	32	1	32	-	POS
ESBL - 239	3	0,25	12	-	POS
ESBL - 240	32	0,38	84	-	POS
ESBL - 241	0,5	0,064	7,8	+	POS
ESBL - 242	32	0,38	84	-	POS
ESBL - 243	2	0,19	10	+	POS
ESBL - 244	0,5	0,064	7,8	+	POS

1. MIC CAZ: concentração inibitória mínima de ceftazidima.
2. MIC CAZL: concentração inibitória mínima de ceftazidima associada ao ácido clavulânico.
3. CAZ/CAZL: razão entre o MIC CAZ e MIC CAZL.
4. ND: valor não determinado.