Jorge Luiz Mello Sampaio

**Caracterização de betalactamases de espectro ampliado e KPC em
Enterobacter cloacae e *Enterobacter aerogenes* isoladas de casos de
infecções relacionadas aos cuidados com a saúde em pacientes atendidos em
hospitais da cidade de São Paulo**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências**

**Programa de Doenças Infecciosas
e Parasitárias**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Nicodemo

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sampaio, Jorge Luiz Mello

Caracterização de betalactamases de espectro ampliado e KPC em *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes* isoladas de casos de infecções relacionadas aos cuidados com a saúde em pacientes atendidos em hospitais da cidade de São Paulo / Jorge Luiz Mello Sampaio.-- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Antonio Carlos Nicodemo.

Descritores: 1.*Enterobacter cloacae* 2.*Enterobacter aerogenes* 3.Beta-lactamases
4.Farmacorresistência bacteriana 5.KPC 6.ESBL

USP/FM/DBD-179/11

AGRADECIMENTO

Agradeço ao Grupo Fleury pela disponibilização do banco de microrganismos, pelo fornecimento de todos os reagentes utilizados, assim como pela disponibilização de área física e equipamentos necessários para a execução deste projeto.

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Objetivo geral	10
1.1.1 Objetivos específicos	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 Importância dos antibióticos betalactâmicos	11
2.2 Desenvolvimento e descoberta de outros betalactâmicos	11
2.3 Mecanismo de ação dos betalactâmicos	14
2.4 Betalactamases	15
2.5 Betalactamases codificadas por genes de localização cromossômica	16
2.6 Betalactamases codificadas por genes extracromossômicos e definição de betalactamase de espectro ampliado	18
2.7 Classificação das betalactamases	19
2.8 Correlação entre achados clínicos e infecção por enterobactérias produtoras de ESBL	22
2.9 Epidemiologia das infecções por enterobactérias produtoras de betalactamases no Brasil	26
2.10 KPC - Carbapenemase de <i>K. pneumoniae</i>	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Aspectos éticos	29
3.2 Isolados utilizados no estudo	29
3.3 Cepas de referência	30
3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	31

3.5 Avaliação da susceptibilidade ao ertapenem	31
3.6 Detecção de genes que codificam ESBLs e carbapenemases	32
3.7 Sequenciamento de DNA	36
3.8 ERIC-PCR	37
3.9 Cálculo do valor preditivo positivo	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Distribuição dos isolados segundo material clínico e espécie	39
4.2 Distribuição dos isolados segundo a positividade para o teste de Jarlier (produção de ESBL) e concentração inibitória mínima para cefepima, ceftazidima e cefotaxima	40
4.3 Valor preditivo positivo do teste de Jarlier	42
4.4 Detecção de genes que codificam betalactamases de espectro ampliado	43
4.5 Detecção de <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{VEB} , <i>bla</i> _{PER}	45
4.6 Modificação da PCR multiplex para <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{KPC} e detecção de derivados de <i>bla</i> _{KPC}	46
4.7 Clonalidade dos isolados	47
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES	54
7 REFERÊNCIAS	55

RESUMO

Sampaio J. L. M. Caracterização de betalactamases de espectro ampliado e KPC em *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes* isoladas de casos de infecções relacionadas aos cuidados com a saúde em pacientes atendidos em hospitais da cidade de São Paulo [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

INTRODUÇÃO: O tratamento das infecções relacionadas à assistência à saúde, causadas por enterobactérias, representa um desafio crescente, em função do aumento da prevalência de resistência aos betalactâmicos, em particular às cefalosporinas de terceira e quarta gerações e carbapenêmicos. Os mecanismos de resistência mais relevantes a essas classes de antimicrobianos, em enterobactérias, é a produção de betalactamases de espectro ampliado e carbapenemases. Os objetivos do estudo foram: (1) determinar a frequência e caracterizar betalactamases de espectro ampliado (ESBL); (2) determinar a frequência e caracterizar o gene *bla*_{KPC-2}; (3) avaliar a relação clonal entre isolados produtores de ESBL ou KPC, uma coleção de isolados do gênero *Enterobacter* cultivadas de casos de infecções relacionadas aos cuidados com a saúde diagnosticadas em pacientes atendidos em hospitais da cidade de São Paulo. **MÉTODOS:** Foram estudadas 141 isolados do gênero *Enterobacter* quanto à produção de ESBL pelo método de Jarlier e colaboradores, concentrações inibitórias mínimas para cefotaxima, cefepima e ceftazidima pelo método da diluição em ágar, halo de inibição para ertapenem pelo método de Kirby-Bauer e presença de genes que codificam ESBL ou KPC, por PCR. **RESULTADOS:** A frequência de isolados produtores de ESBL, quando utilizado o método de Jarlier e colaboradores foi de 22,7%. Os genes que codificam cefotaximases foram detectados em 34,4% dos isolados com teste fenotípico positivo para ESBL, e houve predomínio do grupo da CTX-M-8, enquanto os genes que codificam variantes SHV foram detectados em 18,7% dos produtores de ESBL. Os genes *bla*_{TEM-1} e *bla*_{OXA-1} foram detectados em 62,5%; 12,5% dos isolados com teste fenotípico positivo para ESBL, mas não são ESBLs. Não houve detecção do gene que codifica a enzima BES-1 na amostragem. O gene *bla*_{KPC-2} foi detectado em três dos 15 isolados produtores de ESBL e resistentes ao ertapenem. Os perfis obtidos por ERIC-PCR sugerem a disseminação de um clone de *E. aerogenes* entre instituições hospitalares. **CONCLUSÕES:** Os determinantes genéticos de ESBLs predominantes na amostragem analisada são derivados de *bla*_{CTX-M}. A presença de grupos clonais em instituições hospitalares distintas, evidencia disseminação entre hospitais. A presença de KPC em *Enterobacter* é reportada pela primeira vez em São Paulo.

Descritores: *Enterobacter cloacae*. *Enterobacter aerogenes*. Beta-lactamases.

Farmacoresistência. KPC. ESBL.

ABSTRACT

Sampaio J. L. M. Characterization of extended spectrum beta-lactamases and KPC in *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes* cultivated from cases of healthcare-associated infections in patients from hospitals in the city of São Paulo [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010.

INTRODUCTION: The treatment of healthcare associated infections caused by enterobacteria represents a growing challenge due to the increasing prevalence of beta-lactam resistance, particularly to third and fourth generations cephalosporins and carbapenems. The main mechanisms of resistance to these antimicrobial classes are the production of extended spectrum beta-lactamases and carbapenemases. The objectives of this study were: (1) determine the frequency and characterize extended spectrum beta-lactamases; (2) determine the frequency and characterize *bla*_{KPC}; (3) evaluate the clonal relation among ESBL or KPC producers, in a collection of *Enterobacter* isolates cultivated from cases of healthcare associated infections in patients from hospitals located in the city of São Paulo. **METHODS:** A total of 141 *Enterobacter* isolates were studied concerning ESBL production using the method from Jarlier and colleagues, minimum inhibitory concentrations for cefotaxime, ceftazidime and cefepime by agar dilution method, inhibition zone for ertapenem by Kirby-Bauer method and the presence of genes coding for ESBLs or KPCs, by PCR. **RESULTS:** The frequency of ESBL producers using Jarlier’s method was 22.7%. Genes coding for cefotaximases were detected in 34.4% of isolates with a positive test for ESBL and CTX-M-8 group was predominant, but *bla*_{SHV} variants were also detected in 18.7% of the ESBL producers. *bla*_{TEM-1}, and *bla*_{OXA-1} genes were detected in 62.5%; 12.5% of all isolates with a positive phenotypic test for ESBL, but there are not ESBLs. The *bla*_{KPC-2} gene was detected in three among 15 ESBL producers that were also resistant to ertapenem. ERIC-PCR profiles suggest the dissemination of an *E. aerogenes* clone among hospitals. **CONCLUSIONS:** The predominant ESBL determinants in the sample analyzed derive from *bla*_{CTX-M}. The presence of the same clonal groups in different hospitals indicates inter-hospital dissemination. The presence of KPC producing *Enterobacter* is reported for the first time in São Paulo.

Descriptors: *Enterobacter cloacae*. *Enterobacter aerogenes*. Beta-lactamases. Drug resistance, bacterial. ESBL. KPC.

1 INTRODUÇÃO

As enterobactérias têm grande incidência em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) em âmbito mundial, assim como no Brasil. Se por um lado os betalactâmicos são a classe de antimicrobianos mais segura em uso clínico atualmente, em função de atuarem bloqueando a síntese da parede celular, estrutura bacteriana sem homólogo em células eucarióticas, o tratamento das infecções por esses agentes representa um desafio crescente. Diversas publicações nos últimos dez anos tem evidenciado um aumento progressivo das taxas de resistência antimicrobiana às cefalosporinas de terceira e quarta gerações, e recentemente aos carbapenêmicos [1-8].

Há quatro tipos conhecidos de mecanismos de resistência aos betalactâmicos: alteração da expressão de porinas, sistemas de efluxo, alteração do alvo e as betalactamases [9]. A redução da expressão ou alteração da conformação do canal das porinas frequentemente resulta em redução da permeabilidade bacteriana e, portanto, entrada do antimicrobiano. As alterações de permeabilidade podem ter um elevado custo metabólico para célula bacteriana, pois nutrientes frequentemente são transportados para o citoplasma pela mesma via. Essas alterações são usualmente decorrentes de mutações que acarretam parada da tradução ou alteração na sequência de aminoácidos na região correspondente ao canal da porina. Como os genes que codificam essas proteínas tem localização cromossômica, a sua disseminação por transferência horizontal não é significativa e não explica as crescentes taxas de resistência antimicrobiana em bacilos gram-negativos [10].

Os sistemas de efluxo são capazes de transportar para fora da célula bacteriana múltiplos substratos, mas tem atividade dependente de ATP, resultando em consumo energético [11]. A expressão de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) com baixa afinidade por betalactâmicos é decorrente de mutações em genes

cromossômicos, e de modo análogo ao que ocorre com as porinas, os genes que as codificam tem localização cromossômica, a sua disseminação por transferência horizontal não é significativa e não explica as crescentes taxas de resistência antimicrobiana em bacilos gram-negativos [9].

O mecanismo com maior impacto na epidemiologia da resistência bacteriana e que apresenta a maior eficiência contra essa classe de antimicrobianos é a produção de betalactamases. Essas enzimas são capazes de hidrolisar o anel betalactâmico, estrutura essencial para a atividade antimicrobiana dessa classe de fármacos. Há uma grande diversidade dessas enzimas, com mais de 450 já descritas [12]. As betalactamases em gram-negativos localizam-se predominantemente no espaço periplasmático, mesma localização das transpeptidases alvos dos betalactâmicos. Esses dois aspectos conferem maior eficiência em comparação com os gram-positivos, que secretam as betalactamases.

Dentre as betalactamases os dois grupos mais importantes são o grupo das betalactamases de espectro ampliado e o das carbapenemases, em função da capacidade do primeiro grupo de degradar cefalosporinas de terceira e quarta gerações e monobactâmicos, e do segundo grupo de degradar carbapenêmicos [13], fármacos amplamente utilizados na prática clínica.

As betalactamases de espectro ampliado mais prevalentes em todo o mundo são codificadas por genes do grupo *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}. Outras betalactamases menos prevalentes são codificadas por genes dos grupos *bla*_{OXA}, *bla*_{GES}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{BEL}, *bla*_{TLA} e *bla*_{SFO} [14].

As carbapenemases mais prevalentes em enterobactérias são codificadas por genes dos grupos *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} [15], e mais recentemente *bla*_{NDM} [16].

Os laboratórios de microbiologia clínica têm papel fundamental na detecção desses mecanismos de resistência, pois os laudos por eles emitidos orientam condutas terapêuticas e de controle de infecções relacionadas aos cuidados com a saúde.

Tradicionalmente as diretrizes do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) têm sido seguidas para realização dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos na maioria dos laboratórios brasileiros [17, 18]. Nesses documentos constam critérios para a detecção de produção de ESBLs em *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*, mas neles não há critérios recomendados para as demais espécies de enterobactérias, incluindo o grupo CESP. O grupo CESP compreende espécies que possuem o operon *amp* em seu cromossomo e expressam níveis basais significativos de AmpC. Os gêneros e espécies compreendidos neste grupo são: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Proteus vulgaris*. A conduta que tem sido adotada pela maioria dos laboratórios de microbiologia no Brasil é a utilização do método proposto por Jarlier e colaboradores, que se fundamenta na inibição das ESBLs pelo clavulanato de potássio e disposição de discos de cefalosporinas a uma distância de 25 a 30 mm de um disco contendo amoxicilina-clavulanato. A presença de distorção com aumento da área de inibição indica a presença de ESBL [19]. Não há, até o presente, consenso quanto à detecção de ESBLs em outras espécies de enterobactérias.

O Clinical and Laboratory Standards Institute publicou em janeiro de 2010 o documento M100-S20 no qual foram alterados os pontos de corte para cefalosporinas e tornada dispensável a realização de teste para detecção de ESBL para interpretação dos halos de inibição. A princípio os novos pontos de corte são capazes de separar a maior parte dos isolados produtores de ESBL daqueles não produtores dessas enzimas, mas não há no Brasil estudo evidenciando a correlação entre CIMs para cefalosporinas e genes de ESBLs. Um melhor conhecimento dos determinantes genéticos predominantes em amostras do Brasil, e sua correlação com CIMs poderiam auxiliar na decisão quanto à adequação dos novos pontos de corte à realidade nacional.

1.1 Objetivo geral:

Caracterizar as ESBLs e KPCs produzidas por *E. cloacae* e *E. aerogenes*, isoladas de casos de infecções relacionadas à assistência à saúde.

1.1.1 Objetivos específicos:

- Determinar as concentrações inibitórias mínimas para cefotaxima, ceftazidima e cefepima;
- Verificar a presença dos genes dos grupos *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, por PCR multiplex, nos isolados com perfil fenotípico de produção de ESBL;
- Avaliar o valor preditivo positivo do método de Jarlier para detecção de ESBLs em *E. cloacae* e *E. aerogenes*;
- Avaliar a susceptibilidade dos isolados com perfil fenotípico de produção de ESBL, ao ertapenem;
- Verificar a presença do gene *bla*_{KPC}, por PCR, nos isolados com perfil fenotípico de produção de ESBL e intermediários ou resistentes ao ertapenem;
- Avaliar a clonalidade de *E. cloacae* e *E. aerogenes* produtores de ESBL, por ERIC-PCR.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Importância dos antibióticos betalactâmicos:

A descoberta do primeiro betalactâmico – penicilina - por Alexander Fleming em 1928 [20], e seu sucesso no tratamento de infecções bacterianas em modelo animal estimularam a realização de pesquisas que evidenciaram sua estrutura química, e a estrutura essencial para sua ação – o anel betalactâmico [21-24]. A penicilina, após 70 anos de uso clínico continua sendo o fármaco de primeira escolha no tratamento de algumas doenças como a sífilis e a faringite estreptocócica, e atualmente a família dos betalactâmicos é a mais utilizada no tratamento de infecções, tanto em pacientes ambulatoriais como em pacientes internados, correspondendo a mais e 60% do consumo total de antimicrobianos em países como a Espanha [25].

2.2 Desenvolvimento e descoberta de outros betalactâmicos:

A obtenção do ácido 6-amino-penicilânico por hidrólise da penicilina, permitiu a síntese de diversos betalactâmicos por adição e/ou substituição de radicais (Figura 1), resultando, por exemplo, na síntese de derivados isoxazolil – oxacilina - resistente à ação de penicilinasas produzidas por espécies do gênero *Staphylococcus*. Outros compostos a exemplo da ampicilina – aminopenicilina – e piperacilina – ureidopenicilina – ambas ativas contra bacilos gram-negativos, foram sintetizados e seu uso clínico implementado [25-27]. Em pouco tempo de uso clínico da penicilina e nas avaliações microbiológicas iniciais da ampicilina ficou evidente a importância das enzimas capazes de degradar os betalactâmicos: as betalactamases [27, 28]. A busca por compostos que pudessem inibir a atividade dessas enzimas bacterianas resultou na descoberta do clavulanato, um betalactâmico produzido por *Streptomyces clavuligerous*, que atua como inibidor suicida de grande parte das betalactamases [27].

Figura 1 – Penicilinas semi-sintéticas desenvolvidas a partir do ácido 6-amino-penicilânico.

Reproduzido de Rolinson [27]

Outros grupos de betalactâmicos foram descobertos buscando-se ativamente por fungos ou actinomicetos que produzissem substâncias com ação antimicrobiana, como foi o caso da primeira cefalosporina e do primeiro carbapenêmico. A primeira cefalosporina foi isolada de *Cefasloporium acremonium* em 1948, mas apenas após caracterização do ácido cefalosporânico e modificações das cadeias laterais, teve seu uso clínico iniciado em 1964. As cefalosporinas, junto com as cefamicinas,

constituem o subgrupo dos cefens. Possuem em sua estrutura básica o anel betalactâmico associado a um anel dihidrotiazínico, denominados em conjunto ácido cefalosporânico (Figura 2) e são subdivididas em gerações. As cefalosporinas de primeira geração são as mais ativas contra *Staphylococcus* do que as demais gerações; por outro lado as cefalosporinas de terceira e quarta gerações são mais ativas contra o gênero *Streptococcus* e contra bacilos gram-negativos, além de ter boa penetração no sistema nervoso central [29, 30].

As cefalosporinas de terceira geração, ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona e a de quarta geração cefepima tem sido amplamente utilizadas na prática clínica, pois são as cefalosporinas com maior atividade contra enterobactérias.

Figura 2 – Estrutura dos betalactâmicos. Modificado de Suárez [25].

2.3 Mecanismo de ação dos betalactâmicos:

A parede celular bacteriana é composta por unidades alternadas de ácido N-acetilmurâmico (NAM) e N-acetilglicosamina (NAG), cuja ligação covalente é catalisada por transglicosidades. A ligação entre as cadeias com repetições de NAM e NAG é feita entre os terminais pentapeptídicos das moléculas de NAM. Cada NAM possui um terminal pentapeptídico com dois resíduos de D-alanina na sua extremidade. A ligação covalente entre esses dois resíduos – transpeptidação - é catalisada pelas transpeptidases (PBPs), também denominadas proteínas ligadoras de penicilina. Essas ligações, que se repetem ao longo de toda a parede celular, são essenciais para conferir à mesma rigidez e estabilidade.

O anel betalactâmico tem estrutura semelhante ao terminal D-alanina-D-alanina do NAM, o que permite a sua ligação às PBPs, que por sua vez sofrem acilação durante essa interação, o que as torna incapazes de catalisar outras reações de transpeptidação [31]. Como a parede celular é uma estrutura dinâmica e duplicada a cada 20 ou 30 minutos, para a divisão bacteriana, e a primeira etapa da síntese da parede inclui a autólise para inserção de novas unidades de NAM e NAG, a parada da síntese causada pelo betalactâmico resulta indiretamente na desestruturação da parede e predispõe a célula à lise osmótica (Figura 3).

Figura 3 – Mecanismo de ação dos betalactâmicos. Reproduzido de Suárez [25].

2.4 Betalactamases:

Compostos betalactâmicos são produzidos por diversos microrganismos presentes no solo e provavelmente sua produção pode representar uma vantagem competitiva pelo nicho ecológico. De modo análogo, a produção de betalactamases (BLE) pode representar uma vantagem adaptativa para garantir a integridade da parede celular. BLE constituem um grupo diverso de enzimas, mas tem em comum a capacidade de hidrolisar o anel betalactâmico. As BLE inicialmente acilam os betalactâmicos e a seguir atuam hidrolisando-os, o que permite a regeneração de sua capacidade catalítica, tornando-as disponíveis para atuar em outra catálise [31].

Os genes que codificam as BL podem ter localização cromossômica ou plasmidial, e diversos gêneros de enterobactérias produzem BL codificadas por genes de localização cromossômica. Considerando a localização cromossômica de alguns genes, a similaridade de sequência com genes que codificam PBPs, e a presença de resíduo de serina no sítio catalítico de algumas BL e nas PBPs, é provável que

alguns grupos de BL tenham evoluído das PBPs, devido à pressão seletiva exercida por betalactâmicos sintetizados por microorganismos presentes no solo. Na verdade, BL são enzimas em defesa da parede celular bacteriana [12]. Outra evidência que subsidia tal hipótese é a descrição da primeira BL antes do início do uso clínico da penicilina [28].

2.5 Betalactamases codificadas por genes de localização cromossômica:

AmpC e SHV-1 são exemplos de enzimas codificadas por genes de localização cromossômica, e a primeira é expressa virtualmente por todas as espécies de *Enterobacter*, gênero objeto deste estudo. O operon *amp*, de localização cromossômica, é um exemplo de regulação vinculada à integridade da parede celular (Figura 4).

Figura 4- Regulação da expressão de *ampC*. Reproduzido de Walsh, C. [32].

Os genes *ampG*, *ampD* e *ampR* controlam a expressão do principal gene do operon – *ampC* - permitindo o aumento da transcrição quando há indícios de degradação da parede celular. AmpG é uma permease, que importa para o citosol fragmentos de peptidoglicano (dissacaril tripeptídeo), subprodutos secundários à interrupção da síntese da parede celular, quando um betalactâmico acila as PBPs. A ligação do dissacaril tripeptídeo a AmpR, converte este ativador transcricional para sua forma ativa, que por sua vez ativa a transcrição de *ampC*. A proteína AmpD degrada boa parte do tripeptídeo produzido em níveis basais, de modo que a transcrição de *ampC* ocorre em níveis basais e só aumenta quando o acúmulo de substrato ultrapassa a capacidade de degradação de AmpD. Esse acúmulo de tripeptídeo resulta na ativação de AmpR [32]. No gênero *Enterobacter* a produção basal de AmpC é o principal mecanismo de resistência a aminopenicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda gerações e cefamicinas. Esse circuito é responsável pela resistência indutiva a cefalosporinas de terceira geração (C3G) que pode ser observada durante o tratamento de infecções por *Enterobacter* spp., quando o fármaco utilizado é uma C3G. Esse mecanismo não leva à resistência à cefepima - cefalosporina de quarta geração - a não ser que ocorra concomitantemente alteração na expressão de porinas [33]. Mutantes em *ampR* produzem níveis elevados de AmpC e o fenótipo não é reversível com a retirada da pressão seletiva. O fenótipo desses mutantes é, usualmente, de resistência a cefalosporinas de terceira e quarta gerações.

Em outros gêneros, as AmpCs podem ser também codificadas por genes de localização plasmidial. Neste caso os genes que regulam a expressão de *ampC* estão ausentes, sendo a expressão, portanto, constitutiva, levando à resistência às cefamicinas e cefalosporinas de segunda e terceira gerações. Em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, uma das características fenotípicas que sugere a presença de AmpC plasmidial é a resistência concomitante às cefamicinas e cefalosporinas

de terceira e/ou quarta gerações; entretanto não é um marcador com grande especificidade, pois a resistência às cefamicinas pode estar presente em mutantes deficientes em porinas OmpF ou OmpC [34].

2.6 Betalactamases codificadas por genes extracromossômicos e definição de betalactamase de espectro ampliado:

A primeira descrição de uma BL codificada por um elemento genético transferível foi publicada em 1965 [35]. A enzima isolada de uma *E. coli* foi denominada TEM-1, pois foi cultivada de uma amostra de sangue de um paciente denominado Temoniera, na Grécia. A localização dos genes, que codificam BL, em plasmídeos ou transposons permitiu a rápida disseminação por transferência horizontal de material genético entre espécies bacterianas, o que é evidenciado pela presença do gene *bla*_{TEM-1} em diferentes espécies de enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*. Apesar de TEM-2 diferir de TEM-1 por um resíduo de aminoácido seu perfil de hidrólise é o mesmo que o de TEM-1 [36].

SHV-1 (variante sulfidril) foi descrita de modo incompleto por Pitton em 1972 [37], mas a caracterização molecular e a denominação definitiva foram publicadas por Matthew e colaboradores em 1979, que evidenciaram que a atividade enzimática era afetada por inibidores de grupos sulfidril, como o benzoato de p-cloromercúrio [38]. A localização do gene *bla*_{SHV-1} é usualmente cromossômica em *K. pneumoniae* e plasmidial em *E. coli*. É provável que a localização desses determinantes genéticos em plasmídeos e a pressão seletiva de antimicrobianos tenham contribuído para que cerca de três anos após o início do uso clínico da cefotaxima na Europa, Knothe e colaboradores descrevessem pela primeira vez a detecção de isolados de *K. pneumoniae* que apresentavam resistência transferível a cefotaxima [39]. A caracterização molecular da enzima,

assim como a denominação SHV-2 foi publicada por Kliebe e colaboradores [40]. As enzimas SHV-1 e SHV-2 diferem em apenas um resíduo de aminoácido, na posição 238, sendo uma glicina na SHV-1 e uma serina na SHV-2 [41]. Esta única substituição aumenta a eficiência de hidrólise, pois está situada no sítio catalítico. A SHV-2 foi a primeira descrição de um grupo de enzimas denominado betalactamases de espectro estendido (ESBL), em função de sua capacidade de hidrolisar oximiinocefalosporinas [36].

2.7 Classificação das betalactamases:

Duas classificações de BL são amplamente utilizadas, enquanto uma terceira, proposta recentemente, não encontrou adesão no meio científico, face à mudança de conceitos, como incluir carbapenemases como ESBLs [42]. A primeira proposta foi a de Ambler, que se baseia na similaridade de sequências de aminoácidos, sendo as enzimas agrupadas em quatro classes principais A, B, C e D [43]; nessa classificação as ESBLs pertencem à classe A. A segunda classificação, proposta por Bush-Jacoby-Medeiros [13] foi revisada recentemente, e se baseia na homologia, ou seja, substratos preferenciais e bloqueio da atividade enzimática por inibidores. Nesta classificação, as ESBLs pertencem ao subgrupo 2be, indicando que derivam das enzimas TEM-1, TEM-2, e SHV-1, mas possuem um espectro de hidrólise mais amplo, indicado pela letra “e” na sigla. Outra particularidade funcional é que, em sua maioria, sofrem inibição por clavulanato, sulbactam e tazobactam, o que facilita sua detecção laboratorial. Os genes que codificam essas enzimas localizam-se em plasmídeos ou transposons e são originados, por uma ou mais mutações em um dos genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-2} e *bla*_{SHV-1} [41]. Foram descritas, até a data de preparo deste texto, 140 derivados de SHV-1 e 185 derivados de TEM-1 ou TEM-2 [44].

Outro grupo de enzimas com propriedades funcionais semelhantes às aquelas das derivadas de TEM-1, TEM-2 e SHV-1 são as cefotaximases (CTX-M). Considerando as propriedades funcionais, e perfil de hidrólise de substratos, essas enzimas pertencem ao grupo 2be da classificação de Bush-Jacoby-Medeiros, apesar de não serem derivadas de TEM ou SHV. Nesse aspecto, a classificação de Ambler é mais apropriada, pois segundo ela pertencem à mesma classe A os grupos TEM, SHV, CTX-M, BES, BEL, GES, PER, SFO, TLA e VEB. A exceção é o grupo das carbapenemases do grupo KPC, que podem ser inibidas pelo clavulanato, mas em contraste às ESBLs, hidrolisam carbapenêmicos eficientemente [45]. Quando as sequências dos genes que codificam CTX-M são comparadas com aquelas disponíveis no GenBank, as maiores similaridades (62 – 75%) são observadas com genes que codificam betalactamases cromossômicas de *Klebsiella oxytoca*, *Serratia fonticola*, *Proteus vulgaris*, *Kluyvera* spp. e *Citrobacter koseri* [46]. Os primeiros relatos de enzimas distintas de TEM e SHV com perfil de hidrólise de cefalosporinas de terceira geração datam de 1991 [47, 48], mas a descrições detalhadas de CTX-M-1 e CTX-M-2 foram realizadas em 1996 [49]. As CTX-Ms podem ser subclassificadas, em função de sua similaridade de sequência de aminoácidos, em cinco grupos: grupo da CTX-M-1, grupo da CTX-M-2, grupo da CTX-M-8, grupo da CTX-M-9 e grupo da CTX-M-25. Essa subclassificação é importante para a detecção dos genes com iniciadores genéricos para cada grupo [50]. Até o presente já foram descritas 111 enzimas diferentes - CTX-M-14 e CTX-M-18; CTX-M-55 e CTX-M-57 tem sequências idênticas. Assim como as ESBLs derivadas de SHV-1 e TEM-1/TEM-2, as CTX-Ms são inibidas por clavulanato, sulbactam e piperacilina. Isolados produtores de CTX-Ms usualmente têm concentrações inibitórias mínimas (CIM) para cefotaxima iguais ou superiores a 64 µg/ml enquanto as CIMs para ceftazidima estão distribuídas na faixa de 2 a 8 µg/ml,

apesar de algumas enzimas, como CTX-M-15 e CTX-M-23 hidrolisarem ceftazidima de modo efetivo, gerando CIMs na faixa de 64 a 256 µg/ml [51, 52].

As betalactamases do tipo OXA receberam esta denominação em função da maior eficiência de hidrólise de oxacilina e cloxacilina, em comparação com a aquela observada quando o substrato é a penicilina. Apesar de ocorrerem predominantemente em *Pseudomonas aeruginosa*, a OXA-1 é encontrada em até 10% dos isolados de *E. coli*, mas não é considerada uma ESBL, pois não é capaz de hidrolisar oximiinocefalosporinas. Já foram descritas 205 enzimas do tipo OXA diferentes, mas apenas parte delas é classificada como ESBL. Aquelas classificadas como ESBLs, descritas até o momento, são derivadas de OXA-10 (OXA-11, 14, 16, 17, 19, 28, 35, 142, 145 e 147) ou de OXA-2 (OXA-15, 32, 34, 36, 141 e 161) [44]. Seu substrato preferencial é a cefotaxima, e em menor grau a ceftazidima e o aztreonam [53-58].

Outros grupos de ESBLs ditas minoritárias são: PER, VEB, BES, BEL, TLA, GES e SFO. São detectadas em frequência muito inferior àquela observada para derivadas de TEM, SHV, CTX-M e OXA. Uma das suposições para a menor frequência é a localização em plasmídeos não conjugativos [14].

À semelhança das enzimas do grupo OXA, a primeira descrição da enzima PER-1, refere-se a *P. aeruginosa* [59], mas assim como PER-2, já foi isolada em enterobactérias [60-62].

BES foi descrita em *Serratia marcescens* no Rio de Janeiro em 1996 e até hoje não há nenhuma descrição adicional da ocorrência dessa enzima [63]. A enzima tem alta afinidade por aztreonam e baixa eficiência hidrolítica para ceftazidima e cefepima.

A primeira enzima do grupo VEB foi detectada em uma *E. coli* isolada de um paciente oriundo do Vietnã. O isolado apresentava resistência ao aztreonam,

cefotaxima e ceftazidima, e inibição da atividade enzimática pelo clavulanato [64]. VEB-2 foi descrita em *P. aeruginosa* [65], VEB-3 em *Enterobacter cloacae* [66], VEB-4 em *Proteus mirabilis* e VEB-5 em *E. coli* [67].

GES, também denominada IBC, dentre as ESBLs minoritárias, tem sido descrita mais frequentemente, inclusive no Brasil [68, 69]. Tal como a maioria das ESBLs é inibida pelo clavulanato. A eficiência de hidrólise do aztreonam é variável, estando presente em GES-9, mas ausente em GES-1 [14]. GES-4, GES-5 e GES-6 apresentam uma substituição Gli170Ser que resulta em baixa eficiência hidrolítica para carbapenêmicos, menor sensibilidade aos inibidores, mas hidrolizam cefamicinas, o que não é usual em ESBLs.

Os genes que codificam as ESBLs, assim como seus produtos, já foram detectados em diversas espécies de enterobactérias, mas a maior prevalência é observada em *K. pneumoniae*, *E. coli* e espécies do gênero *Enterobacter* [45].

2.8 Correlação entre achados clínicos e infecção por enterobactérias produtoras de ESBL:

A utilização de cefalosporinas de terceira ou quarta gerações no tratamento de infecções causadas por isolados produtores deste tipo de BL tem sido associada a aumento de mortalidade caso a terapêutica não seja ajustada em até 72 horas, mas há relatos de sucesso no tratamento dessas infecções com utilização de cefepima [70]. Nenhum estudo randomizado avaliou a eficácia das diferentes opções para tratamento das infecções causadas por isolados produtores de ESBL; logo as condutas terapêuticas têm sido baseadas em relatos de casos, e a maioria desses estudos tem como limitação a ausência de dados quanto à identificação do gene que codifica a enzima, não permitindo uma generalização. Uma das evidências experimentais que aponta a necessidade de conhecermos quais as enzimas predominantes nas diferentes espécies de enterobactérias avaliou o impacto da

densidade do inóculo bacteriano nos valores de CIMs. Thomson e colaboradores evidenciaram que o efeito inóculo é marcante nos isolados produtores de ESBLs do tipo SHV, quando testados frente à piperacilina-tazobactam ou cefepima, ou seja, quando são utilizadas no teste de susceptibilidade inóculos com maior densidade, há elevação significativa das CIMs nos isolados produtores de ESBLs derivadas de SHV, mas não nos isolados produtores de TEM [71], o que pode implicar em falha terapêutica. Se por um lado algumas publicações evidenciam a superioridade dos carbapenêmicos no tratamento das infecções causadas por enterobactérias produtoras de ESBLs, quando são consideradas a sobrevida e a cura bacteriológica [72-74], o uso indiscriminado de carbapenêmicos gera uma pressão seletiva e facilita a disseminação de cepas resistentes aos carbapenêmicos no ambiente hospitalar [75]. Outro racional para a necessidade de conhecermos as ESBLs predominantes no Brasil é a diferença existente quanto aos tipos de ESBLs predominantes na Europa – SHV e CTX – em contraste à América do Norte, onde o predomínio é de derivados de TEM [45]. Provavelmente na América do Sul o predomínio é de CTX-M e SHV, a julgar pelos dados disponíveis de publicações da Argentina [76]. Há poucos dados brasileiros sobre os tipos de ESBL predominantes; há publicações quanto à ocorrência de enzimas do tipo SHV, CTX-M e BES-1 em *P. mirabilis*, *E. aerogenes*, *E. cloacae* e *S. marcescens*, indicando a disseminação desses determinantes genéticos entre diferentes espécies de enterobactérias [63, 77-79]. Há publicações nacionais descrevendo a incidência crescente de infecções causadas por diferentes espécies de enterobactérias produtoras de ESBL, caracterizadas pela inibição pelo clavulanato, mas poucas são as publicações nas quais há caracterização molecular dessas enzimas [63, 69, 77, 78, 80-82]. A compilação das publicações nacionais, indexadas no PubMed, evidencia um predomínio de CTX-M e SHV. Há apenas um relato de isolamento de derivado de TEM (Tabela 1). Considerando a resistência às cefalosporinas de terceira geração

como um marcador de produção de ESBLs em *E. coli* e *K. pneumoniae*, dados de publicações nacionais evidenciam prevalência de isolados produtores de ESBL superior a 50% em unidades de tratamento intensivo. Apesar de esse mecanismo de resistência ser mais prevalente em *K. pneumoniae* e *E. coli*, diversas publicações evidenciam sua relevância em outras espécies de enterobactérias, inclusive no Brasil [66, 77, 83-96].

Tabela 1 – Betalactamases de Espectro Ampliado Detectadas no Brasil

Enzima	Espécies	Autor	Referência
BES-1	<i>Serratia marcescens</i>	Bonnet, R.	[63]
CTX-M-2	<i>E. coli</i> ; <i>S. marcescens</i> ; <i>Proteus mirabilis</i>	Andrade, L. N.	[97]
CTX-M-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lopes, A. C.	[98]
CTX-M-2	<i>K. pneumoniae</i>	Tollentino, F. M.	[81]
CTX-M-2	<i>P. mirabilis</i>	Bonnet, R.	[77]
CTX-M-2	<i>E. coli</i>	Minarini, L. A.	[99]
CTX-M-2	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Fernandes, S. A.	[100]
CTX-M-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Picão, R.	[101]
CTX-M-2	<i>E. coli</i>	Minarini, L. A.	[102]
CTX-M-2	<i>E. coli</i>	Warren, R. E.	[103]
CTX-M-2	<i>K. pneumoniae</i>	Carmo Filho, J. R.	[104]
CTX-M-2	<i>K. pneumoniae</i>	Oliveira Garcia, D.	[105]
CTX-M-8	<i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>E. aerogenes</i> ; <i>C. amalonaticus</i>	Bonnet, R.	[77]
CTX-M-8	<i>E. coli</i>	Minarini, L. A.	[102]
CTX-M-9	<i>E. coli</i>	Minarini, L. A.	[102]
CTX-M-15	<i>K. pneumoniae</i>	Tollentino, F. M.	[81]
CTX-M-16	<i>E. coli</i> ; <i>E. cloacae</i>	Bonnet, R.	[78]
CTX-M-28	<i>K. pneumoniae</i>	Lopes, A. C.	[98]
CTX-M-59	<i>K. pneumoniae</i>	Tollentino, F. M.	[81]
CTX-M-59	<i>K. pneumoniae</i>	Oliveira Garcia, D.	[105]
CTX-M-74	<i>E. coli</i>	Minarini, L. A.	[102]
CTX-M-75	<i>E. coli</i>	Minarini, L. A.	[102]
GES-1	<i>P. aeruginosa</i>	Picão, R.	[68, 106]
GES-5	<i>P. aeruginosa</i> ; <i>K. pneumoniae</i>	Picão, R.	[68, 106]
GES-7	<i>K. pneumoniae</i>	Dropa, M.	[69]
SHV-2	<i>K. pneumoniae</i>	Dropa, M.	[69]
SHV-2a	<i>K. pneumoniae</i>	Tollentino, F. M.	[81]
SHV-5	<i>K. pneumoniae</i>	Tollentino, F. M.	[81]
SHV-5	<i>E. coli</i>	Minarini, L. A.	[99]
SHV-11	<i>K. pneumoniae</i>	Veras, D. L.	[107]
SHV-12	<i>K. pneumoniae</i>	Tollentino, F. M.	[81]
SHV-12	<i>K. pneumoniae</i>	Tollentino, F. M.	[81]
SHV-27	<i>K. pneumoniae</i>	Corkill, J. E.	[79]
SHV-28	<i>K. pneumoniae</i>	Veras, D. L.	[107]
SHV-31	<i>K. pneumoniae</i>	Tollentino, F. M.	[81]
SHV-38	<i>K. pneumoniae</i>	Tollentino, F. M.	[81]
SHV-40	<i>K. pneumoniae</i>	Dropa, M.	[69]
SHV-56	<i>K. pneumoniae</i>	Minarini, L. A.	[108]
SHV-108	<i>K. pneumoniae</i>	Veras, D. L.	[107]
SHV-122	<i>K. pneumoniae</i>	Veras, D. L.	[107]
TEM-116	<i>K. pneumoniae</i>	Dropa, M.	[69]

2.9 Epidemiologia das infecções por enterobactérias produtoras de betalactamases no Brasil:

As enterobactérias produtoras de ESBLs tem sido detectadas no Brasil desde 1993, mas a primeira descrição de sua ocorrência no Brasil foi feita em 1997, com isolados detectados nas cidades do Rio de Janeiro e de São Paulo [109].

Não há estudo nacional de prevalência de ESBLs baseado em detecção fenotípica e confirmação genotípica; entretanto as publicações indexadas no PubMed indicam *K. pneumoniae* como a espécie predominante, e *bla*_{CTX-M} como o determinante genético mais frequentemente identificado (Tabela 1). Estimando-se a prevalência produção de ESBL em enterobactérias isoladas de pacientes com infecção, internados em unidades de terapia intensiva, pela taxa de resistência às cefalosporinas de terceira geração, em *E. coli* a prevalência em 2003 foi de 14,6% e em *K. pneumoniae* foi de 51,9%. Esses dados se referem à publicação mais recente dos dados do programa MYSTIC [110]. Essa taxa de produção de ESBL difere daquela descrita nos resultados do estudo SENTRY para o período de 1997 a 2001, que indica 3,8% para *E. coli* e 40,6% para *K. pneumoniae* [1]. Os dois estudos incluem amostragens distintas, mas há uma consistência na elevada taxa de produção de ESBL em *K. pneumoniae*.

Em pacientes da comunidade os dados são ainda mais escassos, e evidenciam em que na cidade de Juiz e Fora, estado de Minas Gerais, a prevalência de enterobactérias produtoras de ESBL isoladas de casos de infecção urinária é de 1,48%, com predomínio de *K. pneumoniae* [111].

Alguns surtos, em sua maioria causados por *K. pneumoniae* e havendo predominância de um único clone, tem sido relatados no Brasil [112-117]; entretanto há relatos de surtos policlonais [105].

Um reservatório importante para colonização é o trato digestório. Estudos evidenciam que em neonatos a colonização do trato digestório precede o

surgimento do quadro infeccioso [118]. Esses achados são compatíveis com a recentemente descrição na Espanha, de colonização precoce de pacientes hospitalizados, secundária a contaminação de superfícies da cozinha hospitalar e do trato digestório de manipuladores de alimentos [119]. Outros fatores de risco independentes para infecção por ESBL, evidenciados em diferentes instituições e no Brasil são: uso prévio de antimicrobiano, doença maligna, diabetes, ventilação mecânica e internação em unidade de terapia intensiva [120, 121].

2.10 KPC - Carbapenemase de *K. pneumoniae*:

As enzimas do tipo KPC são carbapenemases pertencentes à classe A de Ambler, são capazes de degradar carbapenêmicos e possuem um resíduo de serina em seu sítio ativo. O primeiro isolamento ocorreu em 1996 em *K. pneumoniae* nos Estados Unidos da América do Norte, mas a publicação com a caracterização da enzima só ocorreu em 2001 [122]. Em função de um erro na sequência depositada originalmente, prevalece a designação KPC-2 [123]. Já foram descritas até o momento 10 variantes [44], sendo duas delas em *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, o que evidencia a disseminação de determinantes genéticos móveis entre gêneros bacterianos distintos, dada a localização plasmidial dos genes descritos até o momento [124]. Estudo recente, que incluiu um isolado do Brasil e países de outros continentes, evidenciou que integrons com grande similaridade, contendo o gene *bla*_{KPC}, estão localizados em diferentes plasmídeos [124]. Evidências adicionais, publicadas recentemente, indicam a disseminação de um grupo clonal, com predomínio do tipo 437 de MLST [125]; portanto além da disseminação intercontinental de integrons, há no Brasil disseminação clonal, como já evidenciado em outros países [126].

A primeira descrição no Brasil se refere a *K. pneumoniae* com *bla*_{KPC-2}, isolada na cidade de Recife em 2006 [127], mas publicação em 2009 descreve isolamento de

K. pneumoniae produtora de KPC, na cidade de São Paulo, em 2005 [128]. Subsequentemente várias publicações relataram a ocorrência desses genes em *E. coli* e *Enterobacter cloacae*, outros estados do Brasil [128-134].

Tabela 2 – Distribuição dos genes *bla*_{KPC} segundo a espécie bacteriana na qual foi originalmente isolado.

Gene	Espécie
<i>bla</i> _{KPC-1}	<i>K. pneumoniae</i>
<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>K. pneumoniae</i>
<i>bla</i> _{KPC-3}	<i>K. pneumoniae</i>
<i>bla</i> _{KPC-4}	<i>E. cancerogenus</i>
<i>bla</i> _{KPC-5}	<i>P. aeruginosa</i>
<i>bla</i> _{KPC-6}	<i>K. pneumoniae</i>
<i>bla</i> _{KPC-7}	<i>K. pneumoniae</i>
<i>bla</i> _{KPC-8}	<i>K. pneumoniae</i>
<i>bla</i> _{KPC-9}	<i>E. coli</i>
<i>bla</i> _{KPC-10}	<i>A. baumannii</i>
<i>bla</i> _{KPC-11}	<i>K. pneumoniae</i>

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos:

O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Instituto Fleury e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Um registro numérico único foi atribuído a cada isolado, e as únicas informações do paciente utilizadas foram data da cultura, tipo de amostra clínica e hospital no qual foi atendido. Os hospitais foram identificados por letras, sem vínculo com sua designação original.

3.2 Isolados utilizados no estudo:

Os isolados utilizados no estudo pertencem à coleção de culturas do Instituto Fleury, todos agentes de IRAS. Foram estudadas *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes* de um banco de isolados coletados durante o período de janeiro de 2004 a dezembro de 2010. Todos os isolados foram previamente triados para a produção de ESBL pelo método de Jarlier e colaboradores. Foram utilizados como substratos a cefotaxima, ceftazidima e cefepima, com distância de 25 mm entre a borda dos discos e o disco central com amoxicilina-clavulanato. Qualquer aumento do halo de inibição foi considerado positivo [19]. Foi avaliado um total de 141 isolados do gênero *Enterobacter*, sendo 109 negativos e 32 positivos para o teste fenotípico para detecção de ESBL. Foi incluído no estudo um isolado por paciente, e um registro único foi atribuído a cada isolado. Todos os isolados foram cultivados casos de infecções relacionadas aos cuidados com a saúde.

Os isolados foram cultivados em ágar CPS e verificados quanto à sua pureza e a seguir a identificação da espécie foi confirmada utilizando-se o sistema Vitek2.

3.3 Cepas de referência

Para controle de qualidade dos testes de sensibilidade foi utilizada a cepa *E. coli* 25922 e critérios definidos pelo CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute no documento M100-S20 [135].

Para padronização e avaliação da especificidade das reações de PCR, para os diversos genes de BL, foram utilizadas cepas de referência gentilmente cedidas pelos professores Ana Cristina Gales e Nilton Lincopan (Tabela 3).

Tabela 3 – Cepas de Referência Utilizadas para PCR

Cepa de referência	Gene	Pesquisador ou Instituição
RIO-5	<i>bla</i> _{BES-1}	Jorge Sampaio
CTX-M-16	<i>bla</i> _{CTX-M-16}	Jorge Sampaio
CTX-M-2	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	Jorge Sampaio
CTX-M-8	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	Jorge Sampaio
CTX-M-9	<i>bla</i> _{CTX-M-9}	Jorge Sampaio
GES-1	<i>bla</i> _{GES-1}	Nilton Lincopan
GES-2	<i>bla</i> _{GES-2}	Nilton Lincopan
IMP-1	<i>bla</i> _{IMP-1}	Ana Gales
KPC-2	<i>bla</i> _{KPC-2}	College of American Pathologists
OXA-1	<i>bla</i> _{OXA-1}	Ana Gales
SHV-2	<i>bla</i> _{SHV-2}	Jorge Sampaio
SHV-5	<i>bla</i> _{SHV-5}	Jorge Sampaio
TEM-24	<i>bla</i> _{TEM-24}	Jorge Sampaio
VIM-1	<i>bla</i> _{VIM-1}	Ana Gales

3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima:

As suscetibilidades à cefepima, cefotaxima e ceftazidima foram avaliadas pelo método da diluição em ágar [136]. Os critérios interpretativos utilizados foram aqueles descritos nos documentos do CLSI e do EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [137, 138]. Aliquotas de 100 ml de ágar Mueller-Hinton foram esterilizadas e a seguir estabilizadas a 45 a 50°C. Foi adicionada a solução de antimicrobiano, homogeneizar e distribuir em placas de Petri. Após a solidificação as placas foram armazenadas sob refrigeração 2 a 8°C por até cinco dias. As concentrações finais testadas de cada antimicrobiano foram: 128 µg/ml a 0,125 µg/ml em diluições sucessivas ½. Foram inoculadas cerca de cinco colônias distintas de uma cultura pura e recente em 10 ml de caldo Mueller-Hinton. Incubadas a 35°C por 18 a 24 horas. Utilizando o crescimento bacteriano obtido, foi preparada suspensão com turbidez equivalente ao padrão 0.5 da escala de MacFarland. Diluir 1/10 em caldo Mueller-Hinton. Cada suspensão foi transferida para a base do replicador previamente esterilizado. Utilizando o replicador, as suspensões foram inoculadas em placas com diferentes concentrações de antimicrobianos, iniciando-se da placa com menor concentração de antimicrobiano. As placas inoculadas foram incubadas em ar ambiente a 35°C por 18 a 20 horas. A CIM foi interpretada como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano. Foi utilizada como controle de qualidade a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.5 Avaliação da susceptibilidade ao ertapenem:

Para avaliação da susceptibilidade ao ertapenem foi utilizado o método de Kirby-Bauer, conforme descrito no documento M2-A10 do CLSI [139]. Foram utilizadas placas de Petri descartáveis de 15 x 90 mm contendo ágar Mueller-Hinton (BBL - Becton-Dickinson) com espessura média de 4 mm e discos de ertapenem com

potência de 10 µg (Oxoid). As suspensões bacterianas, equivalentes ao padrão 1 da escala de McFarland foram preparadas a partir de crescimento de 18 a 24 horas obtido em ágar MacConkey. Para controle de qualidade do teste foi utilizada a cepa *E. coli* ATCC 25922 com os critérios preconizados pelo documento M100-S20 do CLSI [138].

3.6 Detecção de genes que codificam ESBLs e carbapenemases:

Para extração do DNA foi transferida uma colônia isolada obtida de crescimento recente para tubo com 100 µl de água destilada estéril, e a suspensão resultante foi incubada 95°C por 10 minutos. A suspensão foi centrifugada a 12.000 g por cinco minutos e o sobrenadante foi utilizado nas reações de PCR. Para as reações de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos listados na Tabela 3 ou Tabela 4. Todos os iniciadores foram retirados da publicação de Dallenne e colaboradores [50]. As reações de PCR tiveram volume final de 20 µl e foram realizadas com as seguintes concentrações finais: MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 100µM, tampão da PCR 1x (Tris-HCl 50 mM pH 8,3 e KCl 50 mM); 0,2 a 0,5 pmol/µl de cada iniciador e 0,4 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação foi realizada nas seguintes condições, exceto para o multiplex para pesquisa de *bla*_{KPC} com anelamento a 55 °C e para *bla*_{GES} anelamento a 57 °C: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min; 30 ciclos de 94 °C por 40 s, 60° C por 40 s e 72 °C por 1 min; e extensão final a 72 °C por 7 min [50]. Visando avaliar a qualidade do DNA utilizado, na reação multiplex par genes que codificam IMP, VIM ou KPC, foram adicionados os iniciadores específicos para o gene *rrs* (rRNA 16S). Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose contendo 8 µl de solução de GelRed para cada 100 ml de agarose, utilizando uma escala de 100 bp (Invitrogen) como referência. O gel foi fotografado sob luz ultravioleta e analisado quanto à presença de amplicons com tamanho semelhante àqueles listados nas Tabelas 4 e Tabela 5.

Em função do tamanho do produto amplificado obtido, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para cada gene.

Tabela 4 – Iniciadores Utilizados para Detecção de Genes que Codificam ESBLs

Reação	Iniciador	Sequência 5' - 3'	Produto amplificado	Concentração na reação (pmol/μl)
Multiplex TEM/SHV/OXA	TSO-T-fw	CATTTCGTGTCGCCCTTATTC	800	0,4
	TSO-T-rv	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
	TSO-S-fw	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713	0,4
	TSO-S-rv	ATCCCGCAGATAAATCACCAC		
	TSO-O-fw	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564	0,4
	TSO-O-rv	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG		
Multiplex CTX-M 1, 2, 3,9, 14 e 15	MultiCTXMGp1_for	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	688	0,2
	MultiCTXMGp1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	404	0,2
	MultiCTXMGp2_for	CGTTAACGGCACGATGAC		
	MultiCTXMGp1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	561	0,4
	MultiCTXMGp9_for	TCAAGCCTGCCGATCTGGT		
	MultiCTXMGp9_rev	TGATTCTCGCCGCTGAAG		
CTX-M grupo 8, 25, 26, 39, 41	CTX-Mg8/25_for	AACRCRCAGACGCTCTAC	326	0,4
	CTX-Mg8/25_rev	TCGAGCCGGAASGTGTAT		

Tabela 5 – Iniciadores Utilizados para Detecção de Genes que Codificam ESBLs ou Carbapenemases

Reação	Iniciador	Sequência 5' - 3'	Produto amplificado	Concentração na reação (pmol/μl)
Multiplex VEB, PER, GES	MultiGES_for	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	399	0,3
	MultiGES_rev	TTTGTCCGTGCTCAGGAT		
	MultiPER_for	GCTCCGATAATGAAAGCGT	520	0,3
	MultiPER_rev	TTCGGCTTGACTCGGCTGA		
	MultiVEB_for	CATTTCCCGATGCAAAGCGT	648	0,3
	MultiVEB_rev	CGAAGTTTCTTTGGACTCTG		
Multiplex IMP, VIM, KPC	MultiIMP_for	TTGACACTCCATTTACDG	139	0,5
	MultiIMP_rev	GATYGAGAATTAAGCCACYCT		
	MultiVIM_for	GATGGTGTTTGGTCGCATA	390	0,2
	MultiVIM_rev	CGAATGCGCAGCACCAG		
	MultiKPC_for	CATTCAAGGGCTTTCTTGCTGC	538	0,2
	MultiKPC_rev	ACGACGGCATAGTCATTTGC		
	rrs-27FW	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	1465	0,2
	rrs-1492RV	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T		

3.7 Sequenciamento de DNA:

A purificação do DNA para a reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o kit GFX (G&E Healthcare). Os produtos amplificados (45 µl) foram misturados a 250 µL de tampão de captura e a solução resultante foi transferida para tubo com coluna de sílica. Os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 30 s. Foram pipetados 250 µL de tampão de lavagem a cada coluna. Os tubos foram centrifugados 12.000 g por 30 s e a seguir a o tubo contendo as soluções coletadas foi descartado. A coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml a cada uma das colunas foram adicionados 30 µl de tampão de eluição. Após um minuto em temperatura ambiente as colunas foram centrifugadas a 16.000 g por 1 minuto. A concentração de DNA na amostra obtida após purificação foi determinada em equipamento NanoDrop (Uniscience). Quando necessário, a concentração da solução de DNA foi ajustada para 8,0 ng/µl adicionando-se tampão de eluição.

As reações de sequenciamento foram preparadas em placas de 96 tubos de 200 µL. Cada reação continha 2,0 µL de BigDye versão 3.1 (Applied Biosystems) 1,0 µL de tampão fornecido com o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction versão 3.1 (Applied Biosystems), 2,0 µL de solução de iniciador na concentração de 1,6 pmol/µL, e 5,0 µL de solução de DNA na concentração de 8ng/µL. As condições de sequenciamento foram: 5 min a 96 °C; 30 ciclos de 1 min a 96 °C, 30 s a 50 °C, e 4 min a 60 °C.

As reações foram precipitadas adicionando-se 1,0 µL de solução de acetato de sódio (3,0 M ; pH 4,6) e 25 µL de etanol absoluto. A mistura foi incubada à temperatura ambiente ao abrigo da luz por 15 minutos antes de centrifugação a 2.000 g por 45 minutos. A placa foi invertida sobre papel absorvente, e foi novamente centrifugada a 150 g por 1 minuto. Foram adicionados a cada tubo 150 µL de etanol a 70% antes de centrifugação a 2.000 g por 15 minutos. A placa foi

novamente invertida sobre papel absorvente e centrifugada a 150 g por 1 minuto. Foram adicionados 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) a cada tubo e a seguir a placa foi mantida ao abrigo da luz a -15°C até o momento de sua introdução no sequenciador.

Uma vez obtidos os eletroferogramas, a sequência consenso foi determinada utilizando-se o programa DNABaser. As sequências foram então comparadas com aquelas disponíveis no GenBank, utilizando o programa BLAST.

Para os isolados positivos para *bla_{KPC}* foram realizadas reações adicionais com os iniciadores descritos por Smith Moland et al. [123] de modo a seqüenciar toda a região codificante.

3.8 ERIC-PCR:

Os isolados produtores de betalactamases foram avaliados quanto à sua clonalidade. Foi utilizado o iniciador ERIC2 5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG [140], com algumas modificações [141]. O volume total da reação foi de 30 µL, com 100 µM de cada dNTP; 0,75 U de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen); 3,0 mM MgCl₂; tampão fornecido com a Taq na concentração final de 1X (Tris-HCl 50 mM pH 8,3 e KCl 50 mM); 0,2 µM do iniciador e 2,0 µl de solução de DNA obtida por lise térmica (95 °C por 10 minutos) de suspensão bacteriana equivalente ao padrão 1 da escala de MacFarland. A amplificação foi realizada com o seguinte protocolo: 94°C por 4 min, 45 ciclos de 1 min at 94 °C, 1 min a 45 °C, e 3 min a 70 °C e um ciclo de 70 °C por 10 min. O produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo 8,0 µl de solução de GelRed para cada 100 ml de agarose. A imagem obtida em sistema de transiluminação UV. Os

perfis obtidos foram comparados utilizando-se o programa Bionumerics (AppliedMaths).

3.9 Cálculo do valor preditivo positivo:

O valor preditivo positivo do teste de Jarlier, expresso em porcentagem, foi calculado segundo a equação abaixo, na qual VPP é o valor preditivo positivo, nVP é o número de verdadeiros positivos e nFP é o número de falsos positivos:

$$VPP = nVP \times 100 / nVP + nFP$$

4 RESULTADOS

4.1 Distribuição dos isolados segundo material clínico e espécie:

Do total de 141 isolados, 75,9% (107) corresponderam à espécie *E. cloacae* e 24,1% (34) corresponderam à espécie *E. aerogenes*. As amostras clínicas das quais mais frequentemente foram cultivados os isolados foram sangue, urina, secreção de ferida cirúrgica e cateter venoso, que consistiram em 75,9% do total das amostras (Figura 5).

Figura 5 – Distribuição dos isolados segundo o tipo de amostra clínica.

4.2 Distribuição dos isolados segundo a positividade para o teste de Jarlier (produção de ESBL) e concentração inibitória mínima para cefepima, ceftazidima e cefotaxima:

Um total de 32 isolados (22,7%) apresentou teste fenotípico positivo para a produção de ESBL, com distorção (aumento) do halo de inibição com um ou mais dos substratos. As distribuições de CIMs, para cada substrato, apresentaram superposição, não sendo, portanto, possível diferenciar isolados produtores de ESBL e não produtores de ESBL (Figuras 6, 7 e 8).

Caso o teste de Jarlier fosse considerado o padrão ouro para detecção de ESBL, e fosse utilizado o ponto de corte para sensibilidade preconizado pelo CLSI para cefepima ($\leq 8 \mu\text{g/ml}$), 13 de um total de 32 isolados (40,6%) seriam interpretados como sensíveis. Caso fosse utilizado o ponto de corte para sensibilidade ($\leq 1 \mu\text{g/ml}$) 3 em 32 isolados (9,4%) seriam considerados sensíveis pelo EUCAST (Figura 6).

Figura 6 – Distribuição dos isolados segundo produção de ESBL e concentração inibitória mínima para cefepima. Total de isolados ESBL positivo = 32 e total de isolados ESBL negativo = 109.

Para ceftazidima, caso o teste de Jarlier fosse considerado o padrão ouro para detecção de ESBL, e fosse utilizado o ponto de corte para sensibilidade preconizado pelo CLSI para ceftazidima ($\leq 4 \mu\text{g/ml}$), 2 de um total de 32 isolados (6,2%) seriam interpretados como sensíveis. Caso fosse utilizado o ponto de corte para sensibilidade ($\leq 1 \mu\text{g/ml}$) apenas 1 em 32 isolados (3,1%) seria considerado sensível pelo EUCAST (Figura 7).

Figura 7 - Distribuição dos isolados segundo produção de ESBL e concentração inibitória mínima para ceftazidima. Total de isolados ESBL positivo = 32 e total de isolados ESBL negativo = 109.

As CIMs para cefotaxima apresentaram-se em sua maioria absoluta igual ou maior que 256 µg/ml. O menor valor de CIM para cefotaxima apresentado por um isolado produtor de ESBL foi 4 µg/ml; portanto todos seriam classificados como resistentes (Figura 8).

Figura 8 - Distribuição dos isolados segundo produção de ESBL e concentração inibitória mínima para cefotaxima. Total de isolados ESBL positivo = 32 e total de isolados ESBL negativo = 109.

4.3 Valor preditivo positivo do teste de Jarlier:

Na amostragem analisada, o valor preditivo positivo foi de 46,9% para a presença de genes que codificam betalactamases de espectro ampliado, já descritos na literatura (Tabela 6).

4.4 Detecção de genes que codificam betalactamases de espectro ampliado:

As reações de PCR multiplex evidenciaram a presença de genes derivados de *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA} (Figura 9) e *bla*_{CTX-M} em 24 dos 32 isolados testados (Tabela 6).

Os derivados de *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA} e *bla*_{CTX-M} foram detectados em 56,3% (18), 18,7% (6), 15,6% (5) e 34,4% (11) dos isolados, respectivamente (Tabela 6).

O sequenciamento dos produtos amplificados de *bla*_{TEM} evidenciou substituições nas posições 228C→T e 396G→T, quando comparado com o depósito de referência de *bla*_{TEM-1} (GenBank J01749.1); entretanto são mutações silenciosas, pois há 100% de identidade entre as sequências de aminoácidos.

O sequenciamento dos produtos amplificados de *bla*_{SHV} evidenciaram a presença de *bla*_{SHV-12} nos isolados A0071667, A3140017 e 36080487, tendo havido 100% de similaridade com o depósito do GenBank CAI76927.1. Nos isolados 37120007, 40050440 e 98110731 (Tabela 6), o sequenciamento do fragmento de 780 pares de bases não permitiu a diferenciação entre *bla*_{SHV-11}, *bla*_{SHV-36}, com cujas sequências de aminoácidos houve 100% de similaridade (depósitos no GenBank AF47947.1 e Y_001335268.1).

O sequenciamento dos produtos de amplificação de derivados de *bla*_{OXA} evidenciou exclusivamente a presença de *bla*_{OXA-1} (Tabela 6), tendo havido 100% de similaridade entre as sequências obtidas e aquela disponível no GenBank no depósito GU189577.2.

A qualidade das sequências obtidas para os derivados de *bla*_{CTX-M-8} e o tamanho das sequências obtidas para os derivados de *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-2} não permitiram a diferenciação entre as variantes, mas permitiram tratar-se de variante de *bla*_{CTX-M} (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição dos isolados positivos para o teste de Jarlier, segundo perfil de sensibilidade e presença de genes que codificam betalactamases

Registro	Espécie	FEP (µg/ml)	CAZ (µg/ml)	CTX (µg/ml)	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM} + OXA + SHV	ERT (mm)	<i>bla</i> _{KPC}
97200020	<i>E. aerogenes</i>	32	64	>256	CTX-M-g2	TEM-1	24	neg
98271800		64	8	>256	CTX-M-g8	TEM-1	31	neg
81220210		16	8	64	neg	TEM-1	6	neg
55160148		8	64	256	neg	neg	25	neg
A3190971		1	256	256	neg	neg	18	neg
98110731		256	256	256	neg	TEM-1 e SHV-like	6	KPC-2
A3040350		64	32	>256	neg	neg	6	neg
A8271144		>256	>256	>256	neg	neg	6	KPC-2
A7180855		>256	>256	>256	neg	TEM-1	6	neg
37120007		2	64	32	CTX-M-g2	TEM-1 e SHV-like	25	neg
26090323	<i>E. cloacae</i>	2	128	32	CTX-M-g2	neg	25	neg
38130098		2	64	256	CTX-M-g2 e CTX-M-g8	TEM-1	16	neg
36080487		2	64	8	CTX-M-g8	TEM-1 e SHV-12	23	neg
44110586		4	1	16	CTX-M-g8	TEM-1	21	neg
A6030288		16	8	64	CTX-M-g8	TEM-1	27	neg
82230340		16	8	64	CTX-M-g8	TEM-1	25	neg
A3241597		0,5	256	64	CTX-M-g8	TEM-1	21	neg
99051754		64	8	>256	CTX-M-g9	TEM-1	22	neg
34190311		1	64	4	neg	TEM-1	22	Neg
A3140017		2	64	32	neg	TEM-1 e SHV-12	27	Neg
82200595		16	8	64	neg	TEM-1	24	Neg
27290364		2	128	64	neg	neg	19	Neg
49040086		4	2	256	neg	neg	22	Neg
83040785		16	16	256	neg	OXA-1	23	Neg
84060431		32	16	256	neg	TEM-1 e OXA-1	23	Neg
87010271		32	32	>256	neg	neg	22	Neg
A3060028		64	64	>256	neg	neg	20	Neg
32170561		64	64	>256	neg	TEM-1	11	Neg
40050440		2	256	>256	neg	SHV-like	22	Neg
A0071667		>256	>256	>256	neg	SHV-12	12	KPC-2
A3110360		>256	>256	>256	neg	TEM-1 e OXA-1	6	Neg
A3270973		>256	>256	>256	neg	TEM-1 e OXA-1	6	Neg

Legenda: FEP – cefepima; CAZ- ceftazidima; CTX – cefotaxima; ERT - ertapenem

4.5 Detecção de *bla*_{GES}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PER}:

Não foi detectada a presença de derivados de *bla*_{GES}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PER} em nenhum dos 32 isolados testados; entretanto foi possível obter apenas os controle positivos para *bla*_{GES}. Nesses houve amplificação de fragmento com aproximadamente 399 pares de bae quais foi (Figura 9).

Figura 9 – Perfil eletroforético de produtos de PCR multiplex para detecção dos genes *bla*_{GES}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PER}. 1 e 18 – Escala 1 kb plus (Invitrogen); 2 a 15 – isolados 26090323 a 83040785; 16 – cepa GES-1; cepa GES-2.

4.6 Modificação da PCR multiplex para *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC} e detecção de derivados de *bla*_{KPC}

A adição dos iniciadores *rrs*27FW e *rrs*1492RV não gerou bandas inespecíficas e permitiu comprovar a ausência de inibidores da PCR, assim como a qualidade do DNA utilizado para o teste. Houve amplificação do fragmento de aproximadamente 1465 pares de bases em todos os isolados negativos para *bla*_{KPC} (Figura 10). Não houve amplificação inespecífica do gene *rrs* no controle negativo. Na canaleta 6, referente ao controle positivo, é possível observar todos os fragmentos esperados amplificados: 1465 bp (*rrs*), *bla*_{KPC} (538 bp), *bla*_{VIM} (390 bp) e *bla*_{IMP} (139 bp).

O gene *bla*_{KPC} foi detectado em três dentre os 32 isolados analisados, sendo dois *E. aerogenes* e um *E. cloacae* (Tabela 6).

As sequências obtidas para os três isolados apresentaram 100% de identidade com a sequência de aminoácidos de KPC-2 (depósito GenBank EU784136.1). Este é o primeiro relato da detecção de *bla*_{KPC} em *E. aerogenes* e *E. cloacae* na cidade de São Paulo.

Figura 10 – Perfil eletroforético, de produtos de PCR multiplex para detecção dos genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* e *bla_{KPC}*, em gel de agarose a 1%. 1 e 8 – escala 1 kb plus (Invitrogen); 2- 97200020; 3 – 98271800; 4- 98110731; 5- A3190971; 6- mistura soluções de DNA extraídos das cepas padrão produtoras de KPC-2, VIM-1 e IMP-1; 7 – controle negativo da amplificação.

4.7 Clonalidade dos isolados:

A análise dos perfis gerados por ERIC-PCR evidencia grande diversidade clonal, exceto quanto a nove isolados pertencentes a quatro grupos clonais; portanto a amostragem não tem um viés significativo de clonalidade e as conclusões quanto

aos determinantes genéticos, com predomínio de *bla*_{SHV} e *bla*_{SHV} não são resultado de disseminação clonal.

Digno de nota, mas necessitando de comprovação por eletroforese de campos pulsados, dois isolados de *E. aerogenes*, um albergando o gene *bla*_{KPC} e outro não, tem perfis de ERIC-PCR indistinguíveis, sugerindo a aquisição de determinante genético móvel (Figura 11).

Figura 11. Perfis eletroforéticos dos produtos de amplificação obtidos por ERIC-PCR. 1- escala 1kb plus (Invitrogen); 2- *E. aerogenes* 98110731 (*bla*_{KPC} positivo); 3- *E. aerogenes* 98271800 (*bla*_{KPC} negativo).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisadas 141 isolados do gênero *Enterobacter* quanto ao perfil de sensibilidade à cefalosporinas de terceira e quarta gerações e produção de ESBLs. Uma das suas limitações é quanto a amostragem, pois o montante analisado representa apenas parte do total de casos de IRAS do período de 2004 a 2010 e não a sua totalidade; entretanto consistem no grupo de isolados disponíveis no banco de microrganismo do Fleury Medicina Diagnostica. Apesar de todos os isolados terem sido cultivados de casos de IRAS, a taxa de resistência às cefalosporinas é superior àquela observada em estudos multicêntricos como o SENTRY[1]. Tratando-se de uma coleção de isolados não consecutivos não é possível estabelecer a prevalência de produção de ESBLs, o que seria interessante para avaliação de tendência ao longo desse período.

A mudança dos critérios interpretativos para as cefalosporinas de terceira geração, mas não para a cefepima, eximindo os laboratórios da necessidade de realizar o teste para detecção de ESBLs para a liberação e interpretação dos testes de sensibilidade de enterobactérias [135] tem gerado grande discussão, particularmente pela divergência em relação aos critérios europeus, que utilizam o valor de 1 µg/ml para todas as cefalosporinas de terceira e quarta gerações [137]. Este parece ser um critério mais seguro para permitir o uso desse fármaco em infecções por isolados produtores de ESBL, segundo resultados de simulações de ensaios de farmacodinâmicos e farmacocinéticos [142, 143]. Caso fossem aplicados os critérios preconizados pelo CLSI para o grupo produtor de ESBL deste estudo. Outro aspecto importante é que considerando a detecção de genes por PCR como o padrão ouro, nove em 15 isolados que albergam genes que codificam para betalactamases apresentaram CIM para cefepima igual ou inferior a 8 µg/ml, e seriam considerados sensíveis pelos critérios preconizados pelo CLSI [138].

Os critérios do EUCAST, sensível ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$, deixariam de detectar apenas três dentre 15 isolados com PCR positiva para genes que codificam ESBLs. Esses achados são compatíveis com outras publicações que estudaram a correlação entre CIMs para cefalosporinas de terceira e quarta gerações e presença de genes de resistência [144]. Um outro aspecto que tem sido discutido é o efeito inóculo, ou seja a elevação de CIMs quando a densidade bacteriana é maior do que a usualmente utilizada nos testes de sensibilidade *in vitro* de enterobactérias produtoras de ESBLs do tipo SHV, mas não com as demais ESBL; entretanto esses achados ainda não foram confirmados *in vivo* [145].

A nosso ver, apesar de a presença do mecanismo de resistência ser um fator a ser considerado, principalmente quanto à estabilidade do antimicrobiano utilizado no tratamento frente à hidrólise por betalactamases, a CIM e a identificação da espécie bacteriana são os dados microbiológicos mais importantes para a decisão terapêutica.

A revisão da literatura indexada com estudos realizados com isolados do Brasil evidencia um predomínio de cefotaximases e em segundo lugar a ocorrência de derivados de SHV-1. Nossos achados são consistentes com aqueles publicados quando da descrição da CTX-M-8, evidenciando a presença de do gene *bla*_{CTX-M-8} em *Enterobacter aerogenes* e *E. cloacae* detectados na cidade do Rio de Janeiro em 1996 [77]. Essa primeira publicação já evidenciava a presença do mesmo determinante em *Proteus mirabilis* e *Citrobacter amalonaticus*, sugerindo a disseminação de elementos genéticos móveis. Em nossa amostragem, tal como sugerido pela publicação de 2000, houve predomínio de derivados de *bla*_{CTX-M-8}. O achado no Brasil, em 1996 e sua descrição em 2000 anteciparam a ocorrência da grande disseminação de genes derivados de *bla*_{CTX-M} em todo o mundo [46].

O teste da disco-aproximação tem sido utilizado para a triagem fenotípica da produção de ESBL e varias publicações evidenciam sua alta sensibilidade. Neste

estudo o baixo valor preditivo positivo observado pode ser devido ao fato de que outras ESBLs não detectadas com os iniciadores utilizados possam estar presentes. A metodologia da detecção de novas betalactamases deve incluir a eletroforese de ponto isoelétrico de extrato protéico bacteriano, assim como ensaios de conjugação e ou transformação com plasmídios extraídos dos isolados a serem estudados, mas essas metodologias não fizeram parte da proposta deste estudo, sendo, portanto, uma de suas limitações.

A grande maioria dos isolados detectados são positivos pelo teste de Jarlier albergavam o gene *bla*_{TEM-1}, que no gênero *Enterobacter* tem localização plasmidial. Esse achado reforça a hipótese de que outros determinantes genéticos de betalactamases possam ser albergados por esses isolados, uma vez que é freqüente a presença de integrons em plasmídeos, que atuam como verdadeiras máquinas de capturas de genes de resistência [146]. Novos experimentos serão realizados para elucidar essa discrepância.

O gene *bla*_{KPC-2} foi detectado em três isolados, sendo, curiosamente, dois isolados da espécie *E. aerogenes*, que representava uma fração menor dos isolados. Estudo incluindo cepas de diferentes países evidenciou que variantes de um mesmo transposon albergavam o gene *bla*_{KPC-2} em diferentes plasmídeos. Essa evidência pode explicar a predominância de *bla*_{KPC-2} nos estudos realizados com amostras do Brasil [125, 127-129, 131, 132].

A ocorrência de dois isolados de *E. aerogenes* com perfis de ERIC-PCR indistinguíveis, isolados de pacientes atendidos em hospitais distintos, um deles isolado de amostra de urina e outro de uma ponta de cateter venoso central evidenciam a disseminação de um mesmo clone entre hospitais. Mais relevante para o entendimento da disseminação de elementos genéticos móveis é o fato de um dos isolados alberga os genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{TEM-1}, enquanto o outro isolado alberga apenas o gene *bla*_{TEM-1}. Esse achado pode indicar a presença de um

integron e a subsequente captura do gene *bla*_{KPC-2}, mas pode indicar também a presença de outro plasmídeo. Para a elucidação desses achados são necessários experimentos adicionais com seqüenciamento de integrons ou transposons.

Outro aspecto detectado neste trabalho foi a presença concomitante de diferentes genes que codificam betalactamases em um mesmo isolado. Foram observados isolados que albergam os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM}; *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}; *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}; *bla*_{OXA} e *bla*_{TEM}. Essas evidências podem corresponder à presença de múltiplos plasmídeos ou de integrons com múltiplos genes de betalactamases. A presença de diversos determinantes genéticos é um achado relativamente freqüente nos produtores de ESBL e evidenciam a ampla disseminação desses determinantes [146].

Diversas publicações tem evidenciado que disseminação de bactérias pertencentes a um mesmo clone é um dos indicadores de qualidade no controle das IRAS. Neste trabalho observado a identidade de perfis gerados por ERIC-PCR entre isolados cultivados de amostras pacientes internados em hospitais localizados na mesma região na cidade de São Paulo. Para que se pudesse ter uma idéia se este achado é pontual ou se existe uma significativa disseminação clonal o ideal seria a coleta prospectiva de todos os isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* dos dois hospitais para que pudesse ser avaliada corretamente a extensão da disseminação. Outro aspecto curioso é que a espécie produtora de KPC predominante no Brasil e no mundo é a *K. pneumoniae* enquanto que na região sul as evidências indicam a presença de *Enterobacter*. A comparação entre os isolados produtores de KPC de São Paulo e da região sul do Brasil poderia contribuir para o entendimento da disseminação dos genes *bla*_{KPC} no território nacional.

6 CONCLUSÕES

- Isolados do gênero *Enterobacter* com CIM igual ou inferior a 1 µg/ml para cefepima ou ceftazidima podem albergar genes que codificam para ESBLs;
- Os genes que codificam para ESBL, predominantes na amostragem, foram os derivados de *bla*_{CTX-M} e os derivados de *bla*_{SHV};
- Não foram detectados genes que codificam para ESBLs derivados de *bla*_{TEM}, *bla*_{PER} ou *bla*_{VEB};
- O valor preditivo positivo do método de Jarlier para detecção de ESBLs nessa amostragem de *E. cloacae* e *E. aerogenes* foi de 46,9% quando comparado com a detecção por PCR de genes já descritos na literatura;
- O gene *bla*_{KPC-2} foi detectado em três isolados, sendo duas *E. aerogenes* e uma *E. cloacae*, todas de um mesmo hospital;
- Avaliar a clonalidade de *E. cloacae* e *E. aerogenes* produtores de ESBL, por ERIC-PCR.

7 REFERÊNCIAS

- [1] Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis* 2004; 8: 25-79.
- [2] Septimus EJ, Kuper KM. Clinical challenges in addressing resistance to antimicrobial drugs in the twenty-first century. *Clin Pharmacol Ther* 2009; 86: 336-9.
- [3] Rice LB. The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr Opin Microbiol* 2009; 12: 476-81.
- [4] Apisarnthanarak A, Buppunharun W, Tiengrim S, Sawanpanyalert P, Aswapokee N. An overview of antimicrobial susceptibility patterns for gram-negative bacteria from the National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand (NARST) program from 2000 to 2005. *J Med Assoc Thai* 2009; 92 Suppl 4: S91-4.
- [5] Rossolini GM, Mantengoli E. Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 Suppl 6: 2-8.
- [6] Maragakis LL, Perencevich EN, Cosgrove SE. Clinical and economic burden of antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008; 6: 751-63.
- [7] Hawkey PM. The growing burden of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62 Suppl 1: i1-9.
- [8] Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother* 2009; 64 Suppl 1: i29-36.
- [9] Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* 2010.
- [10] James CE, Mahendran KR, Molitor A, Bolla JM, Bessonov AN, Winterhalter M, et al. How beta-lactam antibiotics enter bacteria: a dialogue with the porins. *PLoS One* 2009; 4: e5453.
- [11] Szabo D, Silveira F, Hujer AM, Bonomo RA, Hujer KM, Marsh JW, et al. Outer membrane protein changes and efflux pump expression together may confer resistance to ertapenem in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2833-5.

- [12] Bonomo RA, Tolmasky ME. Enzyme-Mediated Resistance to Antibiotics. 1st ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2007.
- [13] Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-76.
- [14] Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 Suppl 1: 42-52.
- [15] Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440-58, table of contents.
- [16] Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 5046-54.
- [17] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S16. 2006.
- [18] CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard-Seven Edition. 2006.
- [19] Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 867-78.
- [20] Fleming A. On the antibacterial action of *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 1929; 10: 226-36.
- [21] Fleming A. The story of penicillin. *J Am Inst Homeopath* 1946; 39: 154-7.
- [22] Hodgkin DC. The X-ray analysis of the structure of penicillin. *Adv Sci* 1949; 6: 85-9.
- [23] Murray RG, Francombe WH, Mayall BH. The effect of penicillin on the structure of staphylococcal cell walls. *Can J Microbiol* 1959; 5: 641-8.
- [24] Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Orr-Ewing J. Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet* 1940; ii: 226-28.

- [25] Suarez C, Gudiol F. [Beta-lactam antibiotics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27: 116-29.
- [26] Reeves DS, Bullock DW. The aminopenicillins: development and comparative properties. *Infection* 1979; 7 Suppl 5: S425-33.
- [27] Rolinson GN. Forty years of beta-lactam research. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 589-603.
- [28] Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 677-8.
- [29] Marchou B, Tran Van T, Armengaud M. Diffusion of ceftriaxone (Ro 13-9004/001) in the cerebrospinal fluid. Comparison with other beta-lactam antibiotics in dogs with healthy meninges and in dogs with experimental meningitis. *Chemotherapy* 1981; 27 Suppl 1: 37-41.
- [30] Hardin TC, Jennings TS. Cefepime. *Pharmacotherapy* 1994; 14: 657-68.
- [31] Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 160-201.
- [32] Walsh C. *Antibiotics: actions, origins, resistance*. 1st ed. Washington, D.C.: ASM; 2003.
- [33] Fernandez-Cuenca F, Rodriguez-Martinez JM, Martinez-Martinez L, Pascual A. *In vivo* selection of *Enterobacter aerogenes* with reduced susceptibility to cefepime and carbapenems associated with decreased expression of a 40 kDa outer membrane protein and hyperproduction of AmpC beta-lactamase. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 549-52.
- [34] Jaffe A, Chabbert YA, Semonin O. Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22: 942-8.
- [35] Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* 1965; 208: 239-44.
- [36] Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-51, table of contents.

- [37] Pitton JS. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Ergeb Physiol* 1972; 65: 15-93.
- [38] Matthew M, Hedges RW, Smith JT. Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1979; 138: 657-62.
- [39] Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11: 315-7.
- [40] Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 302-7.
- [41] Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 657-86.
- [42] Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, et al. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 1-4.
- [43] Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289: 321-31.
- [44] β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes [database on the Internet]2011 [cited 04/23/2011]. Available from: <http://www.lahey.org/Studies/>.
- [45] Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. *N Engl J Med* 2005; 352: 380-91.
- [46] Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1-14.
- [47] Bernard H, Tancrede C, Livrelli V, Morand A, Barthelemy M, Labia R. A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29: 590-2.
- [48] Bauernfeind A, Casellas JM, Goldberg M, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, et al. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella* Typhimurium. *Infection* 1992; 20: 158-63.

- [49] Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Ernst S, Casellas JM. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 509-13.
- [50] Dallenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 490-5.
- [51] Baraniak A, Fiett J, Hryniewicz W, Nordmann P, Gniadkowski M. Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in Poland. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 393-6.
- [52] Sturenburg E, Kuhn A, Mack D, Laufs R. A novel extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-23 with a P167T substitution in the active-site omega loop associated with ceftazidime resistance. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 406-9.
- [53] Danel F, Hall LM, Duke B, Gur D, Livermore DM. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1362-6.
- [54] Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM. OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1881-4.
- [55] Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM. OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 785-90.
- [56] Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM. OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 3117-22.
- [57] Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1637-44.
- [58] Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d' beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2859-63.
- [59] Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 104-14.

- [60] Poirel L, Bruderer T, Frei R, Bernabeu S, Graber P, Nordmann P. Multidrug-resistant *Providencia stuartii* expressing extended-spectrum beta-lactamase PER-1, originating in Kosovo. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1392-3.
- [61] Perilli M, De Santis F, Mugnaioli C, Rossolini GM, Luzzaro F, Stefani S, et al. Spread of Enterobacteriaceae carrying the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase gene as a chromosomal insert: a report from Italy. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 323-4.
- [62] Bahar G, Erac B, Mert A, Gulay Z. PER-1 production in a urinary isolate of *Providencia rettgeri*. *J Chemother* 2004; 16: 343-6.
- [63] Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Viallard JL, et al. A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3061-8.
- [64] Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 573-81.
- [65] Girlich D, Naas T, Leelaporn A, Poirel L, Fennewald M, Nordmann P. Nosocomial spread of the integron-located veb-1-like cassette encoding an extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 603-11.
- [66] Jiang X, Ni Y, Jiang Y, Yuan F, Han L, Li M, et al. Outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3 beta-lactamase in China. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 826-31.
- [67] Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant β -Lactamases. <http://www.lahey.org/studies/webt.asp>. Accessed 07/23/2007. [database on the Internet]2007 [cited 23/07/2007]. Available from: <http://www.lahey.org/studies/webt.asp>.
- [68] Picao RC, Santos AF, Nicoletti AG, Furtado GH, Gales AC. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 796-7.
- [69] Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Mamizuka EM, Cassettari VC, Matte GR, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum beta-lactamase gene variants bla(SHV-40), bla(TEM-116) and the class 1 integron-associated bla(GES-7) in Brazil. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 630-2.

[70] Ramphal R, Ambrose PG. Extended-spectrum beta-lactamases and clinical outcomes: current data. Clin Infect Dis 2006; 42 Suppl 4: S164-72.

[71] Thomson KS, Moland ES. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 3548-54.

[72] Wong-Beringer A, Hindler J, Loeloff M, Queenan AM, Lee N, Pegues DA, et al. Molecular correlation for the treatment outcomes in bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to ceftazidime. Clin Infect Dis 2002; 34: 135-46.

[73] Wong-Beringer A. Treating serious infections: focus on cefepime. Pharmacotherapy 2004; 24: 216S-23S.

[74] Wong-Beringer A. Therapeutic challenges associated with extended-spectrum, beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Pharmacotherapy 2001; 21: 583-92.

[75] Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, et al. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. Euro Surveill 2010; 15.

[76] Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez MM, Costa N, Korbenfeld D, et al. Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2864-7.

[77] Bonnet R, Sampaio JL, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, et al. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1936-42.

[78] Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, Labia R, et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2269-75.

[79] Corkill JE, Cuevas LE, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. SHV-27, a novel cefotaxime-hydrolysing beta-lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. J Antimicrob Chemother 2001; 47: 463-5.

[80] Nogueira KS, Higuti IH, Nascimento AJ, Terasawa LB, Oliveira S, Matos AP, et al. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. Braz J Infect Dis 2006; 10: 390-5.

- [81] Tollentino FM, Polotto M, Nogueira ML, Lincopan N, Neves P, Mamizuka EM, et al. High prevalence of bla(CTX-M) extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of bla(SHV-12), bla(SHV-31), bla(SHV-38), and bla(CTX-M-15) in Brazil. *Microb Drug Resist* 2011; 17: 7-16.
- [82] Lincopan N, Leis R, Vianello MA, de Araujo MR, Ruiz AS, Mamizuka EM. Enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1611-3.
- [83] Nogueira Kda S, Higuti IH, Nascimento AJ, Terasawa LB, Oliveira S, Matos AP, et al. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. *Braz J Infect Dis* 2006; 10: 390-5.
- [84] Ndugulile F, Jureen R, Harthug S, Urassa W, Langeland N. Extended spectrum beta-lactamases among Gram-negative bacteria of nosocomial origin from an intensive care unit of a tertiary health facility in Tanzania. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 86.
- [85] Power P, Radice M, Barberis C, de Mier C, Mollerach M, Maltagliatti M, et al. Cefotaxime-hydrolysing beta lactamases in *Morganella morganii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 743-7.
- [86] Baraniak A, Fiett J, Sulikowska A, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 151-9.
- [87] She D, Liu Y. [The expression of AmpC and extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of enterobacter cloacae and its impact on antibiotics susceptibility]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002; 82: 1355-8.
- [88] Park YJ, Park SY, Oh EJ, Park JJ, Lee KY, Woo GJ, et al. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases among chromosomal AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens* in Korea and investigation of screening criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51: 265-9.
- [89] Choi SH, Lee JE, Park SJ, Kim MN, Choo EJ, Kwak YG, et al. Prevalence, microbiology, and clinical characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, and *Morganella morganii* in Korea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007.
- [90] Manzur A, Tubau F, Pujol M, Calatayud L, Dominguez MA, Pena C, et al. Nosocomial Outbreak Due To Extended-Spectrum Betalactamase-Producing

Enterobacter cloacae in a Cardio-Thoracic Intensive Care Unit. J Clin Microbiol 2007.

[91] Yu WL, Cheng KC, Chi CJ, Chen HE, Chuang YC, Wu LT. Characterisation and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* isolated from a district teaching hospital in Taiwan. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 579-82.

[92] Hoffmann H, Sturenburg E, Heesemann J, Roggenkamp A. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in isolates of the *Enterobacter cloacae* complex from German hospitals. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 322-30.

[93] Lartigue MF, Fortineau N, Nordmann P. Spread of novel expanded-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in a university hospital in the Paris area, France. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 588-91.

[94] Schlesinger J, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Hammer-Munz O, Leavitt A, Gold HS, et al. Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacter* isolates obtained in Tel Aviv, Israel. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 1150-6.

[95] Canton R, Oliver A, Coque TM, Varela Mdel C, Perez-Diaz JC, Baquero F. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. J Clin Microbiol 2002; 40: 1237-43.

[96] Doucet-Populaire F, Ghnassia JC, Bonnet R, Sirot J. First isolation of a CTX-M-3-producing *Enterobacter cloacae* in France. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 3239-40.

[97] Andrade LN, Minarini LA, Pitondo-Silva A, Climaco EC, Palazzo IC, Medeiros MI, et al. Determinants of beta-lactam resistance in meningitis-causing *Enterobacteriaceae* in Brazil. Can J Microbiol 2010; 56: 399-407.

[98] Lopes AC, Veras DL, Lima AM, Melo Rde C, Ayala J. bla(CTX-M-2) and bla(CTX-M-28) extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105: 163-7.

[99] Minarini LA, Camargo IL, Pitondo-Silva A, Darini AL. Multilocus sequence typing of uropathogenic ESBL-producing *Escherichia coli* isolated in a Brazilian community. Curr Microbiol 2007; 55: 524-9.

[100] Fernandes SA, Paterson DL, Ghilardi-Rodrigues AC, Adams-Haduch JM, Tavechio AT, Doi Y. CTX-M-2-producing *Salmonella* Typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. *Microb Drug Resist* 2009; 15: 317-21.

[101] Picao RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2225-6.

[102] Minarini LA, Poirel L, Trevisani NA, Darini AL, Nordmann P. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65: 202-6.

[103] Warren RE, Ensor VM, O'Neill P, Butler V, Taylor J, Nye K, et al. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 504-8.

[104] Do Carmo Filho JR, Silva RM, Castanheira M, Tognim MC, Gales AC, Sader HS. Prevalence and genetic characterization of blaCTX-M among *Klebsiella pneumoniae* isolates collected in an intensive care unit in Brazil. *J Chemother* 2008; 20: 600-3.

[105] de Oliveira Garcia D, Doi Y, Szabo D, Adams-Haduch JM, Vaz TM, Leite D, et al. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1790-3.

[106] Picao RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3908-13.

[107] Veras DL, Alves LC, Brayner FA, Guedes DR, Maciel MA, Rocha CR, et al. Prevalence of the bla (SHV) Gene in *Klebsiella pneumoniae* Isolates Obtained from Hospital and Community Infections and from the Microbiota of Healthy Individuals in Recife, Brazil. *Curr Microbiol* 2011; 62: 1610-6.

[108] Dubois V, Poirel L, Demarthe F, Arpin C, Coulange L, Minarini LA, et al. Molecular and biochemical characterization of SHV-56, a novel inhibitor-resistant beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3792-4.

[109] Gales AC, Bolmstrom A, Sampaio J, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum beta-lactamase (ESBL) Isolated in Hospitals in Brazil. *Braz J Infect Dis* 1997; 1: 196-203.

- [110] Kiffer C, Hsiung A, Oplustil C, Sampaio J, Sakagami E, Turner P, et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis* 2005; 9: 216-24.
- [111] Minarini LA, Gales AC, Palazzo IC, Darini AL. Prevalence of community-occurring extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. *Curr Microbiol* 2007; 54: 335-41.
- [112] Martins IS, Moreira BM, Riley LW, Santoro-Lopes G. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection among renal transplant recipients. *J Hosp Infect* 2006; 64: 305-8.
- [113] Cassettari VC, Silveira IR, Balsamo AC, Franco F. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit linked to onychomycosis in a healthcare worker. *J Pediatr (Rio J)* 2006; 82: 313-6.
- [114] Pessoa-Silva CL, Meurer Moreira B, Camara Almeida V, Flannery B, Almeida Lins MC, Mello Sampaio JL, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: risk factors for infection and colonization. *J Hosp Infect* 2003; 53: 198-206.
- [115] Pessoa-Silva CL, Toscano CM, Moreira BM, Santos AL, Frota AC, Solari CA, et al. Infection due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype infantis in a neonatal unit. *J Pediatr* 2002; 141: 381-7.
- [116] Otman J, Cavassin ED, Perugini ME, Vidotto MC. An outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* species in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23: 8-9.
- [117] Von Dolinger Brito D, Matos C, Abdalla VV, Filho DA, Pinto Gontijo PF. An Outbreak of Nosocomial Infection Caused by ESBLs Producing *Serratia marcescens* in a Brazilian Neonatal Unit. *Braz J Infect Dis* 1999; 3: 149-55.
- [118] de Almeida VC, Pessoa-Silva CL, Sampaio JL, Gontijo Filho PP, Teixeira LM, Moreira BM. Genetic relatedness among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak isolates associated with colonization and invasive disease in a neonatal intensive care unit. *Microb Drug Resist* 2005; 11: 21-5.
- [119] Calbo E, Freixas N, Xercavins M, Riera M, Nicolas C, Monistrol O, et al. Foodborne nosocomial outbreak of SHV1 and CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and control. *Clin Infect Dis* 2011; 52: 743-9.

- [120] Silva N, Oliveira M, Bandeira AC, Brites C. Risk factors for infection by extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Salvador, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2006; 10: 191-3.
- [121] Bhavnani SM, Ambrose PG, Craig WA, Dudley MN, Jones RN. Outcomes evaluation of patients with ESBL- and non-ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species as defined by CLSI reference methods: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54: 231-6.
- [122] Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1151-61.
- [123] Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, Black JA, Lockhart TJ, Hossain A, et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 711-4.
- [124] Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 1349-56.
- [125] Seki LM, Pereira PS, de Souza MD, Conceicao MD, Marques EA, Porto CO, et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011.
- [126] Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and *in vitro* activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 128-32.
- [127] Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 333-4.
- [128] Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2702.
- [129] Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 265-8.

- [130] Beirao EM, Furtado JJ, Girardello R, Ferreira Filho H, Gales AC. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2011; 15: 69-73.
- [131] D'Alincourt Carvalho-Assef AP, Leao RS, da Silva RV, Ferreira AG, Seki LM, Asensi MD, et al. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68: 337-8.
- [132] Leao RS, Pereira RH, Folescu TW, Albano RM, Santos EA, Junior LG, et al. KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros* 2011; 10: 140-2.
- [133] Zavascki AP, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, et al. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34: 286-8.
- [134] Zavascki AP, Zoccoli CM, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting? *Int J Infect Dis* 2010; 14: e539-40.
- [135] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
- [136] CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Eighth Edition. CLSI document M07-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
- [137] EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters; Version 1.3. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; 2011.
- [138] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
- [139] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Tenth edition. CLSI document M02-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
- [140] Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 6823-31.

- [141] Davin-Regli A, Monnet D, Saux P, Bosi C, Charrel R, Barthelemy A, et al. Molecular epidemiology of *Enterobacter aerogenes* acquisition: one-year prospective study in two intensive care units. J Clin Microbiol 1996; 34: 1474-80.
- [142] Chin BS, Seo WY, Paterson DL, Potoski BA, Peleg AY. Cefepime MIC breakpoint resettlement in gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 337-8.
- [143] Roos JF, Bulitta J, Lipman J, Kirkpatrick CM. Pharmacokinetic-pharmacodynamic rationale for cefepime dosing regimens in intensive care units. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 987-93.
- [144] Kohner PC, Robberts FJ, Cockerill FR, 3rd, Patel R. Cephalosporin MIC distribution of extended-spectrum- β -lactamase- and pAmpC-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species. J Clin Microbiol 2009; 47: 2419-25.
- [145] Bedenic B, Beader N, Zagar Z. Effect of inoculum size on the antibacterial activity of ceftazidime and cefepime against *Klebsiella pneumoniae* strains producing SHV extended-spectrum β -lactamases. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 626-35.
- [146] Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. Clin Microbiol Infect 2008; 14 Suppl 1: 75-81.