UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo fenotípico e molecular de beta-lactamases de
espectro estendido e AmpC em enterobactérias isoladas de
pacientes com suspeita de meningite**

LEONARDO NEVES DE ANDRADE

Ribeirão Preto

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo fenotípico e molecular de beta-lactamases de
espectro estendido e AmpC em enterobactérias isoladas de
pacientes com suspeita de meningite**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de
Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientado: Leonardo Neves de Andrade

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini

Ribeirão Preto

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Andrade, Leonardo Neves de

Estudo fenotípico e molecular de beta-lactamases de espectro estendido e AmpC em enterobactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite.

85 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP - Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Darini, Ana Lúcia da Costa

1. Beta-lactamases (ESBL, AmpC). 2. Enterobactérias. 3. Meningite.

Autor: Leonardo Neves de Andrade

Título do trabalho: Estudo fenotípico e molecular de beta-lactamases de espectro estendido e AmpC em enterobactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios de pesquisa:

Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LEBEM) do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), onde foram realizados experimentos fenotípicos e moleculares, sob orientação da *Prof^a Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini*.

Laboratório de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto (IAL-RP), onde foi realizada a investigação microbiológica dos isolados deste trabalho, sob coordenação da *Pesquisadora Marta Inês Cazentini Medeiros*.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Vanda Corrêa Neves de Andrade e Ruy Teixeira de Andrade, e ao meu querido irmão, Breno Neves de Andrade, por toda paciência, apoio, orações, carinho e ensinamentos de uma vida. Dedico toda a essência que representa este trabalho a vocês. Meus eternos amigos e amores, minha família.

Agradecimentos

À Deus e todos os Santos por proteger, reger, guardar e iluminar meu caminho durante este trabalho.

À minha mãe Vanda Corrêa Neves de Andrade, o coração mais bondoso e cativante que conheço, pelas orações, ações e palavras de incentivo sempre. Ao meu pai Ruy Teixeira de Andrade, exemplo de pai e homem, pelo apoio em todos os momentos e de todas as formas. Ao meu irmão Breno Neves de Andrade, a paciência e braço direito de todos, pela amizade de sempre.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini, exemplo de competência, postura e sucesso profissional, meu profundo respeito e admiração. Muito obrigado pela oportunidade, confiança, conhecimento científico, amizade e orientação. Agradeço também pelo incentivo e compreensão durante todo o trabalho. É um prazer e uma honra fazer parte do LEBEM.

Aos amigos de pós-graduação e funcionários, André Pitondo-Silva, Eduardo Clímaco, Izabel Palazzo, Joseane Ferreira, Luciene Minarini, Nathália Trevisani, Rubens Silva, Renata Galetti, Daniela Takata, Paulo Minarini, Amanda Rehder e Priscila Henrique, muito obrigado pelas preciosas sugestões, críticas, discussões científicas, apoio nos experimentos, suporte técnico, amizade, bom humor, excelente convívio e momentos de alegria contagiante que tornaram um prazer os dias de trabalho no laboratório.

À Marta Inês Cazentini Medeiros, Pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, muito obrigado pela atenção, apoio científico e amizade durante todo o trabalho.

Aos demais amigos do Laboratório de Microbiologia do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, Ana, Maria Cláudia, Jaqueline, Paulo, Sílvia, Natalia e Patrícia competentes e eficientes no diagnóstico microbiológico. Foram muitos momentos de aprendizagem profissional e de vida. Sinceros agradecimentos pelos ensinamentos e amizade.

Ao Dr Carmo Elias Andrade Melles, na época, Coordenador Nacional do Centro de Referência Nacional de Meningites - Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, pelas importantes considerações no início do trabalho e amizade.

A Dr^a Daisy Nakamura Sato, Pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, pelos ensinamentos científicos, pelas palavras de sabedoria, pelas portas abertas em meu caminho, e pelo prazer e honra da amizade da pesquisadora mais humana e de mais caráter que já conheci. Muito obrigado por tudo.

Ao Dr Carlos Henrique Gomes Martins, Professor da Universidade de Franca, pelos ensinamentos científicos, pelos valiosos conselhos, pelas portas abertas em meu caminho, e pelo prazer e honra da amizade do professor que me inspirou a escolher a microbiologia para atuar profissionalmente. Muito obrigado por tudo.

À Tatiane Cruz de Carvalho, pelo apoio, carinho e bons momentos.

À Sueli Maia Gerace, do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, por todo apoio, incentivo, exemplo de hombridade e amizade. Muito obrigado por tudo.

Ao Prof Dr Wilson de Araújo da Silva Junior e Adriana Aparecida Marques, do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática da FMRP-USP, pela atenção e competência nos experimentos de seqüenciamento realizados nas dependências da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da FCFRP-USP pela atenção, paciência e competência nos serviços prestados.

A Dr^a Juliana Pfrimer Falcão, Professora da FCFRP-USP, e ao Dr Roberto Martinez, Professor da FMRP-USP pela valiosa contribuição no exame de qualificação do mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Sorologia e Microbiologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, pelo apoio nos momentos difíceis, pela amizade e aprendizado. A contribuição de vocês foi de extrema importância para a realização deste trabalho. Muito obrigado por tudo.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“Um raciocínio lógico leva você de
A a B. A imaginação leva você a
qualquer lugar que quiser”
(Albert Einstein)*

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de abreviaturas e siglas	iii
Lista de símbolos	v
Lista de tabelas.....	vi
1. Introdução.....	1
1.1. Meningite	2
1.2. Enterobactérias	4
1.3. Resistência bacteriana aos antibióticos	7
1.4. Beta-lactamases	8
1.4.1. Beta-lactamases de espectro estendido	11
1.4.1.1. TEM e SHV.....	13
1.4.1.2. IRT	14
1.4.1.3. CTX-M.....	14
1.4.1.4. Outras ESBL	16
1.4.1.5. OXA	17
1.4.2. Beta-lactamases AmpC	18
1.5. Detecção de Beta-lactamases	20
1.5.1. Beta-lactamases de espectro estendido	20
1.5.2. Beta-lactamases AmpC	22
1.6. Detecção molecular de beta-lactamases	23
2. Objetivos	24
2.1. Objetivo geral.....	25

2.2.	Objetivos específicos	25
3.	Material e Métodos	26
3.1.	Isolados bacterianos	27
3.2.	Linhagens-controle.....	29
3.3.	Armazenamento dos isolados bacterianos.....	30
3.4.	Triagem e detecção fenotípica de beta-lactamases.....	31
3.4.1.	Triagem das enterobactérias.....	31
3.4.2.	Detecção fenotípica da produção de ESBL.....	31
3.5.	Detecção molecular de beta-lactamases	32
3.6.	Seqüenciamento	36
3.7.	Conjugação.....	37
3.8.	Determinação da concentração inibitória mínima.....	37
4.	Resultados	41
5.	Discussão	46
6.	Conclusões.....	55
7.	Referências.....	58
	 Apêndice	 74
	Anexos	79

Resumo

ANDRADE, L.N. **Estudo fenotípico e molecular de beta-lactamases de espectro estendido e AmpC em enterobactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite.** 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Membros da família *Enterobacteriaceae* podem causar meningite associada com infecções hospitalares e/ou secundárias. A terapia empírica utilizada em pacientes com suspeita de meningite é, às vezes, ineficiente, devido à produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), que é o mecanismo mais comum de resistência às cefalosporinas de amplo espectro em enterobactérias. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de ESBL e AmpC por enterobactérias isoladas de líquido céfalo-raquidiano e sangue de pacientes com suspeita de meningite da região de Ribeirão Preto, no período de 2000 a 2005. O teste do disco combinado foi utilizado para a detecção fenotípica e a PCR foi utilizada para amplificar genes codificadores de ESBL e AmpC. Três (6,52 %) das 46 enterobactérias isoladas no período estudado foram produtoras de ESBL e abrigavam o gene *bla*_{CTX-M-2}. As enterobactérias produtoras de ESBL foram: *S. marcescens* IAL 19, (isolada em Araraquara, 2002), *P. mirabilis* IAL 29 e *E. coli* IAL 45 (isoladas em Franca, respectivamente, 2003 e 2004). O gene *bla*_{CTX-M-2} foi detectado em três gêneros diferentes, sugerindo que o gene *bla*_{CTX-M} é endêmicos na região de Ribeirão Preto. Os dados obtidos por este trabalho são importantes porque existem poucos relatos sobre a produção de ESBL por enterobactérias isoladas de líquido céfalo-raquidiano e sangue de pacientes com suspeita de meningite.

Palavras-chave: Beta-lactamases (ESBL, AmpC); Enterobactérias; Meningite

Abstract

ANDRADE, L.N. **Phenotypic and molecular study of extended-spectrum beta-lactamases and AmpC in *Enterobacteriaceae* isolated from patients with suspicion of meningitis.** 2008. 85 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Members of *Enterobacteriaceae* family are cause of cause meningitis associated with nosocomial or secondary infection. The empiric therapy used in patients with suspicion of meningitis is, sometimes, inefficient due to extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing, that is the most common mechanism of resistance to cephalosporins in enterobacteria. The main objective of this study was to evaluate ESBL and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* isolated of cerebrospinal fluid and blood from patients with suspicion of meningitis from the region of Ribeirão Preto city, during 2000 to 2005. Combination disk method was used for phenotypic detection and PCR was used to amplify genes encoding ESBL and AmpC. Three (6.52 %) out of 46 enterobacteria isolated in the period studied were detected as ESBL-producing and harbored the *bla*_{CTX-M-2} gene. The ESBL-producing enterobacteria were: *S. marcescens* IAL 19, (isolated in Araraquara city – SP - Brazil, 2002), *P. mirabilis* IAL 29 e *E. coli* IAL 45 (isolated in Franca city – SP- Brazil, respectively, 2003 e 2004). The *bla*_{CTX-M-2} gene was detected in three different genera isolated for a long time, suggesting that the *bla*_{CTX-M-2} gene is endemic in the region of Ribeirão Preto city. The data generated by this study are important because there are low reports about ESBL-producing enterobacteria isolated of cerebrospinal fluid and blood from patients with suspicion of meningitis.

Keywords: Beta-lactamases (ESBL, AmpC); *Enterobacteriaceae*; Meningitis

Lista de abreviaturas e siglas

AMC	Amoxicilina com ácido clavulânico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonam
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CAZ	Ceftazidima
CFO	Cefoxitina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CPD	Cefpodoxima
CPM	Cefepime
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
DC	Teste do disco combinado (DC, do inglês Combination Disk Method)
DDS	Teste de aproximação de discos (DDS, do inglês <i>Double-Disk Screening</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ESBL	<i>Extended-spectrum beta-lactamase</i>
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
GEN	Gentamicina
IAL-RP	Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto
IPM	Imipenem
LCR	Líquido Céfaloraquidiano

LEBEM	Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular
NAL	Ácido nalidíxico
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
TBE	Tris borato EDTA
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
USP	Universidade de São Paulo

Lista de símbolos

%	Porcentagem
µg	Micrograma (s)
µL	Microlitro (s)
°C	Graus centígrados
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
M	Molar
mA	Miliampér (es)
mg	Miligramma (s)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
mM	Milimolar
n°	Número (s)
ng	Nanograma (s)
pmol	Picomol (s)
T	Timina
U	Unidade (s)
V	Volt (s)
X	Vez (es)

Lista de tabelas

Tabela 1 -	Classificação das principais beta-lactamases produzidas pelas enterobactérias.....	10
Tabela 2 -	Linhagens-controle utilizadas neste trabalho.....	29
Tabela 3 -	Reagentes para a realização da PCR.....	32
Tabela 4 -	Genes amplificados nas PCR, <i>primers</i> utilizados, temperaturas de <i>annealing</i> e tamanhos dos fragmentos amplificados.....	35
Tabela 5 -	Padrões interpretativos de diâmetros dos halos de inibição e <i>breakpoints</i> das CIM para antibióticos beta-lactâmicos, ácido nalidíxico, ciprofloxacina e gentamicina para enterobactérias.....	40
Tabela 6 -	Resultados do estudo fenotípico e molecular, determinação da CIM e estudo da transferência de resistência das enterobactérias que foram detectadas como produtoras de ESBL pelo DC.....	44
Tabela 7 -	Determinação da CIM para antibióticos frente às enterobactérias detectadas fenotipicamente, pelo DC, como produtoras de ESBL, transconjugantes e bactérias-controle dos experimentos.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1. Meningite

A meningite é um processo inflamatório das meninges e espaços adjacentes que envolvem o encéfalo e a medula espinhal. Apesar da causa mais comum ser infecciosa, alguns agentes químicos e mesmo células tumorais podem provocar meningite. A inflamação pode atingir, por contigüidade, estruturas do sistema nervoso central, constituindo: meningomielite, meningoencefalite ou meningo-mieloencefalite. Na terminologia médica corrente, tais situações são referidas somente pelo termo “meningite”. É uma patologia que acomete o sistema nervoso central, podendo progredir rapidamente, levando o paciente à morte ou causar seqüelas (BASHIR; LAUNDY; BOOY, 2003; TUNKEL, et al., 2004; TUNKEL; SHEL, 1993; WISPELWEY; TUNKEL; SCHELD, 1990).

Os agentes etiológicos responsáveis pela meningite infecciosa são: bactérias, vírus, fungos e protozoários (TUNKEL, et al., 2004; TUNKEL; SHEL, 1993; WISPELWEY; TUNKEL; SCHELD, 1990). A meningite infecciosa é de notificação compulsória nacional e de investigação epidemiológica imediata (BRASIL, 2006).

As principais vias de infecção constituem: (i) acesso direto por fraturas de crânio, em crianças com defeitos congênitos de fechamento do tubo neural e em infecções iatrogênicas causadas por punções líquóricas com agulhas contaminadas ou sem prévia anti-sepsia; (ii) infecções secundárias por contigüidade, a partir de estruturas próximas, geralmente otites médias, mastoidites ou sinusites e por via hematogênica, algumas bactérias, como *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae*, atingem o sistema nervoso central e (iii) por uso de cateteres de derivação líquórica ventriculoperitoneal (TUNKEL, et al., 2004; TUNKEL; SHEL, 1993; WISPELWEY; TUNKEL; SCHELD, 1990).

Neisseria meningitidis, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* sorotipo b são as bactérias mais freqüentemente isoladas de pacientes com suspeita de meningite e de

maior interesse em saúde pública, principalmente, pela possibilidade de causarem surtos ou epidemias na comunidade (BOISSON et al., 1999).

Meningite causada por enterobactérias geralmente está associada com infecções hospitalares e/ou secundárias a quadros de sepse, traumas cranianos, otites médias, etc. A doença decorrente de procedimentos neurocirúrgicos é uma complicação incomum, embora a frequência pareça estar aumentando. Infecções graves por enterobactérias, como sepse e meningite, limitam a escolha terapêutica, uma vez que a antibioticoterapia deve considerar a farmacodinâmica e farmacocinética das drogas nos sítios infectados e também porque muitas espécies possuem resistência intrínseca a várias classes de antibióticos (BINGEN et al., 1995; CHANG et al., 2000; KHAN, 2004; PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

As meningites bacterianas têm sua etiologia baseada na faixa etária e na provável via de infecção do agente. Em bebês até 3 meses de idade, as meningites são mais frequentes por *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae*, bactérias encontradas na região perineal da mãe, ocorrendo principalmente no período neonatal, seguidas por *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella* spp. e *S. pneumoniae*. Dos 4 meses aos 3 anos, há um predomínio de meningite por *H. influenzae* tipo b, bactéria que é transmitida por secreções nasofaríngeas. A partir de 4-5 anos a imunidade adquirida faz baixar a incidência, rara após os 10 anos, mas pode reaparecer em adultos por queda da imunidade. *N. meningitidis* e *S. pneumoniae* são também causadores de meningite nessa faixa etária. Dos 3 aos 10 anos, a bactéria predominante é *N. meningitidis*. Em períodos endêmicos, cerca de 15 % a 20 % da população alberga este agente. Meningite causada por *S. pneumoniae* também pode ocorrer nessa faixa etária. Após os 10 anos até idade adulta, predomina *S. pneumoniae*, em geral, associado com algum foco infeccioso (pneumonia lobar, otite média ou fraturas de crânio). *N. meningitidis* e *L. monocytogenes* são também causadores de meningite nessa faixa etária (TUNKEL, et al., 2004; TUNKEL; SHELD, 1993; WISPELWEY; TUNKEL; SCHELD, 1990).

Apesar dos avanços na antibioticoterapia, a meningite bacteriana é causa de elevadas taxas de morbidade e mortalidade em crianças, particularmente em recém-nascidos (ANOOP et al., 2003; ROMANELLI et al., 2002). A terapia utilizada em pacientes com suspeita de meningite é, comumente, realizada de forma empírica utilizando-se antibióticos beta-lactâmicos, como as cefalosporinas de 3ª geração e, às vezes, é ineficiente.

Por ser uma infecção grave, espera-se uma intervenção médica imediata. Na ausência de tratamento eficiente, a meningite bacteriana é, na maioria dos casos, fatal (BOISSON et al., 1999).

1.2. Enterobactérias

As enterobactérias são bacilos Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Possuem grande importância microbiológica e médica devido às infecções causadas, patogenicidade e ao surgimento de bactérias multirresistentes aos antibióticos utilizados na terapêutica (FARMER III; BOATWRIGHT; JANDA, 2007).

Os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia* são considerados de maior importância médica (ABBOTT, 2007; FARMER III; BOATWRIGHT; JANDA, 2007; NATARO et al., 2007; WANGER, 2007).

A maioria dos gêneros e espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* apresentam as seguintes propriedades: são bacilos Gram-negativos retos, não formam esporos, possuem motilidade peritríquia ou são imóveis, desenvolvem-se em peptona ou extrato de carne sem a adição de suplemento ou cloreto de sódio, como também em ágar MacConkey, são cultivadas em aerobiose ou anaerobiose, fermentam glicose e outros açúcares, reduzem

nitrito, contém antígenos comuns enterobacterianos, e têm 39 a 59 % de guanina-citosina (G-C) no DNA (FARMER III; BOATWRIGHT; JANDA, 2007).

Estas bactérias estão dispersas na natureza e podem ser encontradas em plantas, solo, água e microbiota normal do trato intestinal dos animais e seres humanos. Podem estar associadas com infecções comunitárias e hospitalares, oportunistas ou não. Muitas espécies são causadoras de infecções urinárias, intestinais, feridas cirúrgicas, abscessos, pneumonias, sepses e meningites (FARMER III; BOATWRIGHT; JANDA, 2007).

As enterobactérias constituem 80% dos isolados de bacilos Gram-negativos de importância médica e 50% das bactérias isoladas nos laboratórios de microbiologia. Estas bactérias são responsáveis por, aproximadamente, 50% dos casos de sepse, mais que 70% dos casos de infecção do trato urinário e uma porcentagem significativa de infecções intestinais (FARMER III; BOATWRIGHT; JANDA, 2007).

Diversas espécies da família *Enterobacteriaceae* são causa de infecções intestinais humanas e de animais, em todo o mundo. Embora outras espécies desta família têm sido associadas com diarreia, somente *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Yersinia* spp. têm sido claramente documentadas como patógenos entéricos (FARMER III; BOATWRIGHT; JANDA, 2007; NATARO et al., 2007; WANGER, 2007).

Exceto para espécies de *Shigella*, as quais raramente causam infecção fora do trato gastrointestinal, muitas espécies de enterobactérias causam infecções extra-intestinais. Infecção do trato urinário, principalmente cistite, é a mais comum, seguida por infecção respiratória, de ferida, sepse, e meningite (ABBOTT, 2007; FARMER III; BOATWRIGHT; JANDA, 2007; NATARO et al., 2007; WANGER, 2007).

Sepse causada por bactérias Gram-negativas está relacionada com crescente mortalidade de pacientes, quando comparada com infecções causadas por bactérias Gram-positivas. Diversos estudos têm relatado aumento da incidência de sepse causada por bactérias

Gram-negativas que, freqüentemente, apresentam resistência a várias classes de antibióticos (JANDA; ABOTT, 2005; KARLOWSKY et al., 2004; PFALLER et al., 1998).

Klebsiella spp., *E. coli* e *Enterobacter* spp. são as enterobactérias que freqüentemente causam meningite, resultando em alta taxa de mortalidade decorrente da patogenicidade e resistência aos antibióticos que essas bactérias possuem (KHAN, 2004; KIM, 2001; JANDA; ABOTT, 2005; PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

Proteus mirabilis também é um dos bacilos Gram-negativos mais encontrados em amostras clínicas, causando infecções na comunidade e em pacientes hospitalizados, tais como sepse e infecção urinária (ENDIMIANI et al, 2005; JANDA; ABOTT, 2005).

Serratia marcescens causa infecções oportunistas, tipicamente em pacientes com granulocitopenia e imunossuprimidos por doença ou terapia. Colonizações, complicações cirúrgicas e traumas também podem favorecer a infecção. A maioria dos casos de meningite por *S. marcescens* foi relatado em crianças (JANDA; ABOTT, 2005; THECCANAT, et al., 1991).

Citrobacter spp. compõe a microbiota normal do intestino humano, porém, causa episódios esporádicos e epidêmicos de meningite, com alta incidência de abscesso cerebral (ANOOP et al., 2003; JANDA; ABOTT, 2005).

A maioria das infecções, principalmente sepse e meningite, é adquirida no hospital e representa risco de morte. Devido à severidade dessas infecções, o rápido isolamento, identificação e teste de sensibilidade aos antibióticos dos isolados de enterobactérias é essencial (FARMER III; BOATWRIGHT; JANDA, 2007).

1.3. Resistência bacteriana aos antibióticos

A resistência aos antibióticos, entre os vários gêneros bacterianos, representa um problema de saúde pública mundial. Para alguns estudiosos, a situação atual caminha para o que foi vivenciado na era pré-antibiótico, uma vez que o surgimento de novos recursos terapêuticos não acompanha a evolução dos mecanismos de resistência (GRACE; WANG; DAVIES, 2006; PATERSON, 2006; RICE, 2006; SANDIUMENGE et al., 2006).

São diversos os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos, como: (i) produção de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico, (ii) alteração da permeabilidade da membrana que impede ou dificulta a penetração do antibiótico na célula, (iii) efluxo ativo de antibiótico e (iv) alteração do sítio alvo do antibiótico (BONOMO; TOLMASKY, 2007; PATERSON, 2006; RICE, 2006; TENOVER, 2006).

A resistência bacteriana aos antibióticos é um processo adaptativo que resulta de alguns eventos, como, mutações em genes que passam a conferir resistência e transmissão vertical e horizontal de genes de resistência, eventos estes que contribuem para que bactérias resistentes sejam selecionadas quando há pressão de antibióticos. Em função desses eventos, a emergência e disseminação de genes de resistência aos antibióticos tornaram-se um problema tanto hospitalar, como na comunidade (LIVERMORE; WOODFORD, 2006; RICE, 2006; SHAH, et al., 2004; SNYDER; CHAMPNESS, 2007).

A disseminação de genes conferindo resistência aos antibióticos pode ocorrer por transmissão vertical, ou seja, quando uma bactéria se divide todo seu genoma é duplicado originando uma nova célula idêntica, ou por transmissão horizontal, na qual bactérias de mesma espécie ou de espécies diferentes trocam genes de resistência por transferência de DNA através de processos como, conjugação, transdução, transformação e transposição

(FROST et al., 2005; SNYDER; CHAMPNESS, 2007; SNYDER; CHAMPNESS, 2007; THOMAS; NIELSEN, 2005).

Na transmissão horizontal, vários elementos genéticos estão associados com a mobilização de genes de resistência, como, seqüências de inserção, integrons, transposons e plasmídeos (FROST et al., 2005; SNYDER; CHAMPNESS, 2007; THOMAS; NIELSEN, 2005).

Mutação em genes que passam a conferir resistência aos antibióticos, a transmissão horizontal de genes de resistência, e a co-existência de genes que conferem resistência a diversos antibióticos em um mesmo elemento móvel, possibilitam a sobrevivência de bactérias sob pressão seletiva de diferentes classes de antibióticos (LIVERMORE; WOODFORD, 2006; RICE, 2006; SHAH, et al., 2004; SNYDER; CHAMPNESS, 2007).

1.4. Beta-lactamases

A resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos ocorre por diversos mecanismos, sendo a produção de enzimas beta-lactamases o de maior interesse em bactérias Gram-negativas. Estas enzimas agem catalisando a hidrólise do anel beta-lactâmico, inativando, assim, a ação de vários antibióticos pertencentes a este grupo (BABIC; HUJER; BONOMO, 2006; BONOMO; TOLMASKY, 2007; LIVERMORE, 1995; SAMAHAKFOURY; ARAJ, 2003; TURNER, 2005).

A primeira beta-lactamase mediada por genes cromossômicos foi relatada em *E. coli* antes mesmo da liberação da penicilina para tratamento de infecções bacterianas. Muitas bactérias Gram-negativas apresentam produção natural de beta-lactamases, mediada por genes cromossômicos. Essa produção de beta-lactamases, observada mesmo antes de a antibióticoterapia ser instituída na prática médica, deve-se, provavelmente, à pressão seletiva

exercida por microrganismos saprófitas, encontrados no solo, produtores de antibióticos beta-lactâmicos (BONOMO; TOLMASKY, 2007; BRADFORD, 2001; GRACE; WANG; DAVIES, 2006; JACOB, 2006).

A primeira beta-lactamase mediada por genes plasmideais em bactérias Gram-negativas, TEM-1, que hidrolisa ampicilina, foi descrita em *E. coli* na Grécia no início da década de 60. Poucos anos depois de sua descrição, a beta-lactamase TEM-1 disseminou-se por todo o mundo e agora é encontrada em outras enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa*, *H. influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*. Outra beta-lactamase encontrada em *E. coli* e em *K. pneumoniae* é a SHV-1, sendo mais freqüentemente mediada por genes plasmideais em *E. coli* e por genes cromossômicos em *K. pneumoniae* (BONOMO; TOLMASKY, 2007; BRADFORD, 2001; JACOB, 2006).

Nos últimos 60 anos, o uso sucessivo de novas gerações de antibióticos beta-lactâmicos tem selecionado sucessivas gerações de beta-lactamases, cada qual com espectro de hidrólise mais potente que a anterior (LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

Vários esquemas foram propostos para a classificação das beta-lactamases, porém, as duas classificações mais utilizadas são as de Ambler e a de Bush, Jacob e Medeiros (AMBLER, 1980; BUSH; JACOB; MEDEIROS, 1995). Ambler utilizou a homologia da sequência de nucleotídeos e aminoácidos para agrupá-las em quatro classes, designadas A, B, C e D. Bush, Jacoby e Medeiros também dividem as beta-lactamases em 4 grupos, denominados 1, 2, 3 e 4, possuindo subgrupos, relacionando características bioquímicas, enzimáticas e imunológicas, existindo inclusive, uma certa correlação entre essas duas classificações (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação das principais beta-lactamases produzidas pelas enterobactérias

Grupo Funcional ¹	Sub grupos ¹	Classe Molecular ²	Enzimas	Substrato	Inibição por ácido clavulânico ³	Enterobactérias	Localização ⁴
1	? ₅	C	Beta-lactamases AmpC	Todos os beta-lactâmicos, exceto cefalosporinas de 4ª geração e carbapenemas	R	Grupo CESP ⁵ , <i>M. morganii</i> , <i>H. alvei</i> , <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> spp., <i>K. pneumoniae</i>	Cr ou P
2	2b	A	Beta-lactamases de espectro restrito (TEM, TEM-1 e SHV-1)	Penicilinas e cefalosporinas	S	<i>Klebsiella</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>S. paratyphi</i>	Cr ou P
2	2be	A	Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)	Penicilinas, cefalosporinas, oxiamino-cefalosporinas e aztreonam	S	<i>Klebsiella</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> spp. e outras	P
2	2br	A	Beta-lactamases IRT	Penicilinas, cefalosporinas	R	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>P. mirabilis</i> , <i>C. freundii</i>	P
2	2d	D	Beta-lactamases (OXA)	Penicilinas, cefalosporinas, oxiamino-cefalosporinas e carbapenemas	S ou R	<i>E. coli</i> e outras	P
2	2e	A	Cefalosporinas	Cefalosporinas e aztreonam	S	<i>Proteus</i> spp.	Cr
2	2f	A	Carbapenemases (Serina-beta-lactamase)	Penicilinas, cefalosporinas, oxiamino-cefalosporinas, cefamicinas, aztreonam e carbapenemas	S	<i>K. pneumoniae</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>S. marcescens</i>	P
3	3a, 3b, 3c	B	Carbapenemase (Metallo-beta-lactamase)	Penicilinas, cefalosporinas, oxiamino-cefalosporinas, cefamicinas e carbapenemas	R	<i>K. pneumoniae</i> , <i>S. marcescens</i>	P
4		? ⁵	Enzimas que não se enquadram nos grupamentos citados		-	-	-

¹Segundo BUSH; JACOB; MEDEIROS, 1995; ²Segundo AMBLER, 1980; ³S: sensível; R: resistente; ⁴Cr: cromossômico; P: plasmideal; ⁵Não determinado; Grupo CESP: *C. freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. e *Providencia* spp.

Fonte: Baseado em AMBLER, 1980; BABIC; HUJER; BONOMO, 2006; BUSH, 2001; BUSH; JACOB; MEDEIROS, 1995; JACOB, 2006; LIVERMORE, 1995; LIVERMORE; WOODFORD, 2006; PATERSON, 2006; SHAH et al., 2004.

1.4.1. Beta-lactamases de espectro estendido

No início da década de 80, as cefalosporinas de 3ª geração (oxiamino-cefalosporinas), como a ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima e cefpodoxima, foram instituídas como alternativas terapêuticas para infecções graves, provocadas principalmente por bactérias Gram-negativas produtoras de beta-lactamases de espectro restrito como TEM, TEM-1 e SHV-1. Estáveis à hidrólise pelas beta-lactamases de espectro restrito, as cefalosporinas de 3ª geração ainda possuíam um amplo espectro de atividade antibacteriana e eram menos nefrotóxicas comparadas com aminoglicosídeos e polimixinas (BONOMO; TOLMASKY, 2007; BRADFORD, 2001; JACOB; BUSH, 2008; PATERSON; BONOMO, 2005).

Com a pressão seletiva do uso e abuso de cefalosporinas de amplo espectro, não surpreendentemente, a resistência a esses antibióticos emergiu rapidamente. Mutações nos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{TEM-1} e *bla*_{SHV}, que codificam as beta-lactamases de espectro restrito TEM, TEM-1 e SHV, conferiram um espectro de hidrólise estendido, codificando novas enzimas denominadas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês, *Extended Spectrum Beta-Lactamase*). A maioria das ESBL pertence à classe molecular A de Ambler e ao subgrupo funcional 2be de Bush, Jacob e Medeiros (BRADFORD, 2001; PATERSON; BONOMO, 2005).

A produção de ESBL por enterobactérias é o mecanismo de resistência mais comum aos antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro. A ação hidrolítica destas enzimas pode conferir, clinicamente, resistência a todas as penicilinas, cefalosporinas e ao aztreonam, no entanto, a sensibilidade às cefamicinas e carbapenemas geralmente é preservada. As ESBL são inibidas *in vitro* pelos inibidores de beta-lactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. As enterobactérias produtoras de ESBL geralmente apresentam sensibilidade *in*

vivo à combinação piperacilina-tazobactam (BRADFORD, 2001; PATERSON; BONOMO, 2005; RAMPHAL; AMBROSE, 2006).

Na Alemanha, em 1983, foram relatadas as primeiras *K. pneumoniae* e *S. marcescens* isoladas de amostras clínicas que eram resistentes à cefotaxima (KNOTHE et al., 1983). A análise destas bactérias demonstrou, posteriormente, que a resistência era devido à produção de uma beta-lactamase mediada por plasmídeo, derivada de SHV-1, sendo denominada SHV-2. Desde então, tem sido descrito, em todo mundo, um número crescente de enzimas com o fenótipo de ESBL, causando infecções esporádicas e surtos em hospitais e também na comunidade (COUDRON; MOLAND; SANDERS, 1997; KLIEBE et al., 1985; MINARINI et al., *in press*; MINARINI; GALES; DARINI, 2007; MINARINI et al., 2007a; MINARINI et al., 2007b; MIRELIS et al., 2003; PATERSON et al., 2003; PATERSON; BONOMO, 2005; PITOUT et al., 2005; SHAH et al., 2004; WINOKUR et al., 2001).

Entre 1997 e 1998, 433 bactérias isoladas de pacientes internados em centros de terapia intensiva no oeste e sudeste da Europa foram investigadas quanto à produção de ESBL, a qual foi detectada em 25 % de *Klebsiella* spp. Na América do Sul, especialmente no Brasil, Colômbia e Venezuela, ESBL tem sido encontrada em 30 a 60 % de *Klebsiella* spp. isoladas de pacientes internados em centros de terapia intensiva. Na África do Sul, a produção de ESBL, foi encontrada em 36,1 % de uma coleção de *Klebsiella* spp. isolada entre 1998 e 1999. ESBL tem sido encontrada também em Israel, Arábia Saudita e vários países do norte africano. Na Austrália, a produção de ESBL encontrada foi cerca de 5 % em *K. pneumoniae*. Na Ásia, entre 1998 e 1999, foi observada a produção de ESBL em 30,7 % de *K. pneumoniae* e 24,5 % de *E. coli* (BRADFORD, 2001; PATERSON; BONOMO, 2005).

Bactérias produtoras de ESBL freqüentemente abrigam plasmídeos que também carregam genes codificadores de resistência aos aminoglicosídeos e à sulfametoxazol-trimetoprima. Crescente número de relatos de plasmídeos carreando genes de resistência às

quinolonas e cefalosporinas de amplo espectro também têm sido observado. Ambas situações limitam muito o tratamento dos pacientes infectados por estas bactérias (COUDRON; HANSON; CLIMO, 2003; HANSON et al., 1999; KANG et al., 2004; MINARINI; GALES; DARINI, 2007; PATERSON; BONOMO, 2005; POIREL et al., 2006).

Infecções por enterobactérias produtoras de ESBL mostram aumento significativo na falha de tratamento e na mortalidade em comparação com não produtoras de ESBL, sendo um fator crítico para o gerenciamento da terapêutica de pacientes com infecções graves como sepse e meningite (BLOMBERG et al., 2005; ENDIMIANI, 2005; PATERSON; BONOMO, 2005).

1.4.1.1. Famílias TEM e SHV

Embora as ESBL da família TEM e SHV sejam mais frequentemente encontradas em *E. coli* e *K. pneumoniae*, elas também têm sido encontradas em outras enterobactérias, tais como, *K. oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Serratia* spp., *Salmonella* spp. e em bactérias Gram-negativas não-fermentadoras da glicose, como *Pseudomonas aeruginosa* (ESSACK et al., 2001; JACOB; BUSH, 2008; PATERSON; BONOMO, 2005; SPANU et al., 2002).

Surtos de bactérias produtoras de TEM (particularmente TEM-10, TEM-12 e TEM-26) e SHV foram recentemente descritos nos Estados Unidos. Relatos de *K. pneumoniae* no Chile e Argentina demonstraram a produção de SHV-2 e SHV-5. Curiosamente, ESBL TEM tem sido pouco relatada na América do Sul (PATERSON; BONOMO, 2005).

1.4.1.2. IRT

No início da década de 90 foram descobertas beta-lactamases que não eram inibidas pelos inibidores de beta-lactamases. Estas enzimas são variantes das beta-lactamases de espectro restrito TEM, TEM-1 e SHV-1 e foram as primeiras a receber a designação TEM resistente a inibidor (IRT, do inglês, *inhibitor-resistant TEM*), sendo assim classificadas na classe molecular A de Ambler, porém, no subgrupo funcional 2br de Bush, Jacob e Medeiros. No entanto, as IRT continuam sendo inibidas por tazobactam e, conseqüentemente, à combinação piperacilina-tazobactam (BRADFORD, 2001; CHAIBI et al., 1999; FIETT et al., 2000; JACOB; BUSH, 2008).

Embora as IRT não sejam ESBL, pois, possuem uma atividade hidrolítica insignificante contra cefalosporinas de amplo espectro, elas são freqüentemente abordadas com as ESBL por também serem derivadas de TEM e SHV. As IRT são encontradas principalmente em *E. coli*, mas também em alguns isolados de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* e *C. freundii* (BRADFORD, 2001; CHAIBI et al., 1999; FIETT et al., 2000).

1.4.1.3. Família CTX-M

Em 1989, na Alemanha, foi relatado um isolado de *E. coli* de amostra clínica que produzia uma nova ESBL, denominada CTX-M-1, que caracterizava-se pela maior capacidade de hidrolisar cefotaxima à ceftazidima (BAUERNFEID et al., 1990). No final da década de 80, houve uma epidemia de *Salmonella* spp. resistentes a altos níveis de cefotaxima na Argentina. Esta característica de resistência foi devido a uma ESBL posteriormente identificada e denominada CTX-M-2 (BAUERNFEIND et al., 1992). Posteriormente, várias outras ESBL com esta característica foram relatadas em várias partes do mundo,

caracterizando uma disseminação pandêmica dessas enzimas (BONNET, 2004; CANTÓN; COQUE, 2006).

As enzimas da família CTX-M hidrolisam cefalosporinas de amplo espectro como característica intrínseca da enzima e tem origem em genes cromossômicos de espécies de *Kluyvera* spp.. Característica particular da família CTX-M é que, ao contrário das famílias TEM e SHV, as enzimas CTX-M hidrolisam mais cefotaxima à cefatzidima. Além disso, essas enzimas são inibidas, *in vitro*, quase dez vezes mais pelo inibidor de beta-lactamase tazobactam do que pelo ácido clavulânico (BRADFORD, 2001; BUSH et al., 1993; PATERSON; BONOMO, 2005).

A família CTX-M é formada por aproximadamente 70 enzimas, que são separadas em cinco grupos, de acordo com a similaridade das seqüências de aminoácidos: grupo CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25. Entre as enzimas de um mesmo grupo, o percentual de identidade é igual ou superior a 94%, enquanto que, entre enzimas pertencentes a grupos diferentes esta percentagem é inferior a 90% (BONNET, 2004; JACOB; BUSH, 2008).

Genes codificadores das enzimas CTX-M têm sido encontrados em todas as enterobactérias, principalmente em *E. coli* e *K. pneumoniae*, mas também há relatos em *Acinetobacter baumannii*, *Vibrio cholerae* e *Aeromonas hydrophila* (BONNET, 2004; CANTÓN; COQUE, 2006; RADICE et al., 2002; VILLEGAS et al., 2004).

Bactérias produtoras de CTX-M têm sido relatadas em todo o mundo, porém a disseminação destas enzimas tem sido mais observada na Europa, Ásia e América do Sul. Fato curioso, é que nos Estados Unidos esta enzima é relatada em casos esporádicos. Algumas enzimas apresentam-se difundidas em certos países, como CTX-M-9 e CTX-M-14 na Espanha, CTX-M-1 na Itália e CTX-M-2 na Argentina. CTX-M-15 encontra-se disseminada

por todo o mundo (CANTÓN; COQUE, 2006; QUINTEROS, et al., 2003; RADICE et al., 2002; VILLEGAS et al., 2004).

No Brasil, foram estudadas 18 enterobactérias produtoras de ESBL entre 1998 e 1999, e as beta-lactamases da família SHV foram as predominantes nesse estudo, seguidas pelas beta-lactamases da família CTX-M. É importante salientar a grande variedade de CTX-M encontrada: CTX-M-2 em *P. mirabilis*, CTX-M-9 e CTX-M-16 em *E. coli* e CTX-M-8 em *Citrobacter amalonaticus*, *E. cloacae* e *Enterobacter aerogenes*. Deve-se ressaltar ainda, que os relatos das enzimas CTX-M-8 (BONNET et al., 2000a) e CTX-M-16 (BONNET et al., 2001) foram os primeiros no mundo. Posteriormente, foram relatadas outras enzimas CTX-M no Brasil, das quais, a mais prevalente é a CTX-M-2 (MINARINI *in press*; MINARINI et al., 2007a; MINARINI et al., 2007b, CLÍMACO et al., comunicação pessoal). Portanto, apesar do pequeno número de isolados estudados, os dados indicam que deve haver uma prevalência das enzimas CTX-M na América do Sul e no Brasil.

1.4.1.4. Outras ESBL

Outras enzimas foram descritas menos freqüentemente, como BES, PER, GES e VEB, porém, com importante ação hidrolítica sob cefalosporinas de amplo espectro (BRADFORD, 2001; JACOB, 2006; JACOB; BUSH, 2008; PATERSON; BONOMO, 2005).

BES possui 51 % de homologia com a penicilinase de *Yersinia enterocolitica* e 47 a 48 % de homologia com as enzimas CTX-M. A enzima BES foi relatada em *S. marcescens* no Brasil, exibindo alto nível de resistência ao aztreonam (BONNET et al., 2000b)

As enzimas PER possuem de 25 a 27 % de homologia com as enzimas TEM e SHV. PER-1 foi primeiramente relatada em *P. aeruginosa* e mais tarde em *Salmonella* spp. e *Acinetobacter* spp.. Na Turquia, em 46 % dos isolados hospitalares de *Acinetobacter* spp. e

11 % de *P. aeruginosa* foi encontrada a produção de PER-1. Essa enzima tem sido encontrada também em isolados de *P. mirabilis* e *Alcaligenes faecalis* na Itália, em *P. aeruginosa* na França, Itália e Bélgica e apresentando alta prevalência em *Acinetobacter* spp. na Korea. PER-2, que possui 86 % de homologia com PER-1, foi também relatada em *Salmonella* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *Vibrio cholerae* O1 El Tor. PER-2 tem sido somente descrita na América do Sul (BAUERNFEIND e at., 1996; PATERSON; BONOMO, 2005).

GES-1 possui 36 % de homologia com a carbenicilinase de *P. mirabilis*, todavia, não é intimamente relacionada com outras ESBL. GES foi relatada em *K. pneumoniae* na Guiana Francesa (BRADFORD, 2001; PATERSON; BONOMO, 2005; POIREL et al., 2000).

VEB-1 possui maior homologia com PER-1 e PER-2, porém, somente 38 %. O primeiro relato de VEB-1 foi em *E. coli* no Vietnã, mas, essa enzima foi subsequentemente encontrada em *P. aeruginosa* na Tailândia (BRADFORD, 2001; PATERSON; BONOMO, 2005; POIREL et al., 1999).

1.4.1.5. Família OXA

A maioria das beta-lactamases OXA não hidroliza cefalosporinas de amplo espectro, entretanto, algumas enzimas derivadas de OXA-10, hidrolisam, mesmo que fracamente, cefotaxima, ceftriaxona e aztreonam, conferindo resistência a esses antibióticos e fenótipo de ESBL. As beta-lactamases da família OXA apresentam baixa homologia, alta hidrólise de oxacilina e cloxacilina, além de serem pobremente inibidas por ácido clavulânico, o que as classificam diferentemente das famílias TEM, SHV, CTX-M, entre outras. Elas pertencem à classe molecular D de Ambler e ao grupo funcional 2d de Bush, Jacob e Medeiros. As ESBL OXA são encontradas principalmente em *P. aeruginosa* e menos frequentemente em enterobactérias (BRADFORD, 2001; JACOB; BUSH, 2008; PATERSON; BONOMO, 2005).

1.4.2. Beta-lactamases AmpC

As beta-lactamases AmpC são enzimas codificadas por genes de origem cromossômica denominados *ampC* (*bla*_{CMY}, *bla*_{LAT}, *bla*_{ACT}, *bla*_{MIR}, *bla*_{FOX}, *bla*_{MOX}, *bla*_{DHA}, *bla*_{ACC}, *bla*_{BIL}, etc) e produzidas por bactérias pertencentes ao informalmente chamado grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp.) e também *Proteus* spp., *Hafnia alvei*, *Morganela morganii*, *E. coli*, *Shigella* spp., *Aeromonas* spp. e *P. aeruginosa* (BONOMO; TOLMASKY, 2007; BRET et al., 1998, COUDRON; MOLAND; THOMSON, 2000; HANSON, 2003; PATERSON, 2006; PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002).

Bactérias que possuem gene *ampC* cromossômico produzem beta-lactamase AmpC em um nível basal, possuindo função fisiológica no metabolismo da parede celular, no entanto, essa característica confere diminuição de sensibilidade ou resistência às cefamicinas, como a cefoxitina. Essa característica intrínseca de resistência também confere diminuição de sensibilidade ou resistência às penicilinas, cefalosporinas de 1ª e 2ª geração e associações de antibióticos com inibidores de beta-lactamase (DIETZ; PFEIFLE; WIEDEMANN, 1997; LINDQUIST et al., 1989; LIVERMORE; WOODFORD, 2006; PÉREZ-PÉREZ, HANSON, 2002).

Em bactérias do grupo CESP e também *Proteus* spp., *Hafnia alvei*, *Morganela morganii* e *P. aeruginosa*, a resistência às cefalosporinas de 3ª geração pode ocorrer quando há hiperprodução de beta-lactamase AmpC. A hiperprodução pode ocorrer devido à indução, mediante a presença de alguns antibióticos beta-lactâmicos, como cefoxitina e imipenem, e por inibidores de beta-lactamases, como ácido clavulânico, que são fortes indutores, como também por cefalosporinas e aztreonam, que são fracos indutores. A hiperprodução ocorre na presença do agente indutor, que promove modificações na regulação da produção da enzima. Na ausência de exposição das bactérias a estes agentes indutores, a produção ocorre em níveis

basais na maioria dessas bactérias (LIVERMORE, 1995; LIVERMORE; WINSTANLEY; SHANNON, 2001). Em concentrações subinibitórias, a cefoxitina tem mostrado capacidade de induzir um aumento de 100 a 600 vezes a produção de beta-lactamase AmpC em *E. cloacae*, *C. freundii*, *P. stuartii*, *S. marcescens*, *M. morganii* e *P. aeruginosa* (JONES et al., 1997).

Quando hiperproduzida, a ação hidrolítica destas enzimas pode conferir, clinicamente, resistência a todas as penicilinas, cefalosporinas de 1^a, 2^a e 3^a geração, cefamicinas e ao aztreonam, no entanto, a sensibilidade às cefalosporinas de 4^a geração e aos carbapenemas é geralmente preservada (HANSON, 2003; PATERSON, 2006; PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002).

A hiperprodução de beta-lactamase AmpC pode ocorrer também por mutações em genes reguladores da produção da enzima. Há relatos de mutantes desreprimidos de *Enterobacter*, os quais perdem a capacidade de regulação dos genes que codificam essas enzimas, resultando em produção permanente de beta-lactamase AmpC (DIETZ; PFEIFLE; WIEDEMANN, 1997; HANSON, 2003; LINDQUIST et al., 1989; PATERSON, 2006; PÉREZ-PÉREZ, HANSON, 2002; SALADIN et al., 2002).

Uma diferença importante de *E. coli* e *Shigella* spp. em relação às outras enterobactérias e *P. aeruginosa*, que possuem gene *ampC* cromossômico, é que a hiperprodução da beta-lactamase AmpC, nos dois primeiros gêneros, não é induzida, e sim em decorrência de mutações ocorridas nos promotores dos genes que codificam as enzimas (COUDRON; MOLAND; THOMSON, 2000; HANSON, 2003; PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002).

A partir do final da década de 80, as beta-lactamases AmpC também foram detectadas em *K. pneumoniae* e *Salmonella* spp., as quais não possuem gene *ampC* cromossômico, sendo a produção da enzima, nessas bactérias, mediada por genes plasmideais.

Para explicar a expressão das enzimas AmpC, mediadas por genes plasmídeos, as hipóteses mais aceitas são a ausência de genes repressores e/ou modificações ocorridas nos promotores de genes *ampC* durante o processo de recombinação no plasmídeo, o que caracteriza a produção não induzida da beta-lactamase AmpC. Nos Estados Unidos têm sido relatados problemas significantes com *Salmonella* Newport, produtoras de CMY-2, isoladas de infecções em animais (COUDRON; MOLAND; THOMSON, 2000; HANSON, 2003; LIVERMORE; WOODFORD, 2006; PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002).

Enterobactérias e *P. aeruginosa* que possuem gene *ampC* cromossômico também podem adquirir gene *ampC* mediado por plasmídeo. Disseminação clonal de *P. mirabilis*, produzindo CMY-16 e causando infecção, foi relatada em quatro cidades da Itália. Alta taxa de ocorrência da produção de beta-lactamase AmpC mediada por plasmídeo foi relatada na Índia (BRET et al., 1998, COUDRON; MOLAND; THOMSON, 2000; HANSON, 2003; LIVERMORE; WOODFORD, 2006; PATERSON, 2006; PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002).

1.5. Detecção fenotípica de beta-lactamases

1.5.1. Beta-lactamases de espectro estendido

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), instituto internacional que padroniza normas para os testes de sensibilidade aos antibióticos, recomenda que *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli* que apresentarem sensibilidade diminuída para cefalosporinas de 3ª geração e/ou aztreonam, isto é, concentração inibitória mínima (CIM) aumentada (≥ 2 µg/mL), exceto para cefpodoxima (≥ 8 µg/mL) e/ou halo de sensibilidade diminuído para ceftazidima (≤ 22 mm) e/ou aztreonam (≤ 27 mm) e/ou cefpodoxima (≤ 17 mm) e/ou ceftriaxona (≤ 25 mm) e/ou cefotaxima (≤ 27 mm) sejam consideradas possíveis

produtoras de ESBL. O mesmo princípio é recomendado para *P. mirabilis* frente à ceftazidima (≤ 22 mm) e/ou cefotaxima (≤ 27 mm) e/ou cefpodoxima (porém, ≤ 22 mm), no entanto, esta recomendação é feita quando essa bactéria é isolada de amostras clínicas nobres, como sangue e líquido cefalo-raquidiano, devido à gravidade das infecções. Outras enterobactérias também podem produzir ESBL, no entanto, não há padronização pelo CLSI devido à interferência de outros mecanismos de resistência que podem estar presentes e dificultar a detecção fenotípica de ESBL (CLSI, 2007; LIVERMORE, 1995; LIVERMORE; BROWN, 2001).

Alguns testes fenotípicos têm sido propostos para a investigação laboratorial de ESBL, os quais são baseados na capacidade dos inibidores de beta-lactamase de impedir a atividade da enzima, como por exemplo, o teste de aproximação de discos e o teste do disco combinado.

O teste de aproximação de discos ou dupla difusão em ágar (DDS, do inglês *Double-Disk Screening*) é um teste de triagem laboratorial de ESBL. É realizado pela aproximação do disco de amoxicilina com ácido clavulânico aos discos de cefalosporinas de 3ª e 4ª geração e aztreonam, para verificar a formação de zona de sinergismo ou zona fantasma entre o halo de inibição da amoxicilina com ácido clavulânico e o halo das cefalosporinas e/ou aztreonam em enterobactérias possíveis produtoras de ESBL (JARLIER et al., 1988).

O teste do disco combinado (DC, do inglês *Combination Disk Method*) é um teste confirmatório para a detecção laboratorial de ESBL, utilizando discos das cefalosporinas de 3ª geração associadas com ácido clavulânico e os mesmos substratos sem o inibidor de beta-lactamase, disponíveis comercialmente. O DC é considerado positivo quando a diferença do diâmetro do halo de inibição da cefalosporina associada com ácido clavulânico e a medida do diâmetro do halo do mesmo substrato sem o inibidor de beta-lactamase for maior ou igual a 5

mm. Este critério é utilizado para confirmar a produção de ESBL (CARTER et al., 2000; CLSI, 2007).

1.5.2. Beta-lactamases AmpC

Apesar de não haver padronização e recomendação pelo CLSI para a detecção de beta-lactamases AmpC, a triagem pode ser realizada baseada na diminuição de sensibilidade à cefoxitina (halo ≤ 18 mm), e por testes fenotípicos, como o teste de antagonismo, teste de inibição da beta-lactamase AmpC, teste tridimensional modificado, teste de Hodge modificado, entre outros, no entanto, não possuem sensibilidade e especificidade ideais, sendo a detecção molecular o método de escolha (COUDRON; HANSON; CLIMO, 2003; COUDRON; MOLAND; THOMSON, 2000; ESCRIBANO et al., 2004; MANCHANDA; SINGH, 2003; NISHIDA et al., 1999; SANDERS; SANDERS, 1979; YONG et al., 2002).

A detecção da produção de beta-lactamase AmpC é importante em bactérias que não possuem gene *ampC* cromossômico, como *K. pneumoniae* e *Salmonella* spp., e, assim, quando apresentam produção dessa enzima, é por genes plasmídeos. Também, de interesse, são os mutantes desreprimidos como *Enterobacter* spp. que hiperproduzem beta-lactamase AmpC, bactérias que possuem gene *ampC* cromossômico e estão hiperproduzindo a enzima por indução ou mutação no promotor do gene, sendo essas situações associadas com resistência às cefalosporinas de 3ª e/ou geração e/ou aztreonam (CLSI, 2007; COUDRON; HANSON; CLIMO, 2003; COUDRON; MOLAND; THOMSON, 2000).

A resistência à cefoxitina em bactérias não produtoras de beta-lactamase AmpC pode ser explicada pelo envolvimento de outros mecanismos de resistência, como a perda de porina ou aumento da atividade de bomba de efluxo (HERNANDEZ-ALLES et al., 1999).

1.6. Detecção molecular de beta-lactamases

Métodos moleculares como a reação da polimerase em cadeia (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) que se baseiam na amplificação do DNA são utilizados no estudo de beta-lactamases (FLUIT et al., 2001; PITOUT; HOSSAIN; HANSON, 2004). O fragmento de DNA a ser amplificado é determinado por sequências iniciadoras (no inglês, *primers*), cadeias curtas de DNA que se ligam especificamente (no inglês, *annealing*) em regiões complementares à sua sequência. Podem ser utilizados *primers* específicos para cada gene (*bla*_{TEM-3}, *bla*_{SHV-2} e *bla*_{CTX-M-2}, etc) que codificam as diversas enzimas descritas (TEM-3, SHV-2, CTX-M-2, etc) ou, também pode ser realizada uma triagem inicial com *primers* específicos para cada família de genes para posterior purificação e sequenciamento do DNA (FLUIT et al., 2001; PITOUT; HOSSAIN; HANSON, 2004).

Estudos de caracterização molecular são altamente recomendáveis para a elucidação da epidemiologia e da origem genética destas enzimas. Esses dados são extremamente valiosos para o entendimento da mobilidade genética destes genes e para o controle da disseminação deste tipo de resistência (COUDRON; HANSON; CLIMO, 2003; HANSON et al., 1999; LIVERMORE; WOODFORD, 2006; POIREL et al., 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Estudar fenotipicamente e molecularmente a produção de ESBL e AmpC em enterobactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite da região de Ribeirão Preto, no período de 2000 a 2005.

2.2. Objetivos específicos

- Detectar fenotipicamente a produção de ESBL pelas enterobactérias.
- Avaliar a correlação da triagem com a detecção fenotípica de ESBL.
- Detectar e identificar genes codificadores de ESBL.
- Detectar e identificar genes codificadores de beta-lactamase AmpC mediados por plasmídeos.
- Avaliar a correlação da detecção fenotípica com a detecção molecular de ESBL.
- Verificar a transferência de genes codificadores de ESBL.
- Avaliar a epidemiologia da disseminação de genes de resistência codificando ESBL no período estudado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados bacterianos

Neste trabalho foram estudadas enterobactérias, produtoras de ESBL e outras possíveis beta-lactamases, isoladas de sangue e LCR de pacientes com suspeita de meningite, no período de 2000 a 2005, cujas investigações microbiológicas foram realizadas no Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto.

Os pacientes foram atendidos em hospitais e demais serviços de saúde dos municípios que fazem parte dos Departamentos Regionais de Saúde: III-Araraquara, V-Barretos, VIII-Franca e XIII-Ribeirão Preto, localizados na região nordeste do Estado de São Paulo, os quais possuem, como referência regional, o Instituto acima citado, o qual é responsável pelo diagnóstico e/ou confirmação laboratorial de meningites bacterianas.

Do total de 3.498 culturas realizadas de líquido céfalo-raquidiano (LCR) e sangue, 887 (25,35 %) apresentaram crescimento de microrganismos (bactérias e fungos). Destes, foram identificados 46 (5,18 %) enterobactérias, 27 (3,04 %) *H. influenzae*, 178 (20,06 %) *N. meningitidis*, 179 (20,18 %) *S. pneumoniae* e 457 (51,52 %) outros microrganismos, como estafilococos coagulase negativos, *Staphylococcus aureus*, bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose, bacilos Gram-positivos e *Cryptococcus* spp. (Anexo I).

As 46 enterobactérias isoladas foram identificadas como: 14 (30,43 %) *K. pneumoniae*, 2 (4,34 %) *K. oxytoca*, 12 (26,08 %) *E. coli*, 2 (4,34 %) *Enterobacter* spp., 5 (10,86 %) *E. cloacae*, 2 (4,34 %) *E. aerogenes*, 2 (4,34 %) *S. enteritidis*, 1 (2,17 %) *S. typhimurium*, 2 (4,34 %) *P. mirabilis*, 2 (4,34 %) *C. diversus* e 2 (4,34 %) *S. marcescens*. Do total de enterobactérias, 32 (69,56 %) foram isoladas de LCR e 14 (30,43 %) de sangue (Anexo II e III). As informações referentes aos pacientes com suspeita de meningite e respectivas enterobactérias isoladas estão apresentadas no Anexo II.

A investigação laboratorial das meningites bacterianas foi realizada de acordo com as Normas Técnicas para o Diagnóstico das Meningites Bacterianas (BRASIL, 1986). A identificação dos microrganismos isolados foi realizada por provas fenotípicas convencionais e o teste de sensibilidade aos antibióticos foi realizado por disco difusão de acordo com o padronizado pelo CLSI, no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto (CLSI, 2007; FARMER III; BOATWRIGHT; JANDA, 2007).

3.2. Linhagens-controle

A Tabela 2 demonstra as linhagens-controle, suas características e em quais experimentos foram utilizadas.

Tabela 2 – Linhagens-controle utilizadas neste trabalho

Linhagen-controle	Característica	Experimento
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	Produtora de ESBL	Triagem e detecção fenotípica da produção de ESBL
<i>E. coli</i> J62 (TEM-1) ^a	Produtora de TEM-1	PCR
<i>E. coli</i> J62 (TEM-2) ^a	Produtora de TEM-2	PCR
<i>E. coli</i> J53 (TEM-3) ^a	Produtora de TEM-3	PCR
<i>E. coli</i> J53 (TEM-9) ^a	Produtora de TEM-9	PCR
<i>E. coli</i> J53 (TEM-10) ^a	Produtora de TEM-10	PCR
<i>E. coli</i> J53 (SHV-1) ^a	Produtora de SHV-1	PCR
<i>E. coli</i> J53 (SHV-2) ^a	Produtora de SHV-2	PCR
<i>E. coli</i> J53 (SHV-4) ^a	Produtora de SHV-4	PCR
<i>E. coli</i> J53 (SHV-5) ^a	Produtora de SHV-5	PCR
<i>E. coli</i> RJ-15317 ^b	Produtora de CTX-M-2	PCR
<i>E. aerogenes</i> RJ-159835 ^b	Produtora de CTX-M-8	PCR
<i>E. cloacae</i> RJ-36546 ^b	Produtora de CTX-M-8	PCR
<i>E. coli</i> RJ-24694b ^b	Produtora de CTX-M-9	PCR
<i>P. vulgaris</i> ^c	Gene <i>ampC</i> (<i>cmv-2</i>)	PCR
<i>E. coli</i> pGL3 ^c	Gene <i>ampC</i> (<i>fox-1</i>)	PCR
<i>E. cloacae</i> 277 ^d	Gene <i>ampC</i> (<i>act</i>)	PCR
<i>M. morgannii</i> 89 ^d	Gene <i>ampC</i> (<i>dha</i>)	PCR
<i>Hafnia alvei</i> HC ^d	Gene <i>ampC</i> (<i>acc</i>)	PCR
<i>A. hydrophila</i> HC ^d	Gene <i>ampC</i> (<i>mox</i>)	PCR
<i>E. coli</i> J53 AzR	Resistente à azida sódica	Conjugação (receptora)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Padrão de sensibilidade	Determinação da CIM

^aLinhagens cedidas pelo Prof^o Dr^o David Livermore, Antibiotic Resistance Monitoring and Reference Laboratory, Londres, Inglaterra.

^bLinhagens cedidas pelo Dr^o Jorge Luiz Mello Sampaio, Laboratório Fleury Medicina Diagnóstica, São Paulo, Brasil. BONNET et al. 2000a.

^cLinhagens cedidas pelo Prof^o Dr^o Patrice Nordmann, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, Paris, França.

^dEste estudo.

3.3. Armazenamento dos isolados bacterianos

Após isolamento, identificação e realização do teste de sensibilidade aos antibióticos, as enterobactérias isoladas no período de 2000 a 2005 foram semeadas, para armazenamento, em tubos contendo meio de cultura TSA (do inglês, *Tryptic Soy Agar*) (Difco). Após incubação de 18 horas à temperatura de 36,5 °C, os tubos foram lacrados, armazenados ao abrigo da luz e mantidos em temperatura ambiente no Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto.

Para a realização da triagem e detecção fenotípica da produção de ESBL, as enterobactérias foram reativadas adicionando-se meio BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*) (Difco) ao tubo armazenado. Após 18 horas à 36,5 °C, foram semeadas em ágar Mac Conkey pelo método de esgotamento para obtenção de colônias isoladas, possibilitando, assim, a realização dos experimentos.

Também, as colônias isoladas em ágar Mac Conkey, foram semeadas em agar sangue de carneiro 5 % e, após 18 horas à 36,5 °C, foram transferidas para caldo BHI acrescido de 15 % de glicerol onde foram armazenadas à 4 °C, durante 1 hora, logo depois à - 20 °C também durante 1 hora e finalmente armazenadas à - 80 °C.

Quando necessário, alíquotas das culturas armazenadas à - 80 °C foram semeadas em ágar sangue de carneiro 5 % pelo método de esgotamento para obtenção de colônias isoladas. Após 18 horas à 36,5 °C as colônias isoladas foram submetidas aos experimentos subsequentes.

3.4. Triagem e detecção fenotípica de beta-lactamases

3.4.1. Triagem das enterobactérias

A triagem das enterobactérias consideradas possíveis produtoras de ESBL foi realizada utilizando-se o critério estabelecido pelo CLSI (2007) pelo acordo com o halo de sensibilidade diminuído para as cefalosporinas de 3^a geração. A triagem foi realizada para todas as enterobactérias, até para as espécies que não possuem padronização pelo CLSI.

A possível produção de ESBL também foi avaliada pelo DDS, colocando-se o disco de amoxicilina com ácido clavulânico a uma distância de 20 a 30 mm dos discos de ceftazidima e cefotaxima (cefalosporinas de 3^a geração), de cefepime (cefalosporina de 4^a geração) e do aztreonam (monobactam) (Cecon). Desta forma, foi verificada a formação da zona de sinergismo ou zona fantasma entre o halo de inibição da amoxicilina com ácido clavulânico e do cefepime e/ou ceftazidima e/ou cefotaxima e/ou aztreonam em enterobactérias possíveis produtoras de ESBL (JARLIER et al., 1988).

A triagem para produção de beta-lactamase AmpC mediada por plasmídeo foi realizada pelo halo de sensibilidade diminuído para cefoxitina (≤ 18 mm) (Cecon). No entanto, esta triagem foi realizada somente para *Klebsiella* spp. e *Salmonella* spp., bactérias que não possuem gene *ampC* cromossômico.

3.4.2. Detecção fenotípica da produção de ESBL

A confirmação da produção de ESBL foi realizada pelo DC para todas as enterobactérias estudadas com discos de cefalosporinas de 3^a geração (Oxoid): cefpodoxima, ceftazidima e cefotaxima associadas com ácido clavulânico e os mesmos substratos sem o

inibidor de beta-lactamase (Oxoid). O DC foi considerado positivo quando a diferença do diâmetro do halo de inibição da cefalosporina associada com o ácido clavulânico e a medida do diâmetro do halo do mesmo substrato sem o inibidor de beta-lactamase foi maior ou igual a 5 mm (CARTER et al., 2000; CLSI, 2007).

3.5. Detecção molecular de beta-lactamases

Os genes codificadores de beta-lactamases foram pesquisados por PCR. O DNA genômico bacteriano utilizado na PCR foi extraído segundo o método de Pitcher et al. (1989) e quantificado no “GeneQuant pro RNA/DNA calculator” (Amershan Biotech).

A PCR foi realizada utilizando reagentes para o volume de reação de 50 µL, descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Reagentes para a realização da PCR

Reagentes	Volume	Concentração final
Produto da extração de DNA (30 ng/µl)	2 µL	60 ng
Solução tamponante para PCR de Alta Fidelidade (10X) ^a	5 µL	1X
Mistura dos 4 nucleotídeos – dNTP Set (2,5 mM) ^b	4 µL	0,2 mM
<i>Primer</i> forward (16 pmol/µl) ^c	1,5 µL	24 pmol
<i>Primer</i> reverse (16 pmol/µl) ^c	1,5 µL	24 pmol
Sulfato de magnésio (50 mM) ^a	2,0 µL	2 mM
Platinum®Taq DNA Polymerase High Fidelity(5 U/µL) ^a	0,2 µL	1,0 U
Água duplamente processada W3500 “Qualidade PCR” ^d	q.s.p. 50 µl	—

^aInvitrogen; ^bEppendorf; ^cInvitrogen; ^dSigma

O termociclador utilizado para os experimentos foi o *Mastercycler Gradiente* (Eppendorf).

O DNA foi inicialmente desnaturado por aquecimento a 95 °C por 5 minutos. Em seguida o material foi submetido a 30 ciclos térmicos das etapas de desnaturação, *annealing* e extensão, nas seguintes condições:

- Desnaturação - 1 minuto à 95 °C.
- *Annealing* - 1 minuto à temperatura de *annealing* de cada par de *primer*.
- Extensão - 1 minuto à 72 °C.

Após 30 ciclos foi realizada uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Os genes amplificados nas PCR, *primers* utilizados, temperaturas de *annealing* e tamanhos dos fragmentos amplificados estão descritos na Tabela 4.

Os genes codificadores de ESBL foram pesquisados nas enterobactérias que apresentaram produção de ESBL, detectada pelo DC.

A detecção de genes das famílias TEM e SHV foi realizada utilizando pares de *primers* consenso, TEM-1f e TEM-1r, SHV-1f e SHV-1r, TEMf e TEMr e, SHVf e SHVr, que amplificam fragmentos de DNA de tamanhos diferentes (Tabela 4). Estes pares de *primers* amplificam genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, no entanto, para saber se trata-se de um gene codificador de ESBL ou beta-lactamase de espectro restrito, foi necessário o experimento de sequenciamento, pois, os pares de *primers* utilizados não são específicos para genes codificadores de ESBL.

A detecção dos genes da família *bla*_{CTX-M} foi realizada com o par de *primers* consenso CTX-M-_{1,2 e 9}f e CTX-M-_{1,2 e 9}r que amplifica genes codificadores de ESBL dos grupos CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-9. Também foi utilizado o par de *primers* consenso CTX-M-_{8 e 25}f e CTX-M-_{8 e 25}r que amplifica genes codificadores de ESBL dos grupos CTX-M-8 e CTX-M-25. Quando foram detectados genes da família *bla*_{CTX-M} com os *primers* consenso CTX-M-_{1,2}

e 9 foram também utilizados *primers* específicos que amplificam genes codificadores das enzimas dos grupos CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-9 (Tabela 4).

Para a detecção de genes das famílias *bla*_{BES}, *bla*_{PER}, *bla*_{GES} e *bla*_{VEB}, que codificam ESBL, foram utilizados pares de *primers* consenso para cada família (Tabela 4).

A pesquisa de gene *ampC* mediado por plasmídeo foi realizada nas enterobactérias que apresentaram halo de sensibilidade diminuído para cefoxitina (≤ 18 mm). No entanto, esta triagem foi realizada somente para *Klebsiella* spp. e *Salmonella* spp., bactérias que não possuem gene *ampC* cromossômico.

A pesquisa de gene *ampC* foi realizada por PCR multiplex (PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002). Foram utilizados 6 pares de *primers* consenso que amplificam os genes *bla*_{MOX-1}, *MOX-2*, *CMY-1*, *CMY-8* a *CMY-11*, *LAT-1* a *LAT-4*, *CMY-2* a *CMY-7* e *BIL-1*, *DHA-1*, *DHA-2*, *ACC*, *MIR-1T*, *ACT-1* e *FOX-1* a *FOX-5B* (Tabela 4).

Tabela 4 - Genes amplificados nas PCR, *primers* utilizados, temperaturas de *annealing* e tamanhos dos fragmentos amplificados

Gene amplificado	<i>Primers</i>	Seqüência de nucleotídeos (5'-3')	Temperatura de <i>annealing</i>	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>bla</i> _{TEM}	TEM f TEM r	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CGT G TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA G	55 °C	860	Spanu et al., 2002
<i>bla</i> _{TEM-1}	TEM-1 f TEM-1 r	GGG GAG CTC ATA AAA TTC TTG AAG AC GGG GGA TCC TTA CCA ATG CTT AAT CA	55 °C	~1100	Essack et al., 2001
<i>bla</i> _{SHV}	SHV f SHV r	ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG GTT AGC GTT GCC AGT GCT CG	58 °C	860	Spanu et al., 2002
<i>bla</i> _{SHV-1}	SHV-1 f SHV-1 r	GCC CGG GTT ATT CTT ATT TGT CGC TCT TTC CGA TGC CGC CGC CAG TCA	58 °C	1015	Essack et al., 2001
<i>bla</i> _{CTX-M} consenso (CTX-M- 1, 2 e 9)	CTX-M-1, 2 e 9 f CTX-M-1, 2 e 9 r	SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA CCG CRA TAT GRT TGG TGG TG	57 °C	544	Saladin et al., 2002
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 1 (CTX-M-1)	CTX-M- 1 f CTX-M-1 r	GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC AGC CGC CGA CGC TAA TAC A	53 °C	499	Pitout et al., 2004
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 2 (CTX-M-2)	CTX-M- 2 f CTX-M-2 r	ATG ATG ACT CAG AGC ATT CG TGG GTT ACG ATT TTC GCC GC	57 °C	866	Saladin et al., 2002
<i>bla</i> _{CTX-M} consenso grupo 8 e 25 (CTX-M-8 e 25)	CTX-M- 8 e 25 f CTX-M-8 e 25 r	CTG GAG AAA AGC AGC GGG GGA CCC ACG ATG TGG GTA GCC C	51 °C	581	Clímaco et al., comunicação pessoal
<i>bla</i> _{CTX-M} grupo 9 (CTX-M-9)	CTX-M- 9 f CTX-M-9 r	ATG GTG ACA AAG AGA GTG CA CCC TTC GGC GAT GAT TCT C	57 °C	870	Saladin et al., 2002
<i>bla</i> _{MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 a CMY-11}	MOXMF MOXMR	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	51 °C	520	Pérez-Pérez; Hanson, 2002
<i>bla</i> _{LAT-1 a LAT-4, CMY-2 a CMY-7 e BIL-1}	CITM f CITM r	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	51 °C	462	Pérez-Pérez; Hanson, 2002
<i>bla</i> _{DHA-1, DHA-2}	DHAM f DHAM r	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	51 °C	405	Pérez-Pérez; Hanson, 2002
<i>bla</i> _{ACC}	ACCM f ACCM r	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	51 °C	346	Pérez-Pérez; Hanson, 2002
<i>bla</i> _{MIR-1T, ACT-1}	EBCM f EBCM r	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	51 °C	302	Pérez-Pérez; Hanson, 2002
<i>bla</i> _{FOX-1 a FOX-5b}	FOXMF FOXMR	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	51 °C	190	Pérez-Pérez; Hanson, 2002
<i>bla</i> _{BES}	BES f BES r	CGG TGG TTG CTG GTG GTG ATA CTG TGC CAG TCT TGT CGC CT	61 °C	871	Este estudo
<i>bla</i> _{PER-1}	PER-1 f PER-1 r	GCT GTA GTT ACT GCC TCG AC GAC TCG GCT GAG TCT TTC AC	59 °C	818	Este estudo
<i>bla</i> _{PER-2}	PER-2 f PER-2 r	GTG TTT TCA CCG CTT CTG CT GAT TCA GCC GAA TCC TTG AC	57,3 °C	817	Este estudo
<i>bla</i> _{GES}	GES f GES r	GCG CTT CAT TCA CGC ACT ATT A CTA TTT GTC CGT GCT CAG GAT G	58,4 °C	862	Este estudo
<i>bla</i> _{VEB}	VEB f VEB r	CGG TAA TTT AAC CAG ATA GGA GT CAA CAT CAT TAG TGG CTG CT	55,3 °C	792	Este estudo

f: *forward*; r: *reverse*; S = C ou G; Y = C ou T; R = A ou G

Aos produtos de PCR foram adicionados 10 µL de solução de azul de bromofenol (33 % de glicerol, 0,05 % de azul de bromofenol em solução tamponante TBE 0,5X) e aplicados em gel de agarose a 1 %.

O marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas Life Sciences) foi aplicado no gel e a corrida eletroforética realizada a 90 V e 160 mA em solução tamponante TBE 0,5X utilizando-se fonte EPS 200 (Pharmacia Biotech).

O gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL) por 15 minutos e observado sob luz ultravioleta, utilizando-se o fotodocumentador AlphaImager (Alpha Innotech).

3.6. Seqüenciamento

Os produtos de amplificação obtidos para os genes codificadores de beta-lactamases foram purificados utilizando-se o *kit* de purificação GFX-TM PCR (Amershan Bioscience) e seqüenciados no MegaBACETM (Amershan Bioscience) (FLUIT et al., 2001).

Todas as etapas do seqüenciamento foram realizadas em microplacas de 96 poços. Para a etapa de amplificação, foram utilizados 1,0 µL de produto de PCR, 0,8 µL do *primer* (16 pmol/µL), 4,0 µL da solução de ET Dye Terminator (*kit* DYEnamicTM ET Dye Terminator, Amersham Bioscience) e água w-3500 (Sigma) suficiente para um volume final de 10,5 µL. O ciclo de amplificação utilizado foi: 20 segundos à 95 °C (desnaturação), 15 segundos à 50 °C (pareamento) e 1 minutos e 20 segundos à 60 °C (extensão), que foi repetido 30 vezes.

Em seguida o produto amplificado foi precipitado com acetato de amônio 7,5 M e etanol 95 % e seqüenciado no MegaBACETM (Amersham Bioscience). As seqüências obtidas foram analisadas no *software* ChromasPro versão 1.33 (Technelysium Pty LTDA) e

comparadas às seqüências disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>).

3.7. Conjugação

As enterobactérias produtoras de ESBL, detectadas pelo DC, foram submetidas à conjugação.

A conjugação foi realizada em caldo BHI (Difco) utilizando-se como receptora a linhagem *E. coli* J53 AzR, que apresenta resistência à azida sódica. Alíquotas de 0,2 mL de cada cultura da linhagem doadora e 0,8 mL da linhagem receptora, ambas em fase logarítmica de crescimento em caldo BHI, foram adicionadas a 4 mL de caldo BHI e incubadas a 36,5 °C, sem agitação. Os transconjugantes foram selecionados nos períodos correspondentes a 4, 8 e 24 horas de incubação em ágar MacConkey (Oxoid) acrescido de 2 µg/mL de cefotaxima (Aventis Pharma) e também 100 µg/mL de azida sódica (Mallinckrodt).

3.8. Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da CIM foi realizada para as enterobactérias que apresentaram produção de ESBL, detectada pelo DC, e para os transconjugantes obtidos no experimento de conjugação.

A determinação da CIM foi realizada em duplicata pelo método de diluição em ágar, como padronizado pelo CLSI (2005), utilizando-se os seguintes antibióticos beta-lactâmicos: cefoxitina (CFO), cefepime (CPM), ceftazidima (CAZ) e cefotaxima (CTX). Ácido nalidíxico (NAL), Ciprofloxacina (CIP) e gentamicina (GEN) foram também utilizadas para avaliar a resistência a estas classes de antibióticos.

Para cada antibiótico utilizado foi preparada uma solução inicial, cuja concentração foi calculada levando-se em consideração o volume que seria necessário, a potencia da droga e a adição posterior do meio de cultura. A fórmula descrita a seguir foi utilizada para a obtenção desses cálculos.

$$Q = \frac{C \times V}{\text{Pot}}$$

Q = peso do antibiótico (g)

C = concentração inicial do antibiótico, levando-se em consideração que o volume de meio de cultura necessário para cada placa é 20 mL (µg/mL).

V = volume de solução a ser preparada (mL)

Pot = potência da droga em µg/mg

Exemplo de cálculo para Ceftazidima:

$$Q = \frac{5.120 \times 5}{894,45} = 28,6 \text{ mg}$$

O solvente e diluente de cada antibiótico utilizado seguiu a padronização proposta pelo CLSI (2005).

O meio de cultura utilizado foi o ágar Mueller-Hinton (Difco). Uma série de diluições de cada antibiótico foi preparada, previamente, em tubos esterilizados, com volume de 1 mL em cada tubo. Uma alíquota de 19 mL do meio foi adicionada à série de diluições, que foram homogeneizadas e plaqueadas, obtendo-se concentrações de cada antibiótico que variaram de 256 a 0,03125 µg/mL.

A suspensão bacteriana de cada isolado foi preparada em solução fisiológica esterilizada equivalente à concentração de 0,5 da escala de McFarland, a partir de um

crescimento de 18-24 horas à 36,5 °C em placa de ágar sangue. As suspensões bacterianas preparadas foram diluídas 1:10 em solução fisiológica esterilizada e distribuídas em alíquotas de 100 µL nos 25 poços de um replicador de *Steers*. Uma alíquota correspondente a 2 µL de cada suspensão bacteriana foi depositada sobre a superfície do meio de cultura contendo a diluição do antibiótico, realizando-se o procedimento desde a placa controle (sem adição de antibiótico) até a placa contendo a maior concentração do antibiótico. As placas foram deixadas em fluxo laminar para secagem e, posteriormente, incubadas a 36,5 °C por 18 horas.

A CIM foi determinada como a menor concentração do antibiótico que inibiu completamente o crescimento bacteriano. Os *breakpoints* para os anitbióticos utilizados, para a família *Enterobacteriaceae*, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Padrões interpretativos de diâmetros dos halos de inibição e *breakpoints* das CIM para antibióticos beta-lactâmicos, ácido nalidíxico, ciprofloxacina e gentamicina para enterobactérias

Antibiótico	Conteúdo do disco	Diâmetro do halo de inibição (mm)*			Breakpoints das CIM (µg/mL)*	
		R	I	S	R	S
Beta-lactâmico-inibidor de beta-lactamase						
Amoxicilina-ácido clavulânico	20/10µg	≤13	14-17	≥18	≥32/16	≤8/4
Cefalosporinas de 3ª geração						
Cefpodoxima	10µg	≤17	18-20	≥21	≥8	≤2
Ceftazidima	30µg	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8
Cefotaxima ou Ceftriaxona	30µg	≤14	15-22	≥23	≥64	≤8
Cefalosporina de 4ª geração						
Cefepime	30µg	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8
Cefamicina						
Cefoxitina	30µg	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8
Monobactam						
Aztreonam	30µg	≤15	16-21	≥22	≥32	≤8
Carbapenema						
Imipenem	10µg	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4
Quinolona						
Ácido nalidíxico	30µg	≤13	14-18	≥19	≥32	≤8
Fluoroquinolona						
Ciprofloxacina	5µg	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1
Aminoglicosídeo						
Gentamicina	10µg	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4

*S: sensível; I: intermediário; R: resistente

Fonte: CLSI, 2007.

4. RESULTADOS

Das 46 enterobactérias estudadas, 38 (82,6 %) apresentaram diminuição de sensibilidade às cefalosporinas de 3ª geração e/ou aztreonam e foram consideradas possíveis produtoras de ESBL (halos sublinhados) (Apêndice I). Cinco (10,86 %) destas enterobactérias apresentaram resultado positivo pelo DDS (Tabela 6).

Do total de 38 enterobactérias, *K. pneumoniae* IAL 28, *K. pneumoniae* IAL 31 e *K. pneumoniae* IAL 38, que apresentaram diminuição de sensibilidade às cefalosporinas de 3ª geração e/ou aztreonam, também foram consideradas possíveis produtoras de beta-lactamase AmpC mediada por plasmídeo, devido à diminuição de sensibilidade ou resistência à cefoxitina (Apêndice I).

Foi detectada, por DC, a produção de ESBL em 5 enterobactérias, as quais foram: *K. oxytoca* IAL 11, *K. oxytoca* IAL 12, *S. marcescens* IAL 19, *P. mirabilis* IAL 29 e *E. coli* IAL 45. Todas essas enterobactérias foram triadas inicialmente como possíveis produtoras de ESBL de acordo com o halo de sensibilidade diminuído para cefalosporinas de 3ª geração e/ou aztreonam e pelo DDS (Tabela 6).

Os resultados da detecção molecular de genes codificadores da produção de beta-lactamases estão demonstrados na Tabela 6.

Exceto para *K. oxytoca* IAL 11, em todas as enterobactérias detectadas fenotipicamente como produtoras de ESBL, foi detectado gene codificador de beta-lactamase. Houve uma maior frequência dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}.

Não houve amplificação de genes *ampC* mediados por plasmídeo em *K. pneumoniae* IAL 28, *K. pneumoniae* IAL 31 e *K. pneumoniae* IAL 38.

Todos os fragmentos amplificados (genes detectados) foram seqüenciados e comparados com as seqüências disponíveis no *GenBank*. Os resultados da análise do seqüenciamento estão apresentados na Tabela 6.

Dos fragmentos amplificados e seqüenciados, os que apresentaram identidade com genes codificadores de ESBL foram os genes *bla*_{CTX-M-2}.

Todos os outros fragmentos amplificados e seqüenciados apresentaram identidade com genes codificadores de beta-lactamases de espectro restrito TEM-1 e SHV-1.

Foram obtidos transconjugantes de *S. marcescens* IAL 19, *P. mirabilis* IAL 29 e *E. coli* IAL 45, linhagens nas quais foi detectado gene *bla*_{CTX-M-2} codificador de ESBL CTX-M-2. Os transconjugantes foram nomeados com a designação da linhagem receptora utilizada no experimento, acrescentada do número referente à linhagem doadora. Não foram obtidos transconjugantes para *K. oxytoca* IAL 11 e *K. oxytoca* IAL 12, linhagens nas quais foi detectada fenotipicamente a produção de ESBL (Tabelas 6 e 7).

Para a confirmação dos estudos de transferência dos genes, foi realizada PCR com o objetivo de detectar os genes *bla*_{CTX-M} nas linhagens transconjugantes e análise do perfil de sensibilidade das linhagens receptora, doadora e transconjugante. Os genes *bla*_{CTX-M} detectados nas linhagens doadoras também foram detectados nas linhagens transconjugantes. Além disso, pela análise dos perfis de sensibilidade, as linhagens transconjugantes apresentaram CIM maior para cefalosporinas e gentamicina que a linhagem receptora *E. coli* J53 AzR, demonstrando transmissão horizontal de genes de resistência a partir das linhagens doadoras (Tabelas 6 e 7).

Na Tabela 7 estão demonstrados os valores da CIM para antibióticos beta-lactâmicos, ácido nalidíxico, ciprofloxacina e gentamicina frente às enterobactérias que apresentaram resultado positivo na detecção fenotípica da produção de ESBL. As CIM dos transconjugantes obtidos no experimento de conjugação também estão apresentadas na Tabela 7, assim como as bactérias-controle dos experimentos.

Tabela 6 – Resultados do estudo fenotípico e molecular, determinação da CIM e estudo da transferência de resistência das enterobactérias que foram detectadas como produtoras de ESBL pelo DC

Linhagem	Triagem e detecção fenotípica				Detecção molecular e identificação do gene <i>bla</i>		Determinação da CIM*								Transferência de resistência (conjugação)
	Triagem		Confirmação fenotípica	Detecção por PCR	Identificação por Sequenciamento										
	Halos diminuídos ou de Resistência		DDS			DC									
	AmpC	ESBL	ESBL			ESBL									
	CFO	Cfs 3ª g e ATM													
						CTX	CAZ	CPM	CFO	NAL	CIP	GEN	ESBL		
<i>K. oxytoca</i> IAL 11	-	+	+	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	-	
<i>K. oxytoca</i> IAL 12	-	+	+	+	<i>tem</i>	<i>tem-1</i>	S	S	S	S	S	S	S	-	
<i>S. marcescens</i> IAL 19	NA	+	+	+	<i>ctx-m</i> do grupo 2 e <i>tem</i>	<i>ctx-m-2</i> e <i>tem-1</i>	R	R	R	R	R	S	R	NA	
<i>E. coli</i> J53 AzR – 19	NA	+	+	+	<i>ctx-m</i> do grupo 2 e <i>tem</i>	<i>ctx-m-2</i> e <i>tem-1</i>	R	S	R	S	S	S	R	CTX, CPM e GEN	
<i>P. mirabilis</i> IAL 29	NA	+	+	+	<i>ctx-m</i> do grupo 2 e <i>tem</i>	<i>ctx-m-2</i> e <i>tem-1</i>	R	S	S	S	R	S	R	NA	
<i>E. coli</i> J53 AzR – 29	NA	+	+	+	<i>ctx-m</i> do grupo 2 e <i>tem</i>	<i>ctx-m-2</i> e <i>tem-1</i>	R	S	S	S	S	S	R	CTX e GEN	
<i>E. coli</i> IAL 45	NA	+	+	+	<i>ctx-m</i> do grupo 2 e <i>tem</i>	<i>ctx-m-2</i> e <i>tem-1</i>	R	S	R	S	S	S	R	NA	
<i>E. coli</i> J53 AzR – 45	NA	+	+	+	<i>ctx-m</i> do grupo 2 e <i>tem</i>	<i>ctx-m-2</i> e <i>tem-1</i>	R	S	S	S	S	S	R	CTX e GEN	

*Os valores das CIM foram interpretados de acordo com o CLSI (CLSI, 2007).

Cfs 3^a: cefalosporinas de 3^a geração; ATM: aztreonam; DDS: teste de aproximação de discos; DC: teste do disco combinado; NA: não aplicado; ESBL: beta-lactamase de espectro estendido; AmpC: beta-lactamase AmpC; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; CPM, cefepime; CFO, ceftoxitina; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina; S, sensível; R, resistente; -: negativa.

Tabela 7 - Determinação da CIM para antibióticos frente às enterobactérias detectadas fenotipicamente, pelo DC, como produtoras de ESBL, transconjugantes e bactérias-controle dos experimentos

Linhagem	CIM do antibiótico (µg/mL) ^a													
	CTX		CAZ		CPM		CFO		NAL		CIP		GEN	
	^b S ≤ 8	R ≥ 64	S ≤ 8	R ≥ 32	S ≤ 8	R ≥ 32	S ≤ 8	R ≥ 32	S ≤ 8	R ≥ 32	S ≤ 1	R ≥ 4	S ≤ 4	R ≥ 8
<i>E. coli</i> ATCC 25922 (controle CIM)	0,125		0,5		0,125		1		4		≤ 0,031		0,25	
<i>E. coli</i> J53 AzR (controle conjugação)	0,125		0,125		0,125		1		4		≤ 0,031		0,25	
<i>K. oxytoca</i> IAL 11	1		4		0,5		32		32		0,125		1	
<i>K. oxytoca</i> IAL 12	32		16		4		16		32		0,125		1	
<i>S. marcescens</i> IAL 19	> 256		32		> 256		64		32		0,5		> 256	
<i>E. coli</i> J53 AzR – 19	256		2		16		4		4		≤ 0,031		16	
<i>P. mirabilis</i> IAL 29	64		1		8		8		16		≤ 0,031		16	
<i>E. coli</i> J53 AzR – 29	64		1		8		4		8		≤ 0,031		16	
<i>E. coli</i> IAL 45	> 256		4		32		8		4		≤ 0,031		256	
<i>E. coli</i> J53 AzR – 45	16		4		4		4		4		≤ 0,031		64	

^a CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; CPM, cefepime; CFO, ceftoxitina; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina; S, sensível; R, resistente.

^b Os valores das CIM foram interpretados de acordo com o CLSI (CLSI, 2007).

5. DISCUSSÃO

O Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto é referência regional para investigação e diagnóstico laboratorial de meningite bacteriana na região nordeste do Estado de São Paulo. Porém, nem todas as bactérias isoladas de casos suspeitos de meningite são enviadas para o Laboratório de Bacteriologia para serem investigadas, limitando assim, discussões mais amplas quanto à prevalência e incidência de enterobactérias produtoras de ESBL em pacientes com suspeita de meningite nesta região.

As enterobactérias mais isoladas de pacientes com suspeita de meningite da região de Ribeirão Preto, investigadas pelo Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, no período de 2000 a 2005, foram *K. pneumoniae* (14) e *E. coli* (12), no entanto, ao contrário de outros estudos (BRADFORD, 2001; PATERSON; BONOMO, 2005), nenhuma *K. pneumoniae* foi detectada como produtora de ESBL e, somente 1 *E. coli* foi detectada como produtora de ESBL. Também, o número de bactérias produtoras de ESBL não aumentou a partir de 2002 (1 por ano), sendo que em 2005 não foi detectada nenhuma bactéria produtora de ESBL.

Das 3 enterobactérias detectadas como produtoras de ESBL, *S. marcescens* IAL 19 e *E. coli* IAL 45 foram isoladas de LCR e, *P. mirabilis* IAL 29 foi isolada de sangue. Alguns fatores podem dificultar o isolamento de bactérias causando meningite do LCR, como, por exemplo, colheita e transporte inadequados da amostra clínica. Muitas vezes o LCR é colhido e não é semeado diretamente em tubo contendo ágar chocolate. No entanto, todo sangue colhido é semeado imediatamente em BHI (hemocultura). O manual das Normas Técnicas para o Diagnóstico das Meningites Bacterianas (BRASIL, 1986), estabelece que, para o diagnóstico de meningite bacteriana, as amostras clínicas necessárias e complementares para o isolamento do agente etiológico são LCR e sangue.

Analisando os resultados destes 6 anos (2000 a 2005), a porcentagem de enterobactérias produtoras de ESBL isoladas pacientes com suspeita de meningite foi baixa (6,52 %), comparada com outras infecções (BRADFORD, 2001; PATERSON; BONOMO,

2005), porém, importante, dado o isolamento dessas bactérias de LCR e sangue de pacientes com suspeita de meningite, uma vez que não existem muitos dados representativos para comparação, principalmente sobre a genética envolvida na resistência desses isolados. Um relato foi publicado por Smith et al. (1990), que estudaram a falha de tratamento com ceftazidima e amicacina para bacteremia e meningite causada por *K. pneumoniae* produtora de ESBL, apresentando resistência à ceftazidima (CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$), na qual a enzima detectada foi uma ESBL derivada de TEM.

Houve alguma discordância entre alguns resultados obtidos pelo teste de sensibilidade aos antibióticos por disco difusão e pela determinação da CIM (Tabela 7 e Apêndice I). No entanto, todas as discordâncias observadas podem ser inicialmente explicadas, pois, a determinação da CIM é reconhecida, na literatura, como método mais sensível, apresentando melhor precisão e exatidão para o estudo da resistência aos antibióticos (CLSI, 2005; CLSI, 2007).

A detecção de genes *bla*_{CTX-M} nas enterobactérias produtoras de ESBL está coerente com a característica encontrada de maior atividade sobre cefotaxima, demonstrada pelos valores de CIM. Dados da literatura relatam a maior frequência das enzimas CTX-M na América do Sul, principalmente Brasil e Argentina (BONNET, 2004; BONNET et al., 2001; BONNET et al., 2000a; MINARINI *in press*; MINARINI et al., 2007a; MINARINI et al., 2007b, CLÍMACO et al., comunicação pessoal).

Neste trabalho, *S. marcescens* IAL 19 (isolada na Santa Casa de Araraquara em 2002), *P. mirabilis* IAL 29 e *E. coli* IAL 45 (isoladas na Santa Casa de Franca, respectivamente, em 2003 e 2004) abrigam gene *bla*_{CTX-M-2}. CTX-M-2 foi relatada no Brasil, enzima a qual parece ser prevalente na região de Ribeirão Preto - SP e Juiz de Fora - MG (MINARINI *in press*; MINARINI et al., 2007a; MINARINI et al., 2007b, CLÍMACO et al., comunicação pessoal).

S. marcescens IAL 19 apresentou alto nível de resistência às cefalosporinas de 3ª geração, demonstrado pela CIM para cefotaxima e cefepime. Além da produção de ESBL, esta bactéria possui gene *ampC* cromossômico, sendo potencialmente hiperprodutora de beta-lactamase AmpC quando induzida. A disseminação de bactérias que possuem associação de resistência adquirida e intrínseca é um grande problema para o controle de infecção hospitalar, pois, bactérias como *S. marcescens* IAL 19 podem ser selecionadas por várias classes de antibióticos beta-lactâmicos e permanecerem como bactérias causadoras de infecção hospitalar.

O mesmo aplica-se para *P. mirabilis* IAL 29 e *E. coli* IAL 45, as quais também apresentam produção de ESBL e possuem gene *ampC* cromossômico. Esses dois gêneros de bactérias foram isolados na Santa Casa de Franca em um intervalo de aproximadamente 1 ano e 4 meses apresentando produção da mesma enzima, sugerindo a provável transmissão horizontal de genes *bla*_{CTX-M-2} no hospital.

Os experimentos de conjugação demonstraram que os genes *bla*_{CTX-M} das linhagens doadoras *S. marcescens* IAL 19, *P. mirabilis* IAL 29 e *E. coli* IAL 45 estão localizados em elementos genéticos móveis, integrons e plasmídeos, previamente descritos na literatura (CANTÓN; COQUE, 2006; CLÍMACO, comunicação pessoal), pois, a resistência à cefotaxima e outros antibióticos foi transferida para a linhagem receptora *E. coli* J53 AzR. Geralmente, elementos genéticos móveis que abrigam genes *bla*_{CTX-M} também carregam genes de resistência à gentamicina. Experimentos preliminares demonstraram que os genes *bla*_{CTX-M-2} detectados podem estar associados ao elemento genético móvel *ISCR1*, localizado em plasmídeos conjugativos (dados não mostrados).

Pode-se especular que, *E. coli* IAL 45, isolada de um paciente de 7 meses de idade, seja uma MENECA (*E. coli* causadora de meningite), a qual possui tropismo e fatores de virulência que levam à infecção das meninges em neonatos e lactentes. Por testes de soro

aglutinação não é possível determinar se essa *E. coli* pertence ou não a este grupo, no entanto, a pesquisa de genes codificadores de fatores de virulência próprios da MENEC pode ser realizada (BONACORSI et al., 2006; JOHNSON; RUSSO, 2002; RUSSO; JOHNSON, 2000).

Resultados obtidos demonstraram que não houve amplificação de genes *ampC* para *K. pneumoniae* IAL 28, *K. pneumoniae* IAL 31 e *K. pneumoniae* IAL 38, podendo-se especular então que a resistência à cefoxitina nessas bactérias envolve outros mecanismos de resistência, como a perda de porina e/ou aumento da atividade de bomba de efluxo. A interrupção da transcrição de genes que codificam porinas, provocada por seqüências de inserção, é um evento que causa a perda da expressão da porina aumentando a resistência de *K. pneumoniae* à cefoxitina (HERNANDEZ-ALLES et al., 1999).

Não houve boa correlação da triagem por diminuição de sensibilidade às cefalosporinas de 3ª geração e/ou aztreonam com a detecção fenotípica de ESBL. No entanto, isso já era esperado, pois, quando a bactéria é produtora de ESBL ela geralmente apresenta resistência à uma ou mais cefalosporina de 3ª geração e/ou aztreonam. Já no que se refere a triagem por DDS, das 5 enterobactérias que apresentaram resultado positivo, *S. marcescens* IAL 19, *P. mirabilis* IAL 29 e *E. coli* IAL 45 realmente eram produtoras de ESBL, detectadas como tal por apresentarem gene codificador de ESBL.

Ambos DDS e DC, respectivos testes de triagem e confirmação da produção de ESBL, apresentam resultados iguais e boa sensibilidade, entretanto, quanto à especificidade, pode ocorrer resultado falso positivo. *K. oxytoca* IAL 11 e IAL 12 foram triadas e confirmadas fenotipicamente como produtoras de ESBL, porém, não apresentaram detecção de genes codificadores de ESBL. A diminuição de sensibilidade ou resistência às cefalosporinas de 3ª geração e/ou aztreonam em *K. oxytoca* pode ser explicada pela hiperprodução de beta-lactamase OXY, que é uma beta-lactamase de espectro restrito, codificada pelo gene *bla_{OXY}*,

que é intrínseco de *K. oxytoca*, e quando hiperproduzida pode conferir fenótipo de ESBL, resultando em falsa detecção fenotípica da produção de ESBL (FEVRE et al., 2005; FOURNIER et al., 1996; SIROT et al., 1998). Estas bactérias foram isoladas de pacientes diferentes, em 2001 no Instituto Santa Lúcia – Ribeirão Preto – SP, em um intervalo de 2 meses. *Pulsed Field Gel Electrophoresis* foi realizado para avaliar a relação genética entre essas duas bactérias, o qual demonstrou, após análise do perfil de macrorestrição, que estas bactérias são intimamente relacionadas (dados não mostrados), de acordo com critérios estabelecidos por Tenover et al. (1995).

E. cloacae IAL 23 apresenta alto nível de resistência às cefalosporinas de 3^a geração e ao aztronam. A produção de ESBL não foi detectada fenotipicamente. É difícil detectar a produção de ESBL em bactérias que também produzem beta-lactamase AmpC cromossômica, como *E. cloacae*, pois, essas enzimas podem hidrolisar a cefalosporina utilizada como indicador, mascarando o sinergismo (LIVERMORE; BROWN, 2001). A princípio, a produção de ESBL demonstra ser, teoricamente, distinguível da produção de beta-lactamase AmpC pela sensibilidade da bactéria à cefoxitina e/ou cefotetan, mas isso não tem sido validado na prática (LIVERMORE; BROWN, 2001; THOMSON et al., 1984). Com o objetivo de tentar esclarecer este alto nível de resistência às cefalosporinas de 3^a geração e ao aztronam, foi realizada, além da detecção fenotípica, a detecção molecular de genes codificadores de ESBL e AmpC mediados por plasmídeo. Foi detectado o gene *bla*_{TEM}, que poderia explicar este fenótipo de resistência, no entanto, após análise do sequenciamento, foi identificado o gene *bla*_{TEM-1}, codificador de beta-lactamase de espectro restrito (dados não mostrados). De acordo com os resultados obtidos, é provável que essa bactéria hiperproduza beta-lactamase AmpC, coerente com o alto nível de resistência às cefalosporinas de 3^a geração, ao aztronam e à cefoxitina, mantendo, no entanto, sensibilidade à cefalosporina de 4^a geração e ao imipenem (DIETZ; PFEIFLE; WIEDEMANN, 1997; HANSON, 2003;

LINDQUIST et al., 1989; PATERSON, 2006; PÉREZ-PÉREZ, HANSON, 2002; SALADIN et al., 2002).

Lu et al. (1999) estudaram a meningite causada por bacilos Gram-negativos pós-neurocirurgia. De trinta pacientes diagnosticados com meningite por bacilos Gram-negativos, 8 apresentaram bacilos resistentes às cefalosporinas de 3ª geração, todos adquiridos no hospital. Outro estudo semelhante foi realizado por BRIGGS et al. (2004), no qual metade dos pacientes com infecção pós-neurocirurgia por bacilos Gram-negativos que foram tratados inicialmente com cefalosporinas de 3ª geração mudaram a antibioticoterapia, mais freqüentemente para um carbapenema, resultando em cura de 85 % dos pacientes. Lu et al. (1998) avaliaram os fatores prognósticos para meningite em adultos e observaram que todos os pacientes que não receberam antibioticoterapia apropriada morreram, entretanto, mortalidade nos pacientes tratados com antibioticoterapia apropriada foi de 28 %.

Lu, Chang e Chang (1999) relatam que na infecção pós-neurocirurgia por bacilos Gram-negativos a resistência às cefalosporinas de 3ª geração deve ser um acontecimento esperado. O'Neill et al. (2006), em outro estudo semelhante, discorrem sobre a utilização das cefalosporinas de 3ª geração na terapia empírica de pacientes com suspeita de meningite e na antibioticoterapia de pacientes com meningite bacteriana. Segundo os autores, devido à capacidade que esses antibióticos possuem de atravessar a barreira hemato-encefálica, esses foram utilizados nos últimos 20 anos no tratamento de pacientes com meningite causada por bacilos Gram-negativos. Entretanto, segundo os mesmos autores, a ocorrência de bacilos Gram-negativos produtores de ESBL e outras beta-lactamases vem crescendo e restringindo a escolha de antibióticos em casos de meningite.

Lu, Chang e Chang (2002) propuseram que a terapia empírica para meningite adquirida na comunidade deve ser realizada com cefalosporinas de 3ª geração enquanto

antibióticos tais como os carbapenemas devem ser considerados como alternativa de terapia empírica para pacientes com meningite pós-neurocirurgia.

Como as bactérias produtoras de ESBL frequentemente abrigam plasmídeos que também carregam genes codificadores de resistência aos aminoglicosídeos, sulfametoxazol-trimetoprima e quinolonas, Paterson e Bonomo (2005) recomendam carbapenemas como antibióticos de escolha para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias produtoras de ESBL.

Outra opção terapêutica é a utilização da tigeciclina, uma glicilciclina derivada da minociclina que, em testes *in vitro*, realizados com bactérias resistentes à minociclina e doxiciclina, não apresentou resistência cruzada com estes antibióticos. Com exceção de *Proteus* spp., *Providência* spp. e *Pseudomonas* spp., a tigeciclina mantém atividade sobre bactérias Gram-negativas produtoras de beta-lactamases e resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos (HAWKEY; FINCH, 2007).

Morosini et al. (2006) estudaram 285 enterobactérias (172 *E. coli*, 84 *Klebsiella* spp., 20 *Enterobacter* spp., 5 *Salmonella* spp. e 4 *Citrobacter* spp.) produtoras de ESBL, isoladas de pacientes hospitalizados e da comunidade, frente a alguns antibióticos. Foram observadas taxas de sensibilidade para meropenem, imipenem, tigeciclina, amicacina e piperacilina-tazobactam de respectivamente 100 %, 100 %, 97,5 %, 93,3 % e 93 %. Os 2,5 % de resistência à tigeciclina foram observados por CIM intermediária encontrada em sete isolados de *K. pneumoniae*.

Para o tratamento de meningite causada por microrganismos produtores de ESBL, o antibiótico de primeira escolha recomendado é o meropenem, e de segunda escolha a polimixina B intratecal (FALAGAS; BLIZIOTIS; TAMC, 2007; PATERSON; BONOMO, 2005).

O tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes e o controle da disseminação de genes de resistência no hospital e também na comunidade vem representando um desafio para os profissionais da saúde, principalmente em infecções nas quais as alternativas de tratamento são escassas e a possibilidade de disseminação desses genes de resistência é grande. O conhecimento dos mecanismos de resistência aplicados ao rápido diagnóstico laboratorial de bactérias multirresistentes é de crucial importância para a antibioticoterapia apropriada a fim de fornecer a melhor escolha de tratamento e controle da disseminação da resistência bacteriana.

6. CONCLUSÕES

- A produção de ESBL em 6,52 % das enterobactérias estudadas é baixa, no entanto, importante, dado o isolamento dessas bactérias de LCR e sangue de pacientes com suspeita de meningite, uma vez que não existem muitos dados representativos para comparação, principalmente sobre a genética envolvida na resistência desses isolados.
- A triagem fenotípica de ESBL por diminuição de sensibilidade às cefalosporinas de 3ª geração e/ou aztreonam não apresentou boa correlação com a detecção fenotípica por DC.
- Houve 100 % de correlação entre a triagem por DDS e a detecção fenotípica por DC.
- Houve falsa detecção fenotípica de ESBL em *K. oxytoca* IAL 11 e *K. oxytoca* IAL 12.
- Houve 100 % de correlação entre detecção fenotípica e molecular em *S. marcescens* IAL 19, *P. mirabilis* IAL 29 e *E. coli* IAL 45.
- O gene *bla*_{CTX-M-2} codificador de ESBL foi detectado em três bactérias de diferentes gêneros, nas cidades de Franca e Araraquara, demonstrando que este gene já estava presente desde 2002 na região de Ribeirão Preto.

- Houve transmissão de genes codificadores de ESBL, demonstrada pela resistência dos transconjugantes às cefalosporinas de 3^a e/ou 4 geração e/ou aztreonam. Também foi observada a transferência da resistência à gentamicina.
- Não houve transmissão de resistência ao ácido nalidíxico e à ciprofloxacina, demonstrada pelos transconjugantes.
- A produção de beta-lactamase AmpC mediada por genes plasmídeos não foi responsável pela diminuição de sensibilidade ou resistência à cefoxitina em *K. pneumoniae* IAL 28, *K. pneumoniae* IAL 31 e *K. pneumoniae* IAL 38.
- Não foi encontrada *Klebsiella* spp. produtora de ESBL entre as bactérias estudadas.
- Não foi detectado gene codificador de ESBL e AmpC mediado por plasmídeo em *E. cloacae* IAL 23.

7. REFERÊNCIAS*

*De acordo com: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ABOTT, S.L. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas*, and other *Enterobacteriaceae* In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**, 9th ed. American Society for Microbiology: Washington, 2007, v. 1, cap. 45, p. 698-715.

AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamase. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 289, p. 321-331, 1980.

ANOOP, P.; ANJAY, M.A.; VINCENT, J.; GIRIJA, B. Fulminant *Citrobacter* Meningitis With Multiple Periventricular Abscesses in a Three-Month-Old Infant. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 429-432, 2003.

BABIC, M.; HUJER, A.M.; BONOMO, R.A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamses. **Drug Resistance Updates**, v. 9, p. 142-156, 2006.

BASHIR, H.E.; LAUNDY, M.; BOOY, R. Diagnosis and treatment of bacterial meningitis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 88, p. 615-620, 2003.

BAUERNFEIND, A.; CASELLAS, J.M.; GOLDBERG, M.; HOLLEY, M.; JUNGWIRTH, R.; MANGOLD, P.; RÖHNISCH, T.; SCHWEIGHART, S.; WILHELM, R. A new plasmidic cephotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. **Infection**, v.20, p.18-163, 1992.

BAUERNFEIND, A.; GRIMM, H.; SCHWEIGHART, S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, v.18, p.294-298, 1990.

BAUERNFEIND, A.; STEPLINGER, I.; JUNGWIRTH, R.; MANGOLD, P.; AMANN, S.; AKALIN, E.; ANG, O.; BAL, C.; CASELLAS, J.M. Characterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 616–620, 1996.

BINGEN, E.; BEDU, A.; BRAHIMI, N.; AUJARD, Y. Use of Molecular Analysis in Pathophysiological Investigation of Late-Onset Neonatal *Escherichia coli* Meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 3074–3076, 1995.

BLOMBERG, B.; JUREEN, R.; MANJI, K.P.; TAMIM, B.S.; MWAKAGILE, D.S.M.; URASSA, W.K.; FATAKI, M.; MSANGI, V.; TELLEVIK, M.G.; MASELLE, S.Y.; LANGE LAND, N. High Rate of Fatal Cases of Pediatric Septicemia Caused by Gram-Negative Bacteria with Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Dar es Salaam, Tanzania. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2. p. 745–749, 2005.

BOISSON, C.; ARNAUD, S.; VIALET, R.; MARTIN, C. Severe community-acquired meningitis. **Critical Care**, v. 3, p. R55–R65. 1999.

BONACORSI, S.P.P.; CLERMONT, O.; TINSLEY, C.; GALL, S.; BEAUDOIN, J-C.; ELION, J.; NASSIF, X.; BINGEN, E. Identification of Regions of the *Escherichia coli* Chromosome Specific for Neonatal Meningitis-Associated Strains. **Infection And Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2096–2101, 2000.

BONNET, R. Growing Group of Extended-Spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 1-14, 2004.

BONNET, R.; DUTOIR, C.; SAMPAIO, J.L.; CHANAL, C.; SIROT, D.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, J. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-Gly. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2269-2275, 2001.

BONNET, R.; SAMPAIO, J.L.; LABIA, R., DE CHAMPS, C., SIROT, D.; CHANAL, C., SIROT, J. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p.1936-42, 2000a.

BONNET, R.; SAMPAIO, J.L.M.; CHANAL, C.; SIROT, D., DE CHAMPS, C.; VIALARD, J.L.; LABIA, R.; SIROT J. A novel class A extended-spectrum β -lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 3061-3068, 2000b.

BONOMO, R.A.; TOLMASKY, M. Enzyme-Mediated Resistance to Antibiotics: Mechanisms, Dissemination, and Prospects for Inhibition. **American Society for Microbiology**: Washington, 2007.

BRADFORD, P.A. Extend-spectrum β -lactamases in the 21st Century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Microbiology Reviews**, v. 14, p. 933-951, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. Divisão Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. **Normas Técnicas para o Diagnóstico das Meningites Bacterianas**, Brasília, 1986.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Lista Nacional de Doenças e Agravos de Notificação Compulsória. Portaria nº 5, 21 de fevereiro de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, nº 38, p. 34, fev. 2006.

BRET, L.; CHANAL-CLARIS, C.; SITORT, D.; CHAIB, E.B.; LABIA, R.; SIROT, J. Chromosomally encoded AmpC-type β -lactamase in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 110-1114, 1998.

BRIGGS, S.; ELLIS-PEGLER, R.; RAYMOND, R.; THOMAS, M.; WILKINSON, L. Gram-negative Bacillary Meningitis after Cranial Surgery or Trauma in Adults. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 36, p. 165-173, 2004.

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

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p.1211-1233, 1995.

BUSH, K.; MACALINTAL, C.; RASMUSSEN, B.A.; LEE, V.J.; YANG, Y. Kinetic interactions of tazobactam with beta-lactamases from all major structural classes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 851-858, 1993.

CANTÓN, R.; COQUE, T.M. The CTX-M β -lactamase pandemic. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 466-475, 2006.

CARTER, M.W.; OAKTON, K.L.; WARNER, M.; LIVERMORE, D.M. Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella* with the Oxoid Combination Disk Method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4228-4232, 2000.

CHAIBI, E.B.; SIROT, D.; PAUL, G.; LABIA, R. Inhibitor-resistant TEM β -lactamase: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, p. 447-458, 1999.

CHANG, W.N.; LU, C.H.; HUANG, C.R.; CHUANG, Y.C. Mixed Infection in Adult Bacterial Meningitis. **Infection**, v. 28, p. 8–12, 2000.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição. M7-A6, v. 23, n. 2, 2005.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana. M100-S17, 2007.

COUDRON, P.E.; HANSON, N.D.; CLIMO, M.W. Occurrence of Extended-Spectrum and AmpC β -Lactamases in bloodstream Isolates of *Klebsiella pneumoniae*: Isolates Harbor Plasmid-Mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC β -Lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 772-777, 2003.

COUDRON, P.E.; MOLAND, E.S.; SANDERS, C.C. Occurrence and Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Members of the Family *Enterobacteriaceae* at a Veterans Medical Center: Seek and You May Find. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 2593–2597, 1997.

COUDRON, P.E.; MOLAND, E.S.; THOMSON, K.S. Occurrence and detection of AmpC Beta-Lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a Veterans Medical Center. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1791-1796, 2000.

DIETZ, H.; PFEIFLE, D.; WIEDEMANN, B. The Signal Molecule for β -Lactamase Induction in *Enterobacter cloacae* Is the Anhydromuramyl-Pentapeptide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 10, p. 2113–2120, 1997.

ENDIMIANI, A.; LUZZARO, F.; BRIGANTE, G.; PERILLI, M.; LOMBARDI, G.; AMICOSANTE, G.; ROSSOLINI, G.M.; TONIOLO, A. *Proteus mirabilis* Bloodstream Infections: Risk Factors and Treatment Outcome Related to the Expression of Extended-Spectrum β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2598–2605, 2005.

ESCRIBANO, I., RODRIGUEZ, J.C., CEBRIAN, L., ROYO, G. The importance of active efflux systems in the quinolone resistance of clinical isolates of *Salmonella* spp.. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 428-432, 2004.

ESSACK, S.Y.; HALL, L.M.; PILLAY, D.G.; MCFADYEN, M.L.; LIVERMORE, D.M. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 88-95, 2001.

FALAGAS, M.E.; BLIZIOTIS, I.A.; TAMC, V.H. Intraventricular or intrathecal use of polymyxins in patients with Gram-negative meningitis: a systematic review of the available evidence. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 9–25, 2007.

FARMER III, J.J.; BOATWRIGHT, K.D; JANDA, M. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**, 9th ed. American Society for Microbiology: Washington, 2007, v. 1, cap. 42, p. 649-669.

FEVRE, C.; JBEL, M.; PASSET, V.; WEILL, F-X.; GRIMONT, P.A.D.; BRISSE, S. Six Groups of the OXY β -Lactamase Evolved over Millions of Years in *Klebsiella oxytoca*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3453–3462, 2005.

FIETT, J.; PALUCHA, A.; MIACZYNSKA, B.; STANKIEWICA, M.; PRZONDO-MORDARSKA, H.; HRYNIEWICZ, W.; GNIADKOWSKI, M. A Novel Complex Mutant β -lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended Spectrum β -lactamase-producing *Klebsiellae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 1499-1505, 2000.

FLUIT, AD.C.; VISSER, M.R.; SCHMITZ, F.J. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 836–871, 2001.

FOURNIER, B.; ROY, P.H.; LAGRANGE, P.H.; PHILIPPON, A. Chromosomal beta-lactamase genes of *Klebsiella oxytoca* are divided into two main groups, blaOXY-1 and blaOXY-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 2, p. 454–459, 1996.

FROST, L.S.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A.O.; TOUSSAINT, A. Mobile Genetic Elements: The Agents of Open Source Evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 722-732, 2005.

GRACE, Y.; WANG, H.H.; DAVIES, J. The truth about antibiotics. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 163-170, 2006.

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

HANSON, N.D. AmpC β -lactamases: what do we need to know for the future? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 2-4, 2003.

HAWKEY, P.; FINCH, R. Tigecycline: in-vitro performance as a predictor of clinical efficacy. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 4, p. 354–362, 2007.

HERNANDEZ-ALLES, S.; BENEDI, V.J.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PASCUAL, A.; AGUILAR, A.; TOMAS, J.M. Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 937-939, 1999.

JACOB, G.; BUSH, K. Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant β -Lactamases. LAHEY Clinics. Atualizada em: 2008 Jan 07. Acesso em: 2008 Mar 09. Disponível em: <http://www.lahey.org/Studies/>

JACOB, G.A. β -Lactamase Nomenclature. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1123-1129, 2006.

JANDA, J.M.; ABOTT, S.L. The Enterobacteria. 2th ed, **American Society for Microbiology**: Washington, 2005.

JARLIER, V.; NICOLAS, M.; FOURNIER, G.; PHILIPPON, A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactamases agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. **Review Infectious Diseases**, v. 10, p. 867-878, 1988.

JOHNSON, J.R.; RUSSO, T.A. Uropathogenic *Escherichia coli* as Agents of Diverse Non-Urinary Tract Extraintestinal Infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 6, p. 859-864, 2002.

JONES, R.N.; BAQUERO, F.; PRIVITERA, G.; INOUE, M.; WIEDEMANN, B. Inducible β -lactamase mediated resistance to third generation cephalosporins. **Clinical Microbiology Infection**, v. 3, p. 7-20, 1997.

KANG, C.I.; KIM, S.H.; PARK, W.B.; LEE, K.D.; KIM, H.B.; KIM, E.C.; OH, M.D.; CHOE1, K.W. Bloodstream Infections Due to Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors for Mortality and Treatment Outcome, with Special Emphasis on Antimicrobial Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4574-4581, 2004.

KARLOWSKY, J.A.; JONES, M.E.; DRAGHI, D.C.; THORNSBERRY, C.; SAHM, D.F.; VOLTURO, G.A. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 3, n. 7, 2004.

KHAN, F.A. Meningitis Due to *Enterobacter aerogenes* Subsequent to Resection of an Acoustic Neuroma and Abdominal Fat Graft to the Mastoid. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p.386-388. 2004.

KIM, K.S. *Escherichia coli* Translocation at the Blood-Brain Barrier. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5217–5222, 2001.

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

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KREMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, p. 315-317, 1983.

LINDQUIST, S.; GALLENI, M.; LINDBERG, F.; NORMARK, S. Signalling proteins in enterobacterial AmpC β -lactamase regulation. **Molecular Microbiology**, v. 3, n. 8, p. 1091-1102, 1989.

LIVERMORE, D.M. β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 557-584, 1995.

LIVERMORE, D.M.; BROWN, D.F. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48 (suppl. 51), p. 59-64, 2001.

LIVERMORE, D.M.; WINSTANLEY, T.G.; SHANNON, K.P. Interpretative reading: recognizing the unusual and interfering resistance mechanisms from resistance phenotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, (suppl. S1), p. 87-102, 2001.

LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 9, 413-420, 2006.

LU, C-H.; CHANG, W-N.; CHUANG, Y-C. *Klebsiella* meningitis in adults: clinical features, prognostic factors and therapeutic outcomes. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 9, n. 5, p. 533-538, 2002.

LU, C-H.; CHANG, W-N.; CHUANG, Y-C. Resistance to Third-Generation Cephalosporins in Adult Gram-Negative Bacillary Meningitis. **Infection**, v. 27, n. 3, p. 56/208-59/211, 1999.

LU, C-H.; CHANG, W-N.; CHUANG, Y-C.; CHANG, W-H. Gram-negative Bacillary Meningitis after Cranial Surgery or Trauma in Adults. **Surgical Neurology**, v. 52, p. 438–44, 1999.

LU, C-H.; CHANG, W-N.; CHUANG, Y-C.; CHANG, W-H. The prognostic factors of adult Gram-negative bacillary meningitis. **Journal of Hospital Infection**, v. 40, p. 27-34, 1998.

MANCHANDA, V. N. A.; SINGH, N.P. Occurrence and detection of AmpC Beta-lactamases among Gram-negative clinical isolates using a modified three-dimensional test at Guru Tegh Bahadur Hospital, Delhi, India. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 415-418, 2003.

MINARINI, L.A.R.; CAMARGO, I.L.B.C.; PITONDO-SILVA, A.; DARINI, A.L.C. Multilocus Sequence Typing of uropathogenic ESBL-producing *Escherichia coli* Isolated in a Brazilian Community. **Current Microbiology**, v. 55, p. 524-529, 2007b.

MINARINI, L.A.R.; CLÍMACO, E.C.; GUIMARÃES, D.B.; FERREIRA, J.C.; PALAZZO, I.C.V.; MARTINEZ, R.; DARINI, A.L.C. Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella* spp. in a university hospital in Brazil. **Current Microbiology**, *in press*.

MINARINI, L.A.R.; GALES, A.C.; DARINI, A.L.C. First Report of Plasmid Mediated Resistance to Quinolones and Cefotaxime in an *Enterobacter cloacae* Strain Isolated from an Outpatient in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 401–402, 2007.

MINARINI, L.A.R.; GALES, A.C.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A. L. C. Prevalence of Community-Occurring Extended Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Current Microbiology**, v. 54, p. 335-341, 2007a.

MIRELIS, B.; NAVARRO, F.; MIRÓ, E.; MESA, R.J.; COLL, P.; PRATS, G. Community transmission of extended-spectrum β -lactamase. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 1024-1025, 2003.

MOROSINI, M.-I.; GARCÍA-CASTILLO, M.; COQUE, T.M.; VALVERDE, A.; NOVAIS, A.; LOZA, L.; BAQUERO, F.; CANTÓN, R. Antibiotic Coresistance in Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* and In Vitro Activity of Tigecycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2695–2699, 2006.

NATARO, J.P.; BOPP, C.A.; FIELDS, P.I.; KAPER, J.B.; STROCKBINE, N.A. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**, 9th ed. American Society for Microbiology: Washington, 2007, v. 1, cap. 43, p. 670-687.

NISHIDA, K.; KUNUGITA, C.; UJI, T.; HIGASHITANI, F.; HYODO, A. ; UNEMI, N.; MAITI, S.N.; PHILLIPS, A. , SPEVAK, P.; ATCHISON, K.P.; SALAMA, S.M.; ATWAL, H.; MICETICH, R.G. In vitro and in vivo activities of Syn2190, a novel beta-lactamase inhibitor. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43, p. 895-1900, 1999.

O'NEILL, E.; HUMPHREYS, H.; PHILLIPS, J.; SMYTH, E.J. Third-generation cephalosporin resistance among Gram-negative bacilli causing meningitis in neurosurgical patients: significant challenges in ensuring effective antibiotic therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 356–359, 2006.

PATERSON, D.L. Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6A, p. S20-S28, 2006.

PATERSON, D.L.; HUJER, K.M.; HUJER, A.M.; YEISER, B.; BONOMO, M.D.; RICE, L.B.; BONOMO, R.A.; INTERNATIONAL *Klebsiella* STUDY GROUP. Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, n. 11, p. 3554–3560, 2003.

PATERSON, D.L.; BONOMO, R.A. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 657–686, 2005.

PÉREZ-PÉREZ, F.J.; HANSON, N.D. Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2153–2162, 2002.

PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; DOERN, G.V.; KUGLER, K.; SENTRY PARTICIPANTS GROUP. Bacterial Pathogens Isolated from Patients with Bloodstream Infection: Frequencies of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility Patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada, 1997). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 7, p. 1762–1770, 1998.

PITCHER, D.G.; SANDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters Applied Microbiology**, v. 8, p. 151-156, 1989.

PITOUT, J.D.D.; HOSSAIN, A.; HANSON, N.D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5715-5721, 2004.

PITOUT, J.D.D.; NORDMANN, P.; LAUPLAND, K.B.; POIREL, L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBL) in the community. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, P. 52–59, 2005.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 589–603, 1998.

POIREL, L.; NAAS, T.; GUIBERT, M.; CHAIBI, E.B.; 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 573–581, 1999.

POIREL, L.; PITOUT, J.D.D.; CALVO, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, CHURCH, D.; NORDMANN, P. In vivo Selection of Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* Isolates Expressing Plasmid-Mediated Quinolone Resistance and Expanded-Spectrum β -Lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1525-1527, 2006.

POIREL, L.; THOMAS, I.L.; NAAS, T.; KARIM, A.; NORDMAN, P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron IN52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 622–632, 2000.

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

RADICE, M.; POWER, P.; DI CONZA, J.; GUTKIND, G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 602-604, 2002.

RAMPHAL, R.; AMBROSE, P.G. Extended-Spectrum β -Lactamses and Clinical outcomes: Current Data. **Clinical Infectious Disease**, v. 42, p. S164-S172, 2006.

RICE, L.B. Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6A, p. S11-S19, 2006.

ROMANELLI, R.M.C.; ARAÚJO, C.A.; DIAS, M.W.; BOUCINHAS, F.; CARVALHO, I. R.; MARTINS, N.R.L.; FREIRE, H.B.M. Etiologia e evolução das meningites bacterianas em centro de pediatria. **Journal de Pediatria**, v. 78, n. 1, p. 24-30, 2002.

RUSSO, T.A.; JOHNSON, J.R. A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753-1754, 2000.

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

SAMAHA-KFOURY, J.N.; ARAJ, G.F. Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases. **British Medical Journal**, v. 327, p1209-1212, 2003.

SANDERS, C.C.; SANDERS Jr., W.E. Emergence of resistance to cefamandole: possible role of cefoxitin inducible beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, p.792-797, 1979.

SANDIUMENGE, A.; DIAZ, E.; RODRIGUEZ, A.; VIDAUR, L.; CANADELL, L.; OLONA, M.; RUE, M.; RELLO, J. Impact of diversity of antibiotic use on the development of antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 1197-1204, 2006.

SHAH, A.A.; HASAN, F.; AHMED, S.; HAMEED, A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β lactamases. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 409-421, 2004.

SIROT, D.; LABIA, R.; POUEDRAS, P.; CHANAL-CLARIS, C.; CERCEAU, C.; SIROT, J. Inhibitor-Resistant OXY-2-Derived β -Lactamase Produced by *Klebsiella oxytoca*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 9, p. 2184–2187, 1998.

SMITH, G.E.; TILLMAN, B.S.; HOWELL, A.W.; LONGFIELD, R.N.; JORGENSEN, J.H. Failure of Ceftazidime-Amikacin Therapy for Bacteremia and Meningitis Due to *Klebsiella pneumoniae* Producing an Extended-Spectrum P-Lactamase. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 34, n. 6, p. 1290-1293, 1990.

SNYDER, L.; CHAMPNESS, W. **Molecular genetics of bacteria**, 3th ed. American Society for Microbiology: Washington, D.C., 2007.

SPANU, T.; LUZZARO, F.; PERILLI, M.; AMICOSANTE, G.; TONIOLO, A.; FADDA, G.; ITALIAN ESBP STUDY GROUP. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: implications for resistance to beta-lactams and other antimicrobial drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 196-202, 2002.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6A, p. S3–S10, 2006.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; DOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2233-2239, 1995.

THECCANAT, G.; HIRSCHFIELD, L.; ISENBERG, H. *Serratia marcescens* Meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 822-823, 1991.

THOMAS, C.M.; NIELSEN, K.M. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer Between Bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 711-721, 2005.

THOMSON, K.S.; MEJGLO, Z.A; PEARCE, G.N.; REGAN, T.J. 3-Dimensional susceptibility testing of beta-lactam antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 13, p. 45-54, 1984.

TUNKEL, A.R.; HARTMAN, B.J.; KAPLAN, S.L.; KAUFMAN, B.A.; ROOS, K.L.; SCHELD, W.M.; WHITLEY, R.J. Practice Guidelines for the Management of Bacterial Meningitis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 1267–84, 2004.

TUNKEL, A.R.; SCHELD, W.M. Pathogenesis and Pathophysiology of Bacterial Meningitis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 118-136, 1993.

TURNER, J.P. Extended-Spectrum β -Lactamases. **Clinical Infectious Disease**, v. 41, 273-275, 2005.

VILLEGAS, M.V. CORREA, A.; PEREZ, F.; ZULUAGA, T.; RADICE, M.; GUTKIND G.; CASELLAS, J.M.; AYALA, J.; LOLANS, K.; QUINN, J.P.; COOMBIAN NOSOCOMIAL RESISTANCE STUDY GROUP. CTX-M-12 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* Clinical isolate in Colombia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 629-631, 2004.

WANGER, A. *Yersinia*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**, 9th ed. American Society for Microbiology: Washington, 2007, v. 1, cap. 44, p. 688-697.

WINOKUR, P.C.; CANTON, R.; CASELLA, J.M.; LAGAKIS, N. Variations in the prevalence of strain expressing an extended-spectrum beta-lactamases phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. **Clinical Infectious Diseases**. v. 32 (suppl. 2), p. 94-103, 2001.

WISPELWEY, B.; TUNKEL, A.R.; SCHELD, W.M. Bacterial meningitis in adults. **Infection Disease Clinical North America**. v. 4, p. 645-659, 1990.

YONG, D.; PARK, R.; YUM, J.H.; LEE, K.; CHOI, E.C.; CHONG, Y. Further modification of the Hodge test to screen AmpC beta-lactamase (CMY-1) producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Microbiology Methods**, v. 51, p. 407-410, 2002.

APÊNDICE

APÊNDICE I – Perfil de sensibilidade aos antibióticos beta-lactâmicos, triagem de ESBL e beta-lactamase AmpC e detecção fenotípica de ESBL

Isolado	Registro LEBEM	Antibióticos beta-lactâmicos*								DDS	DC		
		IPM	CFO	AMC	ATM	CPM	CPD	CAZ	CTX		(CPD)	(CAZ)	(CTX)
<i>K. pneumoniae</i>	IAL 01	28 (S)	20 (S)	24 (S)	37 (S)	28 (S)	22 (S)	30 (S)	30 (S)	-	+	-	-
<i>E. cloacae</i>	IAL 02	22 (S)	00 (R)	00 (R)	33 (S)	30 (S)	22 (S)	26 (S)	28 (S)	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	IAL 03	26 (S)	24 (S)	18 (S)	34 (S)	32 (S)	30 (S)	32 (S)	33 (S)	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	IAL 04	30 (S)	25 (S)	18 (S)	34 (S)	33 (S)	28 (S)	32 (S)	34 (S)	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	IAL 05	26 (S)	28 (S)	24 (S)	34 (S)	31 (S)	28 (S)	30 (S)	32 (S)	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	IAL 06	30 (S)	24 (S)	24 (S)	30 (S)	30 (S)	26 (S)	28 (S)	30 (S)	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	IAL 07	30 (S)	24 (S)	22 (S)	32 (S)	32 (S)	28 (S)	30 (S)	32 (S)	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	IAL 08	28 (S)	24 (S)	20 (S)	30 (S)	29 (S)	24 (S)	30 (S)	29 (S)	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	IAL 09	23 (S)	18 (S)	10 (R)	<u>21</u> (I)	27 (S)	<u>08</u> (R)	<u>22</u> (S)	24 (S)	-	-	-	-
<i>K. oxytoca</i>	IAL 11	30 (S)	22 (S)	24 (S)	<u>24</u> (S)	24 (S)	18 (S)	25 (S)	28 (S)	+	+	-	-
<i>K. oxytoca</i>	IAL 12	39 (S)	24 (S)	20 (S)	<u>24</u> (S)	24 (S)	<u>12</u> (R)	24 (S)	<u>20</u> (I)	+	+	+	-

Continua

Continuação

Isolado	Registro LEBEM	Antibióticos beta-lactâmicos*								DDS	DC		
		IPM	CFO	AMC	ATM	CPM	CPD	CAZ	CTX		(CPD)	(CAZ)	(CTX)
<i>S. typhimurium</i>	IAL 13	25 (S)	23 (S)	26 (S)	<u>28</u> (S)	28 (S)	<u>22</u> (S)	<u>24</u> (S)	30 (S)	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	IAL 14	30 (S)	27 (S)	18 (S)	<u>36</u> (S)	32 (S)	<u>25</u> (S)	<u>30</u> (S)	34 (S)	-	-	-	-
<i>C. diversus</i>	IAL 15	24 (S)	00 (R)	12 (R)	<u>30</u> (S)	26 (S)	<u>21</u> (S)	<u>24</u> (S)	26 (S)	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	IAL 17	27 (S)	24 (S)	24 (S)	<u>32</u> (S)	28 (S)	<u>26</u> (S)	<u>30</u> (S)	33 (S)	-	-	-	-
<i>S. marcescens</i>	IAL 19	26 (S)	14 (R)	00 (R)	00 (R)	00 (R)	00 (R)	18 (S)	00 (R)	+	-	+	+
<i>Enterobacter</i> sp	IAL 20	26 (S)	22 (S)	26 (S)	<u>36</u> (S)	32 (S)	<u>28</u> (S)	<u>30</u> (S)	32 (S)	-	-	-	-
<i>E. cloacae</i>	IAL 21	25 (S)	00 (R)	12 (R)	<u>30</u> (S)	30 (S)	<u>22</u> (S)	<u>24</u> (S)	28 (S)	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	IAL 22	30 (S)	28 (S)	22 (S)	<u>32</u> (S)	34 (S)	<u>27</u> (S)	<u>30</u> (S)	32 (S)	-	-	-	-
<i>E. cloacae</i>	IAL 23	21 (S)	00 (R)	00 (R)	<u>00</u> (R)	26 (S)	<u>00</u> (R)	<u>00</u> (R)	00 (R)	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	IAL 24	28 (S)	26 (S)	18 (S)	<u>32</u> (S)	30 (S)	<u>25</u> (S)	<u>27</u> (S)	30 (S)	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	IAL 25	30 (S)	28 (S)	18 (S)	<u>30</u> (S)	30 (S)	<u>26</u> (S)	<u>30</u> (S)	32 (S)	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	IAL 27	27 (S)	26 (S)	18 (S)	<u>32</u> (S)	30 (S)	<u>25</u> (S)	<u>27</u> (S)	32 (S)	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	IAL 28	27 (S)	15 (I)	24 (S)	<u>30</u> (S)	27 (S)	<u>22</u> (S)	<u>24</u> (S)	27 (S)	-	-	-	-

Continua

Continuação

Isolado	Registro LEBEM	Antibióticos beta-lactâmicos*								DDS	DC		
		IPM	CFO	AMC	ATM	CPM	CPD	CAZ	CTX		(CPD)	(CAZ)	(CTX)
<i>P. mirabilis</i>	IAL 29	22 (S)	18 (S)	24 (S)	32 (S)	15 (I)	00 (R)	30 (S)	08 (R)	+	+	-	+
<i>E. cloacae</i>	IAL 30	22 (S)	00 (R)	00 (R)	32 (S)	30 (S)	17 (R)	26 (S)	28 (S)	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	IAL 31	24 (S)	00 (R)	00 (R)	34 (S)	32 (S)	24 (S)	30 (S)	32 (S)	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	IAL 33	24 (S)	23 (S)	21 (S)	27 (S)	27 (S)	25 (S)	26 (S)	28 (S)	-	-	-	-
<i>E. aerogenes</i>	IAL 35	21 (S)	00 (R)	00 (R)	30 (S)	25 (S)	20 (I)	25 (S)	26 (S)	-	-	-	-
<i>E. aerogenes</i>	IAL 36	20 (S)	00 (R)	00 (R)	27 (S)	30 (S)	22 (S)	26 (S)	27 (S)	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	IAL 37	24 (S)	30 (S)	24 (S)	30 (S)	32 (S)	24 (S)	30 (S)	32 (S)	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	IAL 38	26 (S)	18 (S)	20 (S)	30 (S)	27 (S)	24 (S)	24 (S)	29 (S)	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	IAL 40	24 (S)	23 (S)	24 (S)	27 (S)	28 (S)	24 (S)	25 (S)	28 (S)	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	IAL 39	24 (S)	24 (S)	24 (S)	32 (S)	30 (S)	24 (S)	28 (S)	30 (S)	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	IAL 41	22 (S)	24 (S)	20 (S)	30 (S)	26 (S)	23 (S)	26 (S)	28 (S)	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	IAL 42	24 (S)	24 (S)	20 (S)	27 (S)	27 (S)	23 (S)	27 (S)	27 (S)	-	-	-	-
<i>S. enteritidis</i>	IAL 43	27 (S)	24 (S)	22 (S)	30 (S)	28 (S)	24 (S)	26 (S)	30 (S)	-	-	-	-

Continua

Continuação

Isolado	Registro LEBEM	Antibióticos beta-lactâmicos*								DDS	DC		
		IPM	CFO	AMC	ATM	CPM	CPD	CAZ	CTX		(CPD)	(CAZ)	(CTX)
<i>S. enteritidis</i>	IAL 44	27 (S)	24 (S)	24 (S)	<u>30</u> (S)	30 (S)	<u>26</u> (S)	<u>28</u> (S)	30 (S)	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	IAL 45	24 (S)	18 (S)	08 (R)	<u>12</u> (R)	12 (R)	<u>00</u> (R)	24 (S)	<u>08</u> (R)	+	+	-	+
<i>E. coli</i>	IAL 46	24 (S)	24 (S)	00 (R)	<u>30</u> (S)	25 (S)	<u>23</u> (S)	<u>25</u> (S)	30 (S)	-	-	-	-
<i>C. diversus</i>	IAL 47	26 (S)	24 (S)	14 (I)	<u>34</u> (S)	35 (S)	<u>25</u> (S)	<u>30</u> (S)	32 (S)	-	-	-	-
<i>S. marcescens</i>	IAL 48	24 (S)	14 (S)	00 (R)	<u>30</u> (S)	30 (S)	<u>18</u> (I)	<u>30</u> (S)	30 (S)	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	IAL 49	24 (S)	24 (S)	26 (S)	<u>34</u> (S)	32 (S)	<u>30</u> (S)	<u>34</u> (S)	32 (S)	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp	IAL 50	24 (S)	00 (R)	10 (R)	<u>30</u> (S)	30 (S)	<u>24</u> (S)	<u>26</u> (S)	30 (S)	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	IAL 51	28 (S)	20 (S)	18 (S)	<u>30</u> (S)	30 (S)	<u>24</u> (S)	<u>28</u> (S)	30 (S)	-	-	-	-
<i>E. cloacae</i>	IAL 52	20 (S)	00 (R)	00 (R)	<u>28</u> (S)	30 (S)	<u>18</u> (I)	<u>30</u> (S)	30 (S)	-	-	-	-

*Diâmetro do halo em mm e sensibilidade; _ (halo sublinhado): representa a diminuição de sensibilidade ou resistência às cefalosporinas de 3ª geração e/ou aztreonam; IPM: imipenem; CFO: ceftiofeno; AMC: amoxicilina com ácido clavulânico; ATM: aztreonam; CPM: cefepime; DDS: teste de aproximação de discos; CPD: cefpodoxima; CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; DC: teste do disco combinado; S: sensível; I: intermediário; R: resistente

Destacado em negrito as informações referentes às enterobactérias produtoras de ESBL detectadas neste estudo

ANEXO I - Distribuição anual dos microrganismos isolados de pacientes com suspeita de meningite da região de Ribeirão Preto, no período de 2000 a 2005

Microrganismo	Ano						Total
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	
Enterobactérias	9	6	7	10	7	7	46
<i>H. influenzae</i>	6	5	3	12	1	0	27
<i>N. meningitidis</i>	31	31	33	29	34	20	178
<i>S. pneumoniae</i>	29	37	32	30	25	26	179
Outros microrganismos	44	77	113	74	91	58	457
Total	120	158	188	158	157	111	887

Fonte: Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto

ANEXO II - Registro das enterobactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite da região de Ribeirão Preto, no período de 2000 a 2005

Registro IAL-RP	Paciente	Idade	Sexo	Residência	Estado	Procedência	Material	Data isolamento	Isolado	Registro LEBEM	Observações
770 Si	IPB	5m	F	-	SP	ISL	Sangue	15/04/00	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAL 01	
773 Si	LFLS	3m	F	-	SP	ISL	Sangue	19/04/00	<i>Enterobacter cloacae</i>	IAL 02	
11 Me	DNO	-	F	Araraquara	SP	SESA	LCR	19/05/00	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAL 03	Mesmo paciente
21 Me	DNO	22d	F	Araraquara	SP	SESA	LCR	26/05/00	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAL 04	
1581 Ce	SGEP	2m	F	Ribeirão Preto	SP	Sinhá Junqueira	LCR	26/05/00	<i>Escherichia coli</i>	IAL 05	
1582 Ce	DNO	20d	F	Araraquara	SP	SESA	LCR	30/05/00	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAL 06	Mesmo paciente que 11 ME (19/05/00) e 21 ME (26/05/00)
8 Me	MEC	1m	F	Araraquara	SP	SESA	LCR	08/06/00	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAL 07	
1615 Ce	RBP	-	M	Araraquara	SP	SESA	LCR	21/08/00	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAL 08	
2 Me	PF	68a	M	Ibitinga	SP	CSII	LCR	11/09/00	<i>Escherichia coli</i>	IAL 09	
885 Si	TGM	3a	F	-	SP	ISL	Sangue	05/02/01	<i>Klebsiella oxytoca</i>	IAL 11	
904 Si	CAMS	5m	M	-	SP	ISL	Sangue	10/04/01	<i>Klebsiella oxytoca</i>	IAL 12	
1679 Ce	AB	59a	M	Barretos	SP	Santa Casa	LCR	08/05/01	<i>Salmonella typhimurium</i>	IAL 13	
6 Me	LOO	3d	F	Franca	SP	Vigilância Epidemiológica	LCR	11/05/01	<i>Escherichia coli</i>	IAL 14	
6 Me (A)	IOP	12	F	Araraquara	SP	SESA	LCR	06/06/01	<i>Citrobacter diversus</i>	IAL 15	

Continua

Continuação

Registro IAL-RP	Paciente	Idade	Sexo	Residência	Estado	Procedência	Material	Data isolamento	Isolado	Registro LEBEM	Observações
987 Si (A)	CSB	10d	F	-	SP	ISL	Sangue	02/10/01	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAL 17	
1776 Ce	RN de 19d	F	Araraquara	SP	Santa Casa	LCR	03/01/02	Serratia marcescens	IAL 19		
	AEHS										
34 Me	PRS	41a	M	Jaboticabal	SP	Vigilância Epidemiológica	LCR	27/06/02	<i>Enterobacter</i> spp.	IAL 20	
2 Me	APRL	6d	F	Franca	SP	Vigilância Epidemiológica	LCR	02/07/02	<i>Enterobacter cloacae</i>	IAL 21	
2 He	EMG	8a	M	Santa Rita Do Passa Quatro	SP	Santa Rita do Passa Quatro	Sangue	29/08/02	<i>Escherichia coli</i>	IAL 22	
2005 Si	LBG	1a	F	-	SP	ISL	Sangue	10/10/02	<i>Enterobacter cloacae</i>	IAL 23	
2010 Si	GS	4a	M	-	SP	ISL	Sangue	04/11/02	<i>Escherichia coli</i>	IAL 24	
35 Me	EC	68a	M	Jaboticabal	SP	Vigilância Epidemiológica	LCR	22/11/02	<i>Escherichia coli</i>	IAL 25	
2038 Si	NVAA	3m	F	-	SP	ISL	LCR	06/05/03	<i>Escherichia coli</i>	IAL 27	
2084 Ce	VA	18d	F	Araraquara	SP	SESA	LCR	22/05/03	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAL 28	
2102 Ce	OGG	40a	F	Franca	SP	Santa Casa	Sangue	17/06/03	<i>Proteus mirabilis</i>	IAL 29	
2054 Si	DFDV	2a3m	F	-	SP	ISL	Sangue	23/06/03	<i>Enterobacter cloacae</i>	IAL 30	Mesmo paciente
2054 Si	DFDV	2a3m	F	-	SP	ISL	Sangue	23/06/03	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAL 31	
283 Me	EAN	59a	M	Barretos	SP	Barretos	LCR	23/07/03	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAL 33	

Continua

Continuação

Registro IAL-RP	Paciente	Idade	Sexo	Residência	Estado	Procedência	Material	Data isolamento	Isolado	Registro LEBEM	Observações
333 Me	ACT	41a	M	Franca	SP	Vigilância Epidemiológica	LCR	29/08/03	<i>Enterobacter aerogenes</i>	IAL 35	
2151 Ce	ACT	41a	M	Franca	SP	Santa Casa	LCR	02/09/03	<i>Enterobacter aerogenes</i>	IAL 36	
468 Me	IOS	5m	F	Barretos	SP	Santa Casa	LCR	17/12/03	<i>Escherichia coli</i>	IAL 37	
486 Me	VAN	39a	M	Ribeirão Preto	SP	Vigilância Epidemiológica	LCR	23/12/03	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAL 38	
28 Me	CHA	10a	M	Sertãozinho	SP	Vigilância Epidemiológica	LCR	19/01/04	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAL 39	
2236 Ce	NAF	57a	M	Ribeirão Preto	SP	Santa Casa	LCR	23/03/04	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAL 40	
123 He	JPF	44 ^a	M	Jaboticabal	SP	Vigilância Epidemiológica	Sangue	05/07/04	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAL 41	
161 Me	JPF	44a	M	Jaboticabal	SP	Vigilância Epidemiológica	LCR	05/07/04	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IAL 42	
167 Me	MJA	8m	M	Ibitinga	SP	CSII	LCR	08/07/04	<i>Salmonella enteritidis</i>	IAL 43	Mesmo paciente
128 He	MJA	8m	M	Ibitinga	SP	CSII	Sangue	08/07/04	<i>Salmonella enteritidis</i>	IAL 44	
258 Me	YJD	7m	M	Franca	SP	Santa Casa	LCR	27/10/04	<i>Escherichia coli</i>	IAL 45	

Continua

Continuação

Registro IAL-RP	Paciente	Idade	Sexo	Residência	Estado	Procedência	Material	Data isolamento	Isolado	Registro LEBEM	Observações
2361 Ce	JT	42a	F	Araraquara	SP	SESA	LCR	06/04/05	<i>Escherichia coli</i>	IAL 46	
2380 Ce	AVS	11d	M	Araraquara	SP	SESA	LCR	24/05/05	<i>Citrobacter diversus</i>	IAL 47	
2390 Ce	MRM	3m	F	Araraquara	SP	SESA	LCR	30/05/05	<i>Serratia marcescens</i>	IAL 48	
51 He	ARPS	29a	M	Franca	SP	Vigilância Epidemiológica	SG	03/06/05	<i>Proteus mirabilis</i>	IAL 49	
104 Me	JJB	32a	M	Jaboticabal	SP	Vigilância Epidemiológica	LCR	19/08/05	<i>Enterobacter</i> spp.	IAL 50	
112 Me	DDSN	1m	M	Franca	SP	Vigilância Epidemiológica	LCR	25/08/05	<i>Escherichia coli</i>	IAL 51	Isolado também <i>Streptococcus</i> alfa-hemolítico do grupo D
2479 Ce	ALVP	32a	F	Barretos	SP	Santa Casa	LCR	07/10/05	<i>Enterobacter cloacae</i>	IAL 52	

-. informação desconhecida; SESA: Serviço Especial de Saúde; ISL: Instituto Santa Lúcia; IAL-RP: Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto; LEBEM: Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular; d: dias; m: meses; a: anos; F: Feminino; M: Masculino; SP: Estado de São Paulo; LCR: Líquido céfalo-raquidiano; RN: Recém Nascido

Fonte: Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto.

Destacado em negrito as informações referentes às enterobactérias produtoras de ESBL detectadas neste estudo

ANEXO III - Distribuição anual das enterobactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite da região de Ribeirão Preto, no período de 2000 a 2005

Enterobactéria	Ano						Total
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	
<i>K. pneumoniae</i>	5	1	0	4	4	0	14
<i>K. oxytoca</i>	0	2	0	0	0	0	2
<i>E. coli</i>	3	1	3	2	1 (1)	2	12
<i>Enterobacter</i> spp.	0	0	1	0	0	1	2
<i>E. cloacae</i>	1	0	2	1	0	1	5
<i>E. aerogenes</i>	0	0	0	2	0	0	2
<i>S. enteritidis</i>	0	0	0	0	2	0	2
<i>S. typhimurium</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>P. mirabilis</i>	0	0	0	1 (1)	0	1	2
<i>C. diversus</i>	0	1	0	0	0	1	2
<i>S. marcescens</i>	0	0	1 (1)	0	0	1	2
Total	9	6	7	10	7	7	46

Fonte: Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto

Entre parênteses é demonstrado o número de enterobactérias produtoras de ESBL detectadas neste estudo