

Incidência de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) em um hospital universitário

Alexandre Braoios

Curso de Farmácia e Bioquímica da UNOESTE, Presidente Prudente, SP.

Resumo

Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) são enzimas bacterianas que hidrolizam antibióticos beta-lactâmicos com amplo espectro de ação. Atualmente, cepas produtoras de ESBL são importantes agentes de infecção nosocomial, podendo limitar as opções terapêuticas disponíveis e sendo necessária a implantação de técnicas adequadas para sua detecção. A ESBL é codificada em plasmídios que podem ser transferidos a outros microrganismos por conjugação. O uso indiscriminado de cefalosporinas de amplo espectro contribui para a seleção de cepas produtoras de ESBL e torna este problema de interesse universal. Neste trabalho foram realizadas duas técnicas para detecção de ESBL, a Técnica da Dupla Difusão com Discos e a Técnica da Adição de Ácido Clavulânico. Amostras de *Klebsiella* sp (n=38) e *Escherichia coli* (n=114) isoladas rotineiramente de pacientes internados em hospital universitário de janeiro de 2004 a dezembro de 2005 foram incluídas no estudo. Deste total, 19 (50%) das amostras de *Klebsiella* sp e 55 (48,3%) amostras de *E. coli* eram produtoras de ESBL. A técnica da adição de ácido clavulânico apresentou maior sensibilidade (100%) demonstrando maior habilidade na detecção de ESBL, enquanto a técnica da dupla difusão apresentou sensibilidade de 24,3%. Cefotaxima foi o substrato que apresentou maior sensibilidade na detecção de ESBL. Ambas as técnicas apresentaram alta especificidade (100%).

Palavras-chave: ESBL, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, beta-lactamases

Incidence of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamase (ESBL) in a university hospital

Abstract

Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) are bacterial enzymes that hydrolyses beta-lactam antibiotics with broad spectrum of action. Currently, ESBL-producing strains are important agents of nosocomial infection which may limit the available options available, necessitating the deployment of appropriate techniques for its detection. The ESBL is codified in plasmids that can be transferred to other microorganisms by conjugation. The indiscriminate use of broad-spectrum cephalosporins contributes to the selection of ESBL-producing strains and makes the problem of universal interest. This work carried out two techniques for detection of ESBL, the technique of Double Disks Diffusion and the technique of Clavulanate Disk Addition. Strains of *Klebsiella* sp (n=38) and *Escherichia coli* (n=114) routinely isolated from patients admitted in the university hospital from January 2004 to December 2005 were included in the study. Of those, 19 (50%) of samples of *Klebsiella* sp and 55 (48.3%) samples of *E. coli* were ESBL-producing. The technique the clavulanate disk addition showed greater sensitivity (100%) showing higher skill in the detection of ESBL, whereas the technique of Double Disk Diffusion had a sensitivity of 24.3%. Cefotaxima was the substrate that showed greater sensitivity in detecting ESBL. Both techniques showed high specificity (100%).

Keywords: ESBL, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, beta-lactamases

Introdução

As Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro (3ª geração), como a cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona, e também ao aztreonam, um monobactâmico. Estas enzimas são codificadas por genes plasmidiais mutantes, especialmente TEM-1 e SHV-1, e são facilmente transferidos a outros microrganismos por meio da conjugação. Geralmente essas mutações ocorrem em um único ponto, o que pode ser suficiente para produzir uma nova enzima, que poderá ter novos substratos preferenciais (CARTER et al., 2000; EMERY & WEYMOUTH, 1997).

Cepas com resistência mediada por ESBL podem apresentar sensibilidade quando testadas *in vitro*, no entanto, *in vivo*, ocorre resistência. O substrato varia entre as diferentes ESBL já descritas. Assim, a sensibilidade a uma única cefalosporinas de espectro ampliado não prediz este resultado a outras cefalosporinas (CARTER et al., 2000).

Em 1983, na Alemanha, foi descrito o primeiro microrganismo produtor de ESBL, uma cepa de *Klebsiella pneumoniae*. Mais tarde, nos Estados Unidos e outros países da Europa, os genes codificadores de ESBL mediados por plasmídios foram disseminados para *Escherichia coli* (EMERY & WEYMOUTH, 1997). Inicialmente, os organismos produtores de ESBL foram todos isolados de infecções nosocomiais, ocorrendo seleção devido ao uso indiscriminado de cefalosporinas de amplo espectro e resultando em cepas que hoje podem ser encontradas também na comunidade. Além disso, esse grande plasmídeo, geralmente contém genes de resistência a outros antibióticos como os aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclina e cloranfenicol (PATERSON et al., 2000).

Bush et al. (1995) propuseram um esquema de classificação das beta-lactamases baseada na estrutura molecular da enzima, ficando as ESBL incluídas no grupo 2be. Neste grupo estão incluídos as enzimas capazes de hidrolisar todos os antibióticos beta-lactâmicos, com exceção das cefamicinas (cefotetina e cefotetan) e os carbapenems (imipenem e meropenem). O termo ESBL é usado hoje para denominar as beta-lactamases que são inibidas por ácido clavulânico.

Apesar de apresentar resistência aumentada a todos os beta-lactâmicos, as ESBL podem variar no padrão de resistência *in vitro*. A maioria das enzimas detectadas em amostra norte-americanas hidrolizam aztreonam e ceftazidima mais eficazmente do que cefotaxima e ceftriaxona. Deste modo, nos Estados Unidos, ceftazidima e aztreonam são os substratos que apresentam melhores resultados laboratoriais para detecção de cepas produtoras de ESBL. No Brasil esses dois grupos de substratos (ceftazidima/aztreonam e cefotaxima/ceftriaxona) apresentam resultados semelhantes (HONÓRIO et al., 2001; SADER, 2001).

De acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (2005), todas as cepas bacterianas que apresentam sensibilidade diminuída (halos de inibição reduzidos) a cefalosporinas de 3ª geração e ao aztreonam devem ser consideradas como possíveis produtoras de ESBL. Várias metodologias foram propostas para a detecção desta enzima, entre elas, o método da dupla difusão com discos, o método da adição de ácido clavulânico e o Etest, os quais fornecem resultados satisfatórios (EMERY & WEYMOUTH, 1997; PATERSON et al., 2001; PEREIRA et al., 2003; HARISH et al., 2007).

Diversos estudos demonstram o aumento no isolamento de cepas produtoras de ESBL. Em estudo realizado em San José, Costa Rica, 77% das cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de

pacientes pediátricos apresentaram resultado positivo para a produção de ESBL e 26,7% de *E. coli* também apresentaram o mesmo resultado (HERRERA et al., 2002). Em estudo realizado em Vitória, ES, 62,2% de *Klebsiella pneumoniae* e 17% *Escherichia coli* foram produtoras de ESBL (SILVA & SALVINO, 2000).

Cepas produtoras de ESBL constituem um grave problema em hospitais de todo o mundo, dificultando grandemente o tratamento. A falsa sensibilidade apresentada por estas cepas, nos testes de avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos *in vitro*, pode ter graves conseqüências para o paciente, uma vez que *in vivo*, as cefalosporinas de 3ª geração não apresentam a atividade esperada. A correta interpretação do antibiograma e a adoção de um teste confirmatório para a produção de ESBL podem minimizar este problema, orientando melhor o clínico, reduzindo custos, e também morbidade e mortalidade de pacientes hospitalizados.

Este trabalho teve como objetivos estabelecer a incidência de cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* produtoras de ESBL em um período de 2 anos, de janeiro de 2004 a dezembro de 2005 em um hospital universitário. Para a pesquisa foram utilizados dois métodos descritos na literatura, a técnica da dupla difusão e a técnica da adição de ácido clavulânico, cujos discos de antibióticos são comercializados pela Oxoid® (Basingstoke, Inglaterra). Assim foi possível comparar a habilidade de cada técnica em detectar a produção da enzima, além de estabelecer quais substratos são mais adequados para serem utilizados nos testes.

Métodos

Amostras

Foram incluídas neste estudo 152 amostras bacterianas, compostas por 114

amostras de *Escherichia coli* e 38 amostras de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de diversos materiais clínicos de pacientes atendidos em um hospital universitário no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2005. As amostras foram identificadas usando provas bioquímicas convencionais e armazenadas a -20°C.

Foram utilizados como controles positivo e negativo as cepas ATCC 700603 (*K. pneumoniae*) e ATCC 25922 (*E. coli*).

Triagem inicial das amostras

O tamanho dos halos de inibição de cada cefalosporina de terceira geração (ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima e cefpodoxima) e aztreonam foram medidos com o objetivo de analisá-los de acordo com os *breakpoints* utilizados como triagem inicial de cepas produtoras de ESBL estabelecidos pelo CLSI (2005) (Tabela 1). Este teste de triagem foi considerado positivo caso um dos substratos apresentasse halo de inibição inferior do que estes valores estabelecidos. Esta avaliação foi realizada com o objetivo de comparar os resultados das duas técnicas utilizadas no estudo com a recomendação do CLSI (padrão-ouro).

Tabela 1. Valores (*breakpoints*) utilizados para triagem inicial de cepas de *Klebsiella* sp e *E. coli* produtoras de ESBL (CLSI, 2002)

Antimicrobianos	Medida do halo de inibição (mm)
Cefotaxima	≤ 27
Ceftazidima	≤ 22
Cefpodoxima	≤ 17
Aztreonam	≤ 27
Ceftriaxona	≤ 25

Detecção da produção de ESBL

Para a realização dos testes de detecção da produção de ESBL as amostras foram subcultivadas em ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) suplementado com 5% de sangue de carneiro. Após crescimento foram

preparadas suspensões bacterianas em caldo Mueller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e ajustada a turbidez correspondendo a 0,5 da escala de McFarland. Após o preparo a suspensão foi semeada em placa (15 x 150 mm) de agar Mueller-Hinton.

Para a detecção de ESBL pelo teste da dupla difusão foram adicionados às placas semeadas os discos da marca Oxoid® de ceftriaxona (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefpodoxima (2 µg), ceftazidima (30 µg) e aztreonam (30 µg) distantes 25 mm de um disco de amoxicilina mais ácido clavulânico (20/10 µg) colocado no centro da placa. Após incubação a 35°C por 18 h as placas foram observadas e o surgimento de um halo de inibição (*ghost-zone*) adicional entre o disco contendo ácido clavulânico e qualquer disco de cefalosporina e/ou aztreonam foi considerado como positivo para produção de ESBL, bem como qualquer ampliação do halo de inibição destes discos.

Para detecção de ESBL pelo teste da adição de ácido clavulânico foram adicionados às placas semeadas com a suspensão bacteriana, discos da marca Oxoid® contendo as cefalosporinas de terceira geração mencionadas anteriormente além de discos contendo cefalosporinas mais ácido clavulânico, com exceção de ceftriaxona. Após incubação os halos de inibição de cada disco contendo somente a cefalosporina e também os discos contendo a cefalosporina e o inibidor de beta-lactamase foram medidos. O aumento no halo de inibição de 5 mm ou mais dos discos contendo cefalosporina mais ácido clavulânico, em relação ao disco contendo cada cefalosporina isoladamente, foi considerado indicativo da produção de ESBL.

Resultados

As bactérias selecionadas para o estudo eram provenientes de diversas amostras clínicas, com predomínio de urina (44%). A distribuição

percentual de cada amostra clínica pode ser observada na Figura 1.

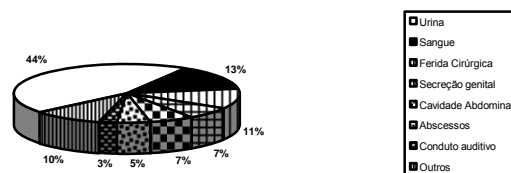


Figura 1. Distribuição percentual da origem das amostras bacterianas utilizadas para pesquisa de ESBL no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2005.

De acordo com a triagem inicial, foram consideradas produtoras de ESBL 74 amostras (48,7%), sendo 55 amostras (36,2%) de *E. coli* e 19 amostras (12,5%) de *K. pneumoniae*. Analisando separadamente cada espécie, 48,2% e 50% das amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae*, respectivamente, isoladas no período estudado foram consideradas produtoras de ESBL.

Todas as amostras que apresentaram resultados negativos na triagem realizada também apresentaram negatividade nos testes confirmatórios realizados posteriormente, o teste da adição de ácido clavulânico e dupla difusão.

O teste de adição de ácido clavulânico (Figura 2a) apresentou maior sensibilidade em relação ao teste da dupla difusão (Figura 2b). Do total de 74 amostras consideradas ESBL-positivo pela triagem inicial, apenas 18 (24,3%) apresentaram positividade para o teste da dupla difusão. A técnica da dupla difusão detectou apenas 12 das 19 amostras de *K. pneumoniae* consideradas ESBL-positivo pela triagem inicial. Para as amostras de *E. coli* a sensibilidade desta técnica foi ainda menor, detectando apenas 6 das 55 amostras ESBL-positivo, ou seja, 10,9% somente. Assim, a sensibilidade da técnica da dupla difusão para as amostras de *E. coli* foi bem menor daquela observada em *K. pneumoniae*, como demonstrado na Tabela 2. Por outro lado,

todas as 74 amostras selecionadas na triagem inicial apresentaram o mesmo resultado utilizando a técnica da adição de ácido clavulânico. A especificidade das duas técnicas foi de 100%.

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade das técnicas da Dupla Difusão (DD) e da Adição de Ácido Clavulânico (AAC) empregadas para detecção de ESBL em amostras de *K. pneumoniae* (n=38) e *E. coli* (n=114).

Técnica	Sensibilidade (%)		Especificidade (%)	
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
DD	63,2	10,9	100	100
AAC	100	100	100	100

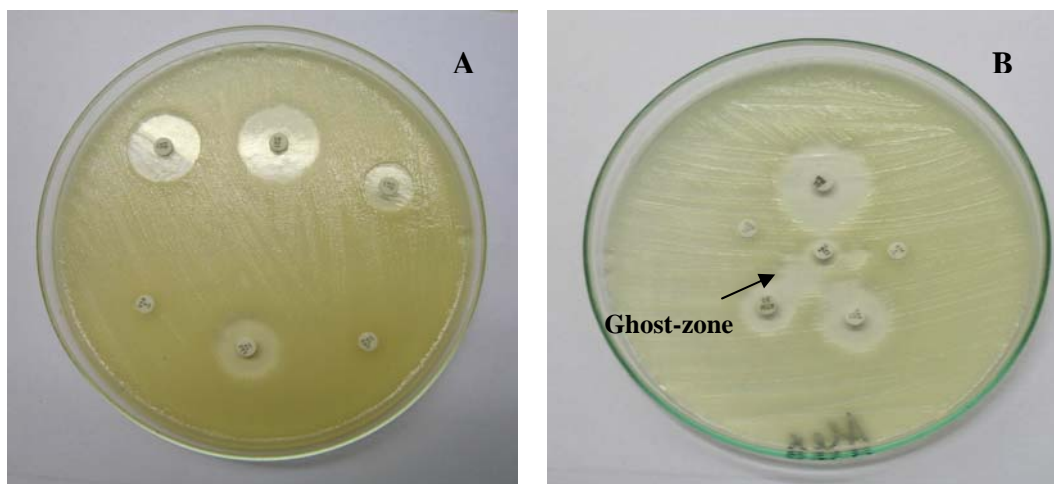


Figura 2. (A) Teste da adição de Ácido Clavulânico: os três discos superiores contém cefalosporinas de 3ª geração + Ácido Clavulânico e os três discos inferiores contém somente uma das cefalosporinas. O aumento em mais de 5 mm no disco contendo Ácido Clavulânico é indicativo da produção de ESBL. (B) Teste da Dupla Difusão com Discos: o aparecimento de uma zona intermediária entre os discos (*ghost-zone*) indica produção de ESBL.

Entre os três substratos utilizados na técnica da adição de ácido clavulânico o que apresentou maior sensibilidade para detecção de ESBL foi cefotaxima. Por outro lado, cefpodoxima apresentou a menor sensibilidade (Tabela 3).

Tabela 3. Sensibilidade e especificidade das cefalosporinas (substratos) Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ) e Cefpodoxima (CPD) para detecção de ESBL em amostras de *E. coli* (n=114) e de *K. pneumoniae* (n=38).

Técnica	Sensibilidade (%)		Especificidade (%)	
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
CTX	100	100	100	100
CAZ	94,7	92,7	100	100
CPD	63,2	60	100	100

Discussão

ESBL são enzimas capazes de inibir uma grande variedade de antibióticos, tais como cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona e aztreonam, entre outros. A detecção de patógenos produtores de ESBL possui importantes implicações para a escolha terapêutica. Além do grande valor clínico, a correta detecção destes microrganismos auxilia na escolha de medidas de controle das infecções hospitalares provocadas por microrganismos multi-resistentes. Entretanto, vários fatores podem dificultar a detecção de patógenos produtores de ESBL.

Um dos problemas mais comuns na detecção de patógenos produtores de ESBL é a diferença encontrada na afinidade com que as diversas cefalosporinas de terceira geração conseguem detectar a enzima inativadora. Essa ampla variedade de substratos dificulta a padronização de técnicas utilizadas para sua detecção laboratorial. Um mesmo microrganismo pode apresentar resultados distintos dependendo da cefalosporina utilizada para detecção de ESBL (DE CHAMPS et al., 2001). Confirmando o achado de outros autores (HONÓRIO et al., 2001; SADER, 2000), neste estudo a cefotaxima foi a cefalosporina de terceira geração que apresentou uma maior sensibilidade para detecção de ESBL nas cepas bacterianas.

Nesse estudo foram realizadas duas técnicas para detecção de ESBL e, mais uma vez, nossos resultados estão de acordo com a literatura consultada, ou seja, a melhor técnica para detecção de ESBL é a técnica da adição do ácido clavulânico. Essa superioridade da técnica pode ser devida à sua maior padronização e também à menor interferência de variáveis, comparando-se com a técnica da dupla difusão, onde a distância entre os discos é estritamente dependente da quantidade de enzima produzida por aquela cepa bacteriana em específico, dificultando assim padronização mais rigorosa e,

consequentemente, os resultados obtidos por tal técnica (PFALLER & SEGRETTI, 2006).

A predominância de amostras de urina é comum em hospitais de todo o mundo, entretanto, deve-se ressaltar que, apesar de comum, infecções urinárias podem representar grave problema para a saúde dos pacientes hospitalizados, uma vez que, a partir do trato urinário, o patógeno pode atingir tecidos mais profundos provocando doença infecciosa mais grave e de mais difícil tratamento, como bacteremias e pneumonias. Além disso, o arsenal terapêutico capaz de atingir níveis adequados nas vias urinárias é bastante reduzido, restringindo assim as opções terapêuticas e, consequentemente, representando um risco a mais para o paciente (KWAN & ONYETT, 2008).

Os dados obtidos demonstram a necessidade do emprego de técnicas adequadas para a detecção de cepas produtoras de ESBL. Qualquer uma das técnicas aqui utilizadas é acessível a qualquer laboratório de rotina e pode ser executada na mesma placa onde se realiza o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (antibiograma) de rotina, não requerendo tempo a mais de incubação e, portanto, possibilitando a liberação do laudo microbiológico no mesmo tempo que o exame de rotina. A detecção precoce é fundamental para a orientação terapêutica adequada e também no que diz respeito ao controle de infecções hospitalares provocadas por agentes multiresistentes.

O desenvolvimento desse trabalho e a padronização das técnicas para detecção de ESBL representou um grande auxílio para o diagnóstico microbiológico dos pacientes atendidos no hospital universitário. Com os dados obtidos foi possível adequar a rotina bacteriológica através da implantação da técnica da adição de clavulanato para a detecção de ESBL nas amostras bacterianas isoladas de

pacientes atendidos nessa instituição, auxiliando bastante o corpo clínico do hospital.

O trabalho conjunto do laboratório de microbiologia e da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar é considerado fundamental para a adoção de medidas eficazes no controle e prevenção de infecções nosocomiais em especial quando se trata de microrganismo multiresistentes. Desse modo, espera-se contribuir sobremaneira para tal finalidade.

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que a implantação de técnicas capazes de detectar adequadamente cepas bacterianas produtoras de ESBL é de grande importância para a orientação terapêutica, visto que a não detecção implica em prejuízos para o paciente que se encontra enfermo e também para a instituição hospitalar. A demora na melhora do quadro infeccioso se reflete em mais dias de leitos ocupados e também a utilização de antimicrobianos mais caros.

É importante estar atento às novas metodologias para que se possa implementar técnicas comprovadamente eficazes na detecção de ESBL. Nossos dados indicam que a técnica da Adição do Ácido Clavulânico é muito superior à técnica da Dupla Difusão, amplamente utilizada pelos laboratórios. É preciso também estar atento para a emergência de cepas que possam apresentar resultados variáveis em relação à cefalosporina utilizada para detecção de ESBL. Nesse ponto, é importante que se utilize uma variedade de substratos capazes de detectar as principais cepas produtoras de ESBL e essa escolha deve ser feita a partir de dados publicados a respeito da epidemiologia de infecções provocadas por estes microrganismos.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver qualquer potencial conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade deste trabalho científico.

Referências

Bush LM, Calmon J, Johnson CC. Newer penicillins and beta-lactamase inhibitors. *Infectious Disease Clinics of North America* 1995; 9(3):653-86.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Disk diffusion. 15th informational supplement. CLSI document M100-S15. Wayne, PA; 2005.

De Champs C, Monne C, Bonnet R. New TEM variant (TEM-92) produced by *Proteus mirabilis* and *Providencia stuartii* isolates. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2001; 45:1278-80. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.4.1278-1280.2001>

Emery CL, Weymouth LA. Detection and clinical significance of extended-spectrum -lactamases in a tertiary care medical center. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35:2061-7.

Harish BN, Menezes GA, Shekatkar S, Parija SC. Extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* from blood culture. *Journal of Medical Microbiology* 2007; 56:999-1000. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47072-0>

Herrera ML, Moya T, Vargas A. Cepas produtoras de beta lactamasa de efecto expandido en el Hospital Nacional de Niños. *Revista Medicina Hospital Nacional Niños* 2002; 37(1/2):19-27.

Honório LC, Santos IB, Assis AML, Santos Filho, L. Análise do perfil de resistência de enterobactérias produtoras de β -Lactamases de espectro ampliado (ESBL) isoladas em João Pessoa, PB. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 2001; 33(4):179-183.

Kwan CW, Onyett H. Community-acquired urinary tract pathogens and their resistance patterns in hospitalized children in southeastern Ontario

between 2002 and 2006. Paediatric and Child Health 2008; 13(9):759-62.

Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko WC, Goossens H, Von Gottberg A. et al. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. Clinical and Infectious Diseases 2000; 30(3): 473-478.
<http://dx.doi.org/10.1086/313719>

Pereira AS, Filho JRC, Tognim MCB, Sader HS. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial 2003; 39(4): 301-8.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442003000400007>

Pfaller MA, Segreti J. Overview of the Epidemiological Profile and Laboratory Detection of Extended-Spectrum b-Lactamases. Epidemiology and Detection of ESBLs CID 2006; 42 (Suppl 4):S153.

Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Brazilian Journal of Infection Diseases 2001; 5(4):200-14. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702001000400006>

Silva CHPM, Salvino CR. Importância do reconhecimento das Enterobactérias Hospitalares Produtoras de β -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) e suas implicações terapêuticas. NewsLab 2000; 41:104-12.