

Detecção de betalactamases de espectro ampliado em cepas uropatogênicas de *Escherichia coli* *

Detection of extended spectrum betalactamases in uropathogens strains of *Escherichia coli*

Suelen Favarin Filipin Dagostin¹ & Cleonice Maria Michelin²

RESUMO - As infecções do trato urinário (ITU) estão entre as mais frequentes patologias diagnosticadas em consultas clínicas. A *Escherichia coli*, uma enterobactéria gram negativa, é considerada o principal agente etiológico de ITU. O tratamento com antimicrobianos está sendo cada vez mais complicado, pois as bactérias produzem mecanismos de resistência contra esses medicamentos. O principal mecanismo é a produção de betalactamases, que são enzimas causadoras de hidrólise no anel betalactâmico de alguns antibióticos, tornando-os inativos. Dentre essas, destacam-se as betalactamases de espectro ampliado.

O objetivo desse estudo foi detectar a presença dessas enzimas em uroculturas positivas para *E.coli.*, retiradas de um laboratório privado do município de Criciúma – SC. As amostras foram coletadas durante uma semana, totalizando 31 amostras. Essas, foram submetidas ao teste de discos combinados para detecção de ESBL. Das 31 amostras, apenas 2 (6,45%) foram positivas. Conclui-se, então, que há baixa incidência dessa enzima em amostras de pacientes ambulatoriais.

PALAVRAS-CHAVE – Infecções do trato urinário, betalactamases, resistência bacteriana.

SUMMARY - *The urinary tract infections (UTI) are among the most common diseases diagnosed in clinical consultations. Escherichia coli, a Gram-negative enterobacterium, is considered the main etiological agent of UTI. Treatment with antibiotics is increasingly more complicated because the bacterium produce mechanisms of resistance against these drugs. The main mechanism is the production of beta-lactamases, enzymes that are causing the hydrolysis of beta-lactam ring of antibiotics, rendering them inactive. Among these, there are the beta-lactamases of extended spectrum.*

The objective of this study was to detect the presence of these enzymes in urine cultures positive for E. coli., Taken from a private laboratory in the town of Criciúma - SC. Samples were collected during a week, totaling 31 samples. These were tested with combination discs for detection of ESBL. Of the 31 samples, only two (6,45%) were positive. It follows, then, that there is low incidence of this enzyme in samples of outpatients.

KEYWORDS – *Urinary tract infection, betalactamases, bacterial resistance.*

¹ Acadêmica do curso de Farmácia da Universidade do extremo sul catarinense (UNESC – Criciúma);

² Professora do curso de Farmácia da Universidade do extremo sul catarinense (UNESC – Criciúma);

* Trabalho de conclusão de Curso de Graduação em Farmácia, Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC – Criciúma), 2011.

INTRODUÇÃO

A Infecção do Trato Urinário (ITU) caracteriza-se pela invasão e multiplicação bacteriana em qualquer segmento do aparelho urinário e pode ser causada por diferentes microrganismos (6). A *Escherichia coli* é um dos agentes microbianos mais comumente encontrados em ITU, sendo responsável por 75% dos casos (1).

O tratamento com antimicrobianos tem sido cada vez mais complexo devido aos mecanismos de resistência produzidos pelas bactérias (6). A resistência à antimicrobianos pode ocorrer devido ao uso indiscriminado desses fármacos, além disso, os microrganismos resistentes se espalham de pessoa a pessoa, o que contribui para a disseminação da resistência dentro de uma unidade de saúde (11). Considera-se que das bactérias que causam infecção hospitalar, aproximadamente 70% são resistentes a pelo menos uma das drogas comumente utilizadas para o tratamento das infecções (14).

O principal mecanismo de resistência utilizado pelas bactérias Gram-negativas é a produção de enzimas inativadoras, o que tem causado intensas preocupações aos profissionais de saúde (15). As enzimas mais importantes são as betalactamases, sendo capazes de hidrolisar o anel betalactâmico de cefalosporinas de terceira geração, penicilinas e outros antibióticos relacionados. Essas enzimas são comumente encontradas na família *Enterobacteriaceae* (4).

Dentre as betalactamases, destacam-se as betalactamases de espectro ampliado (ESBL). Sua produção é mediada por plasmídeos que atribuem ampla resistência aos antimicrobianos que contém o anel betalactâmico em sua estrutura. Estudos realizados em 2007, por Lartigue *et al.*, apontam a *E. coli* como principal produtora de ESBL (7). Essas enzimas têm sua ação hidrolítica anulada pelos inibidores de betalactamase como, por exemplo, o ácido clavulânico (17).

A produção de betalactamases não é detectada com facilidade em testes de sensibilidade realizados na rotina de um laboratório clínico, sendo necessária a realização de testes confirmatórios que detectem este fenótipo de resistência (10). Em pesquisa realizada por Pallecchi *et al.* em cidades do Perú e da Bolívia, de 54 cepas de *E. coli* com suscetibilidade diminuída para cefalosporinas, 50 apresentavam tipos diferentes de ESBL. (13)

Pacientes infectados por enterobactérias produtoras de ESBL não devem ser medicados com antibióticos betalactâmicos, pois pode haver falha terapêutica e agravamento do quadro infeccioso (17). É de grande importância detectar precocemente essas bactérias multirresistentes para que ocorra a realização do tratamento adequado e as medidas de isolamento dos pacientes, necessárias para impedir a proliferação destes patógenos em surtos comunitários e nosocomiais (10).

Nesse contexto, realizamos este trabalho para investigar a presença de betalactamases de espectro ampliado em cepas uropatogênicas de *Escherichia coli* presentes em amostras de urina coletadas de pacientes atendidos de um laboratório privado da cidade de Criciúma – SC.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das cepas de *Escherichia coli*

As cepas de *Escherichia coli* uropatogênicas foram cedidas por um laboratório privado do município de Criciúma – SC.

Foram coletados 31 isolados positivos para *E. coli*, obtidos de exames bacteriológicos de urina, durante 4 dias do mês de outubro de 2011. As cepas foram isoladas e identificadas por métodos utilizados pelo laboratório.

As placas, contendo as referidas uroculturas, foram transportadas em recipiente de paredes rígidas, com adição de barras de gelo reciclável para a manutenção da temperatura e encaminhadas ao laboratório de Microbiologia da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC.

Teste para detecção de ESBL

Após a coleta das amostras, as mesmas foram submetidas ao teste para confirmação da presença de ESBL, pelo método de discos combinados, recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (5). Este método baseia-se na inibição da hidrólise do substrato betalactâmico na presença de inibidores de betalactamases (5).

Foram utilizados discos de cefalosporinas (ceftazidima e cefotaxima, 30 µg cada), com e sem a adição de ácido clavulânico (10 µg) (5).

Para a realização desse método, fez-se uma suspensão equivalente a 0,5 na escala de McFarland (padrão), através do método de suspensão direta de colônias. A suspensão foi inoculada de forma homogênea com auxílio de swab em placas de ágar Mueller - Hinton e foram adicionados os quatro discos de cefalosporinas com e sem ácido clavulânico), com 3 cm de distância entre eles. Os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar classe 2. As placas foram incubadas a 33 - 35° C, por 18 - 24 horas (5).

Os resultados da produção de ESBL foram considerados positivos quando, após a leitura das placas, houve diferença maior ou igual a 5 mm entre os halos obtidos no disco combinado e no disco de cefalosporina isolado (5).

Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da UNESC, protocolo n° 291/2011 de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

RESULTADOS

Os halos obtidos após a realização do teste de discos combinados foram medidos e das 31 amostras analisadas, somente 2 (6,45%) foram positivas. Dessas, 1 apresentou diferença ≥ 5 mm entre os halos obtidos no disco de

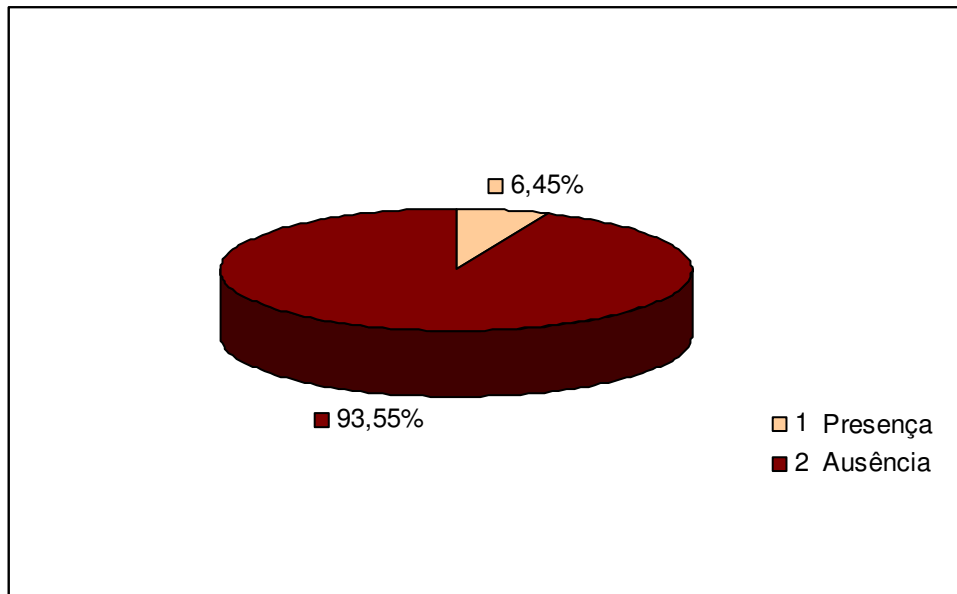
ceftazidima isolado e combinado e outra no disco de cefotaxima isolado e combinado, por sua vez as outras 29 (93,55%) foram negativas (Gráfico 1).
As medidas dos halos de cada amostra encontram-se na TABELA 1.

TABELA 1
Medidas dos halos obtidos para cada antibiótico nas 31 amostras de *E. coli* analisadas. Em evidência, as medidas das amostras positivas.

Amostra	Medidas dos halos, em mm, para cada antibiótico			
	CAZ	CAZ + CLV	CTX	CTX+CLV
1	31	33	36	36
2	25	27	32	32
3	27	29	30	31
4	29	29	34	34
5	22	24	16	19
6	30	31	33	33
7	29	30	33	33
8	28	29	31	31
9	27	29	30	30
10	31	32	35	35
11	31	35	36	36
12	28	29	31	32
13	25	27	30	30
14	27	30	32	32
15	29	32	35	35
16	30	30	35	32
17	29	30	31	30
18	27	27	32	35
19	27	27	31	31
20	26	29	31	32
21	29	30	34	34
22	25	28	32	30
23	27	29	32	32
24	27	30	32	33
25	28	28	31	32
26	13	19	16	18
27	29	29	31	31
28	27	28	31	31
29	22	22	30	30
30	26	30	27	33
31	31	32	34	35

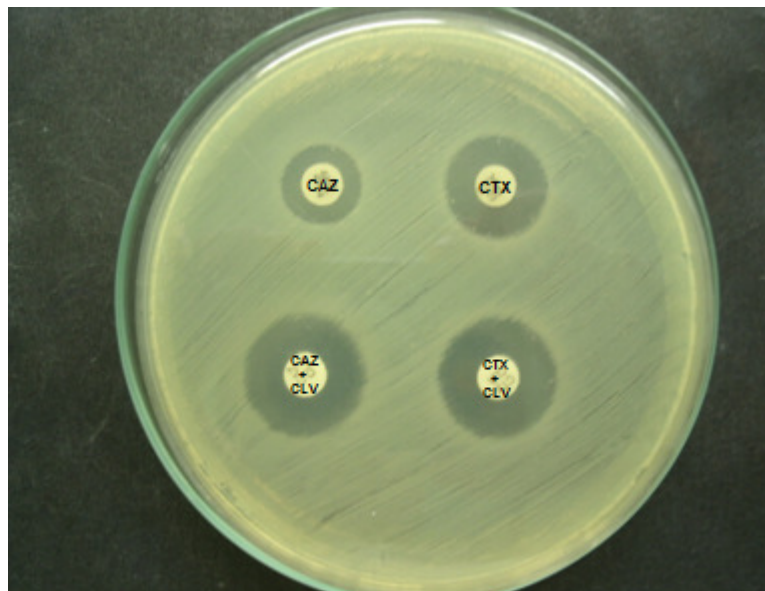
* (CAZ) Ceftazidima; (CAZ+CLV) Ceftazidima + Ác. clavulânico; (CTX) Cefotaxima; (CTX+CLV) Cefotaxima + Ác. clavulânico.

GRÁFICO 1
Porcentagem de amostras com presença e ausência de ESBL.



A FIGURA 1 mostra uma placa em que foram realizados os teste de detecção de ESBL (método de discos combinados).

FIGURA 1
Amostra positiva para ESBL. Apresenta diferença $\geq 5\text{mm}$ entre os halos dos discos de CAZ e CAZ + CLV.



DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Um dos maiores problemas encontrados em saúde pública, nos dias de hoje, é a produção de mecanismos de resistência bacterianos. A produção de betalactamases de espectro ampliado é considerado o principal mecanismo, podendo levar o paciente acometido ao óbito (15).

O tratamento com antimicrobianos em pacientes com infecções causadas por cepas produtoras de ESBL fica restrito a poucos agentes de amplo espectro de ação (17). As bactérias isoladas que possuem maior frequência na produção de ESBL são *E. coli* e *Klebsiela pneumoniae* (17). A prevalência de ESBL varia de acordo com a região e com o local de coleta das amostras, se ambulatoriais ou hospitalares (16). Bactérias isoladas de ambiente hospitalar apresentam maior resistência que as isoladas de ambulatórios (8).

Neste trabalho avaliou-se 31 amostras de *E. coli*, submetendo-as ao teste para detecção de ESBL e obteve-se positividade em apenas 2 amostras (6,45%). Foi encontrada diferença ≥ 5 mm entre os halos obtidos de ceftazidima associada e não-associada a ác. clavulânico em umas das amostras positivas e, na outra, essa diferença foi encontrada entre os discos de cefotaxima associada e não-associada a ác. clavulânico, o que segundo Martins e Picolli (2011), já é suficiente para constatar resultado positivo para a produção da enzima (9). Em estudos realizados por Soares *et al.*, em 2005, foram analisados 51 isolados de *E. coli*, encontrando 2 positivos para ESBL (16). A baixa prevalência de positividade ocorre devido ao fato de as amostras avaliadas nesses estudos serem provenientes de laboratórios privados que atendem principalmente pacientes ambulatoriais.

Em uma pesquisa realizada com amostras de *E. coli* provenientes de um hospital observou-se maior índice de produção de ESBL, sendo 124 (15,76%) positivas, das 787 amostras analisadas (15). Esses dados demonstram a maior incidência de cepas produtoras dessa enzima quando as culturas são provenientes de hospitais, sendo reportada uma prevalência de 9% de *E. coli* produtora de ESBL (16).

Estudos realizados em Trinidad e Tobago no ano de 2008 confirmaram a presença de ESBL em 9,3% de 716 amostras de *E. coli* isoladas (2).

A pesquisa fenotípica desse mecanismo enzimático é importante tanto no contexto epidemiológico quanto no terapêutico, para que se possa impedir o surgimento de surtos e falhas no tratamento (9). A resistência aos antibióticos aumenta cada vez mais no mundo inteiro, o que caracteriza um grande problema de saúde pública que contribui para o aumento da mortalidade em pacientes hospitalizados (12). O uso indiscriminado de antimicrobianos betalactâmicos tem contribuído para o incremento dessas cepas (15). As taxas de *E. coli* produtoras de ESBL no Brasil (9,1%), são maiores que as encontradas em outras partes do mundo. Dados do *Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY) mostram: América Latina = 8,5%, Canadá = 8,2%, EUA = 3,3%, perdendo apenas para a Europa, com 11,1% (9).

Medidas simples podem servir para a diminuição dos índices de infecção causados por bactérias produtoras de ESBL, como a terapêutica adequada e racional, adoção de medidas de higiene pelos profissionais de saúde e especialmente o rápido isolamento dos pacientes afetados (15). É muito importante o trabalho em conjunto do analista clínico com o profissional

responsável por prescrever o antibiótico, para que se possa evitar a prescrição de um medicamento ineficaz ao paciente, além de evitar gastos desnecessários e colaborar para a diminuição da resistência (16).

Os resultados obtidos nesse estudo alertam para a necessidade de maiores investigações no município de Criciúma – SC, com número maior de amostras e obtenção de cepas hospitalares que podem refletir índices mais elevados de resistência aos betalactâmicos, por produção de ESBL.

Esse fenótipo de resistência possui uma incidência considerável, principalmente em ambiente hospitalar, podendo disseminar-se muito rapidamente. Portanto, é de extrema importância a realização por parte dos laboratórios clínicos de testes que detectem a presença dessa enzima, como o teste de disco aproximação, recomendado pelo CLSI, contribuindo para o adequado tratamento dos pacientes acometidos.

AGRADECIMENTOS

À coordenação do curso de Farmácia, pelo apoio financeiro;
À professora Cleonice Maria Michelin, pelo auxílio na realização desse estudo.

REFERÊNCIAS

1. AMADEU, A. R. O. R. M.; SUCUPIRA, J. S.; JESUS, R. M. M.; ROCHA, M. L. P. - **Infecções do Trato Urinário: análise da frequência e do perfil de sensibilidade da *Escherichia coli* como agente causador dessas infecções.** Rev. Bras. Anál. Clín., 41 (4): 275-277, 2009.
2. AKPAKA, P. E.; SWANSTON, W. H. - **Phenotypic Detection and Occurrence of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* at a Tertiary Hospital in Trinidad & Tobago.** The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 12 (6): 516-520, 2008.
3. BRAIOS, A.; TURATTI, T. F.; MEREDIJA, L. C. S.; CAMPOS, T. R. S.; DENADAI, F. H. M. - **Infecções do trato urinário em pacientes não hospitalizados: etiologia e padrão de resistência aos antimicrobianos.** J. Bras. Patol. Med. Lab., 45 (6): 449-456, 2009.
4. CHAUDHARY, U; AGGARWAL, R. - **Extended spectrum β -lactamases (ESBL) – An emerging threat to clinical therapeutics.** Indian Journal of Medical Microbiology, 22 (2): 75-80, 2004.
5. CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing-Table, M100-S19.** Wayne, PA, USA, 2009.

6. LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. - **Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 43 (4): 430-434, 2010.
7. LARTIGUE, M. F.; ZINSIUS, C.; WENGER, A.; BILLE, J.; POIREL, L.; NORDMANN, P. - **Extended-Spectrum β -Lactamases of the CTX-M Type Now in Switzerland.** Antimicrob. Agents Chemother., 51 (8): 2855-2860, 2007.
8. MALDANER, N. I.; CAVALLI, V.; ROSSI, E. M.; SCAPIN, D.; SARDIGLA, C. U. - **Perfil Antimicrobiano de Cepas de *Escherichia coli* Isolados de Pessoas com Suspeita de Infecção do Trato Urinário.** Rev. Bras. Anál. Clín., 43 (2): 145-147, 2011.
9. MARTINS, A. C.; PICOLI, S. U. - **Métodos alternativos para detecção de betalactamase de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.** J. Bras. Patol. Med. Lab., 47 (4): 421-426, 2011.
10. MENEZES, E. A.; ALENCAR, A. M.; CUNHA, F. A.; ÂNGELO, M. R. F.; SALVIANO, M. N. C.; OLIVEIRA, I. R. N. - **Freqüência de cepas produtoras de enzima beta lactamase de espectro expandido (ESBL) e perfil de susceptibilidade de *Klebsiella pneumoniae* em hemoculturas no berçário de um hospital de Fortaleza.** Rev. Bras. Anál. Clín., 40(1): 7-11, 2008.
11. MULVEY, M. R.; SIMOR, A. E. - **Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be?** CMAJ, 180 (4): 408-415, 2009.
12. OLIVEIRA, F. A.; NOGUEIRA, K. S. – **Resistência a Fluoroquinolonas em *Escherichia coli* isoladas em cultura de urina.** Rev. Bras. Anál. Clín., 43 (2): 152-154, 2011.
13. PALLECCHI, L.; BARTOLONI, A.; FIORELLI, C.; MANTELLA, A.; MAGGIO, T. D.; GAMBOA, H.; GOTUZZO, E.; KRONVALL, G.; PARADISI, F.; ROSSOLINI, G. M. - **Rapid Dissemination and Diversity of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase Genes in Commensal *Escherichia coli* Isolates from Healthy Children from Low-Resource Settings in Latin America.** Antimicrob. Agents Chemother., 51 (8): 2720-2725, 2007.
14. RAPINI, L. S.; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. – **Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus sp.* isoladas de queijo tipo coalho.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 56 (1): 130-133, 2004.
15. SANTOS, S. B. - **Incidência de Enterobactérias produtoras de Betalactamase de Espectro Estendido (ESBL) em um Hospital do Município de Duque de Caxias –RJ.** Rev. Bras. Anál. Clín., 41 (4): 251-255, 2009.

16. SOARES, G.; MOURA, J. U.; SAUCEDO, E. M.; PEREIRA, R. S.; SANTOS, R. C. V. - **Prevalência de beta lactamases de espectro ampliado (ESBL) em enterobactérias isoladas do trato urinário de pacientes ambulatoriais de Santa Maria – RS.** *Disciplinarum Scientia*, 6 (1): 45-52, 2005.
17. SOUSA JUNIOR, M. A.; FERREIRA, E. S.; CONCEIÇÃO, G. C. - **Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico.** *NewsLab*, 63: 152-174, 2004.