MARINA DE SOUZA BASTOS

Alta frequência de ESBL em diferentes clones de *Enterobacter* spp. produtores de AmpC. Dificuldade de detecção laboratorial e suas implicações

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Profª. Dr.ª Maria Cristina Bronharo Tognim

Maringá

2012

Alta frequência de ESBL em diferentes clones de *Enterobacter* spp. produtores de AmpC. Dificuldade de detecção laboratorial e suas implicações

RESUMO

Enterobacter spp. são microrganismos causadores de infecções hospitalares e comunitárias de difícil tratamento devido à sua alta resistência antimicrobiana. Como principal mecanismo de resistência às cefalosporinas, possuem enzimas do tipo AmpC e ESBL associadas. O objetivo do presente estudo foi avaliar qual o melhor e mais simples método fenotípico para detecção de ESBL em diferentes clones de *Enterobacter* spp. isolados consecutivamente em um hospital terciário brasileiro, bem como discutir suas implicações em relação ao tratamento de infecções causadas por estes isolados na vigência de diferentes pontos de corte para a sensibilidade à cefepima estabelecidos por comitês internacionais. A identificação e a sensibilidade aos antimicrobianos de uso clínico foram realizados pelo sistema automatizado Phoenix-BD. A confirmação da sensibilidade aos carbapenêmicos e cefalosporinas foi realizada pelo método de diluição em ágar. Quatro métodos fenotípicos foram realizados para detecção de ESBL em todos os isolados: (1) discos de ceftazidima e cefotaxima com e sem ácido clavulânico, ambos adicionados de ácido borônico, (2) disco aproximação, utilizando cefepima e amoxacilina/ácido clavulânico, (3) screening de ESBL pela CIM ≥16 μg/mL para cefepima e (4) screening de ESBL pela CIM ≥2 μg/mL para cefepima. Testes genotípicos para confirmação de β-lactamases foram realizados por PCR e a genotipagem das amostras foi feita pela técnica de ERIC-PCR. Para as 80 amostras estudadas obtivemos os seguintes resultados: 14 clones distintos, sendo o clone H o mais comum, constituído de 23 isolados nos quais 65% eram produtores de ESBL; os antimicrobianos mais efetivos foram meropenem e imipenem; nenhuma amostra foi produtora de MβL ou de KPC genotipicamente; pela PCR-Multiplex 69% das amostras eram produtoras de ESBL, sendo que 13% foram sensíveis a todas às cefalosporinas e carreavam o gene blaTEM; o screening de ESBL pela CIM ≥2 μg/mL para cefepima (método 4) obteve melhor combinação entre sensibilidade (82%) e especificidade (92%), seguido dos métodos três, um e dois. O nosso estudo demonstra que em laboratórios que utilizam de método de diluição para a determinação da sensibilidade aos antimicrobianos, a adoção dos pontos de corte estabelecidos pelo EUCAST para cefepima seriam mais adequados para a detecção de ESBL em amostras produtoras de AmpC. Já, laboratórios que utilizam apenas a metodologia de disco difusão, a utilização do ácido borônico, descrita no método 1, seria uma boa alternativa para detecção de ESBL. Estudosclínicos que avaliem o tratamento com cefepima para infecções causadas por amostras

produtoras de AmpC e ESBL são necessários para determinação de melhores alternativas terapêuticas.

Palavras-chave: Enterobacter spp., AmpC, ESBL, detecção laboratorial, cefalosporinas

High frequency of ESBL in different clones of AmpC producing *Enterobacter* spp. difficulty in laboratory detection and their implications

ABSTRACT

Enterobacter spp. are microorganisms that cause nosocomial and community infections of difficult treatment due their high antimicrobial resistance. As the main mechanism of resistance to cephalosporins they have enzymes AmpC and ESBL type associated. The aim of this study was to evaluate which one best and simplest method for phenotypic detection of ESBL in different clones of *Enterobacter* spp. Consecutively isolated in a Brazilian tertiary hospital and to discuss their implications for the treatment of infections caused by these isolates in the presence of different cutoff points for sensitivity to cefepime established by international committees. The identification and susceptibility to antimicrobial of clinical use were performed by the BD-Phoenix automated system. Confirmation of sensitivity to carbapenems and cephalosporins was performed by the agar dilution method. Four phenotypic methods have been performed for detection nof ESBL in all isolates: (1) ceftazidime and cefotaxime discs with and without clavulanate, both added the boronic acid, (2) disc approximation using cefepime and amoxicillin/clavulanate, (3) ESBL screening by MIC ≥16 mg/mL for cefepime and (4) ESBL screening by MIC ≥2 mg/mL for cefepime. Genotypic testing for confirmation of β-lactamases were performed by PCR and genotyping of the samples was performed by ERIC-PCR technique. For the 80 samples studied obtained the following results: 14 distinct clones, the clone H being the most common, consisting of 23 isolates of which 65% were ESBL producers; the most effective drugs were imipenem and meropenem; no sample was producer of MβL and KPC genotypically; by Multiplex-PCR 69% of samples were ESBL-producing, and of these 13% were susceptible to all cephalosporins and carried the gene blaTEM; ESBL screening by MIC ≥2 mg/mL for cefepime (method 4) had the best combination of sensitivity (82%) and specificity (92%), followed by the three, one and two methods. Our study shows that in laboratories that use dilution method for the determination of antimicrobial susceptibility, the adoption of the cutoff points established by EUCAST for cefepime was more suitable for the detection of ESBL-producing AmpC samples. Already, laboratories which use only the disk diffusion method, the use the boronic acid, as described in method 1, it would be a good alternative for detection of ESBL. Clinical studies that evaluate treatment with cefepime for infections caused by strains producing AmpC and ESBL are necessary to determine the best therapeutic options.

Keywords: *Enterobacter* spp., AmpC, ESBL, laboratory detection, cephalosporins