



EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE
ON ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica

Versão 1.0

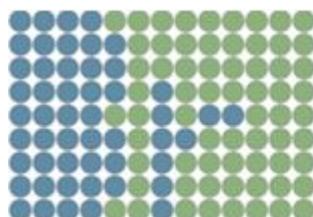
Dezembro 2013

EUCAST subcommittee for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance:

Christian G. Giske (Sweden, EUCAST Steering Committee and EARS-Net Coordination Group; chairman), Luis Martinez-Martinez (Spain, EUCAST Steering Committee), Rafael Cantón (Spain, chairman of EUCAST), Stefania Stefani (Italy), Robert Skov (Denmark, EUCAST Steering Committee), Youri Glupczynski (Belgium), Patrice Nordmann (France), Mandy Wootton (UK), Vivi Miriagou (Greece), Gunnar Skov Simonsen (Norway, EARS-Net Coordination Group), Helena Zemlickova (Czech republic, EARS-Net Coordination Group), James Cohen-Stuart (The Netherlands) and Marek Gniadkowski (Poland).

Versão para o Português

Janeiro 2015



BrCAST

Brazilian Committee on
Antimicrobial Susceptibility Testing

Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos

Conteúdo

Seção

	Página
1. Introdução	3
2. <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de carbapenemases	4
3. <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de β -lactamases de espectro estendido	11
4. <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de β -lactamases AmpC adquiridas	20
5. <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à Meticilina (Oxacilina)	24
6. <i>Staphylococcus aureus</i> não sensíveis aos glicopeptídeos	27
7. <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> resistentes à Vancomicina	31
8. <i>Streptococcus pneumoniae</i> não sensíveis à Penicilina	36
9. Declaração de transparência	39

1. Introdução

Estas diretrizes foram elaboradas em parte em resposta às perguntas mais frequentes dos usuários das diretrizes EUCAST e, em parte, a pedido do Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC), uma vez que era necessária orientação especializada para atualizar o manual de microbiologia da EARS-Net. O objetivo do subcomitê do EUCAST foi desenvolver orientações práticas para a detecção de mecanismos específicos de resistência a antimicrobianos, de importância clínica e / ou epidemiológica.

O documento foi desenvolvido principalmente para uso rotineiro em laboratórios de análises clínicas e não abrange os procedimentos técnicos para identificação de mecanismos de resistência a nível molecular por laboratórios de referência ou especializados. No entanto, grande parte do conteúdo também é aplicável a laboratórios nacionais de referência. Além disso, é importante notar que este documento não inclui a triagem de portadores assintomáticos (colonização) de microrganismos multirresistentes ou a detecção direta em amostras clínicas.

Todos os capítulos deste documento contêm uma definição do mecanismo ou resistência específica, uma explicação da necessidade clínica e / ou de saúde pública para a detecção do mecanismo ou resistência específica, uma descrição sucinta dos métodos recomendados de detecção, e as referências das descrições detalhadas dos métodos. A necessidade de identificação do mecanismo de resistência e o nível de identificação necessários para fins de controle de infecção ou saúde pública podem variar geograficamente e temporalmente, dependendo da prevalência e da heterogeneidade dos diferentes mecanismos de resistência. As diretrizes foram desenvolvidas através da realização de pesquisas bibliográficas no PubMed, e as recomendações são baseadas em estudos multicêntricos ou múltiplos estudos individuais. Vários métodos atualmente em desenvolvimento não foram incluídos nas diretrizes, uma vez que avaliações multicêntricas ou múltiplas avaliações individuais ainda não foram concluídas. Versões preliminares destas diretrizes foram objeto de ampla revisão através de listas de consultores do EUCAST, do site do EUCAST e consultores do ECDC.

Tanto quanto possível foram utilizados termos genéricos para os produtos apresentados no documento, mas excluir todos os nomes de produtos específicos teria tornado algumas das recomendações pouco claras. Deve-se notar que alguns mecanismos de resistência nem sempre conferem resistência clínica. Assim, enquanto a detecção desses mecanismos pode ser relevante para o controle de infecção e de saúde pública, pode não ser necessária para fins clínicos. Em consequência, para alguns mecanismos, especialmente β -lactamase de espectro estendido e carbapenemases em bacilos Gram-negativos, a detecção do mecanismo em si não leva à classificação como resistente. Por fim, a relevância da busca de várias β -lactamases transferíveis, quando já foram detectadas outras enzimas com um espectro mais amplo, é duvidosa.

Christian G. Giske
Chairman of the subcommittee

Rafael Cantón
Chairman of EUCAST

2. *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases

Importância da detecção do mecanismo de resistência	
Necessário para categorização de sensibilidade antimicrobiana	Não
Controle de infecção	Sim
Saúde pública	Sim

2.1 Definição

Carbapenemases são β -lactamases que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas na maioria dos casos, e em vários graus carbapenêmicos e monobactâmicos (estes últimos não são hidrolisados por metalo- β -lactamases).

4

2.2 Importância clínica e/ou epidemiológica

O problema da disseminação de carbapenemases na Europa data da segunda metade da década de 1990 em vários países mediterrâneos, e foi observada principalmente em *P. aeruginosa* (1). No início dos anos 2000, a Grécia viveu uma epidemia de Verona metalo- β -lactamase (VIM), codificada por integrons, em *K. pneumoniae* (2), seguido por uma epidemia relacionada a *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC), que é atualmente a carbapenemase mais comum na Europa entre as *Enterobacteriaceae* (1). Na Grécia e na Itália em torno de 60 e 15%, respectivamente, das *K. pneumoniae* invasivas são atualmente não sensíveis aos carbapenêmicos (3). Em outros países europeus vários surtos têm sido relatados, mas o problema não tem sido amplamente observado em isolados invasivos (1). Outras carbapenemases particularmente problemáticas são as New Delhi metalo- β -lactamases (NDMs), que são altamente prevalentes no subcontinente indiano e no Oriente Médio e em várias ocasiões tem sido importadas para a Europa. As enzimas OXA-48-like têm causado surtos em vários países da Europa e atualmente estão se espalhando rapidamente (1). As carbapenemases são uma fonte de preocupação, pois podem conferir resistência a praticamente todos os β -lactâmicos, cepas produtoras de carbapenemases frequentemente possuem mecanismos de resistência a uma ampla gama de agentes antimicrobianos e infecções por *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemase estão associados a altas taxas de mortalidade (4-6).

2.3 Mecanismos de resistência

A grande maioria das carbapenemases são enzimas adquiridas, codificadas por genes localizados em elementos transponíveis localizados em plasmídeos. As carbapenemases são expressas em vários níveis e diferem significativamente tanto em relação às características bioquímicas quanto em relação à sua atividade contra β -lactâmicos específicos. O nível de expressão, as propriedades das β -lactamases e a associação frequente com outros mecanismos de resistência (outras β -lactamases, efluxo e / ou permeabilidade alterada) resultam numa ampla gama de fenótipos de resistência observados entre isolados produtores de carbapenemase (7, 8). A redução da sensibilidade aos carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae* pode, no entanto, também ser causada por β -lactamases de espectro estendido (ESBL) ou enzimas AmpC quando coexiste diminuição da permeabilidade devido à alteração ou redução da expressão de porinas (9).

A maioria dos produtores de carbapenemase é resistente às cefalosporinas de espectro estendido (oxiimino) (10). Isolados produtores dessas enzimas podem ter diminuição de sensibilidade aos carbapenêmicos, mas com algumas dessas enzimas (enzimas OXA-48-like) os organismos podem aparecer totalmente sensíveis às cefalosporinas. No entanto, muitos desses isolados podem expressar também enzimas que hidrolisam cefalosporinas, como CTX-Ms, e serem resistentes às cefalosporinas. Carbapenemases são consideradas de grande importância epidemiológica, particularmente quando conferem redução da sensibilidade a qualquer um dos carbapenêmicos (imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem), ou seja, quando as CIMs estão acima dos valores dos pontos de corte epidemiológicos (ECOFF) definidos pelo EUCAST (11).

2.4 Métodos recomendados para a detecção de carbapenemases em *Enterobacteriaceae*

2.4.1 Triagem para produção de carbapenemases

As CIMs de carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemase podem estar abaixo dos pontos de corte clínicos (10, 11, 13). No entanto, os valores de ECOFF definidos pelo EUCAST podem ser utilizados para detectar produtores de carbapenemase. Meropenem oferece a melhor combinação entre sensibilidade e especificidade em termos de detecção de produtores de carbapenemase (10, 14). Ertapenem tem excelente sensibilidade, mas pouca especificidade, particularmente em espécies como *Enterobacter* spp., devido à sua relativa instabilidade frente às β-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e β-lactamases AmpC em associação com perda de porina (10). Os valores de corte apropriados para a detecção de possíveis produtores de carbapenemase são mostrados na Tabela 1. Deve-se notar que, a fim de aumentar a especificidade, os pontos de corte para imipenem e ertapenem correspondem a uma diluição acima dos ECOFFs atualmente definidos.

Tabela 1. Pontos de corte clínicos e para triagem de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases (de acordo com a metodologia do EUCAST).

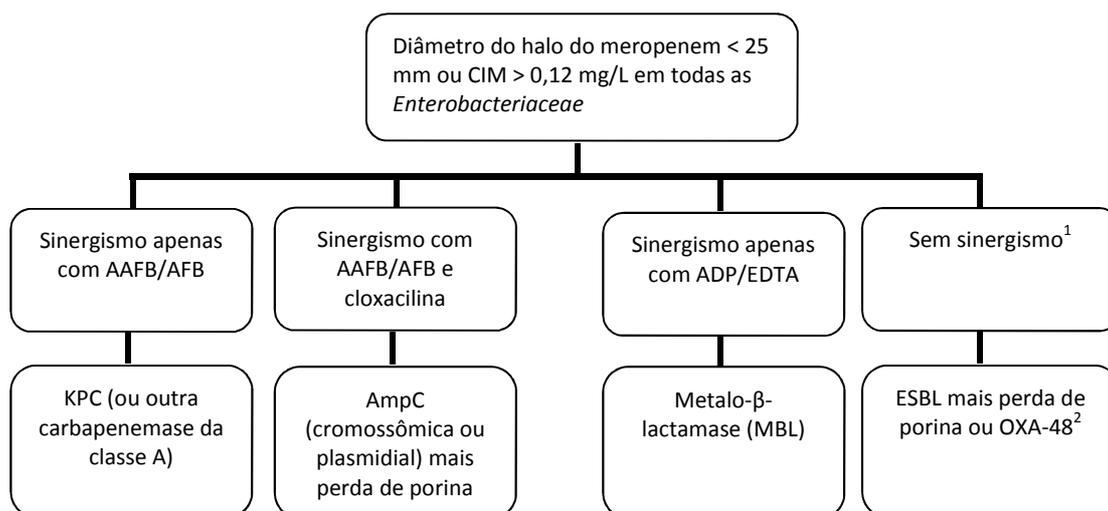
Carbapenêmico	CIM (mg/L)		Diâmetro do halo de inibição (mm) com discos de 10 µg	
	Valor de corte S/I	Valor de corte para triagem	Valor de corte S/I	Valor de corte para triagem
Meropenem ¹	≤2	>0,12	≥22	<25 ²
Imipenem ³	≤2	>1	≥22	<23
Ertapenem ⁴	≤0,5	>0,12	≥25	<25

1 Melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade
 2 Em alguns casos os diâmetros dos halos de inibição de produtores de OXA-48 são até 26 mm; portanto <27 mm pode ser usado como um valor de triagem em países onde OXA-48 é endêmica, mas às custas de menor especificidade.
 3 Com imipenem, a separação entre o tipo selvagem e produtores de carbapenemase é pouco confiável. Imipenem, portanto, não é recomendado para uso como um composto de teste de triagem isoladamente.
 4 Elevada sensibilidade, mas baixa especificidade, e, portanto, não é recomendado para uso rotineiro.

2.4.2 Métodos para a confirmação da produção de carbapenemases

Uma vez detectada sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos nos testes de sensibilidade de rotina, os métodos fenotípicos para detecção de carbapenemases devem ser aplicados. O teste do disco combinado tem a vantagem de ser bem validado em estudos e também estar disponível comercialmente (MAST, Reino Unido; Rosco, Dinamarca) (15-17). Os discos de meropenem +/- vários inibidores estão detalhados na seção 2.4.3. Resumidamente, o ácido borônico inibe carbapenemases da classe A e o ácido dipicolínico inibe carbapenemases classe B. Não há nenhum inibidor atualmente disponível para carbapenemases classe D. Cloxacilina, que inibe β -lactamases AmpC, foi adicionada aos testes para diferenciar entre hiperprodução de AmpC com perda simultânea de porinas e produção de carbapenemase. O algoritmo para a interpretação desses testes com inibidores está descrito na Figura 1. A principal desvantagem é que eles podem demorar 18 horas (na prática a incubação é feita durante a noite), por essa razão novos métodos rápidos estão sendo atualmente pesquisados.

Figura 1. Algoritmo para detecção de carbapenemases.



Abreviaturas: AAFB = ácido aminofenilborônico, AFB = ácido fenilborônico, ADP = ácido dipicolínico, EDTA = ácido etilendiamino tetra-acético (todos eles inibidores β -lactamase adicionados a discos contendo meropenem em ensaios de teste de disco combinado).

¹ Combinação de KPC e MBL pode não mostrar o sinergismo, mas os isolados normalmente são altamente resistentes aos carbapenêmicos. Eles são mais fáceis de detectar com os métodos moleculares.

² Alto nível de resistência à temocilina [CIM > 32 mg / L (12, 18), diâmetro do halo (em fase de avaliação) < 11 mm, com disco de temocilina de 30 μ g (17)] é indicador fenotípico de produção de OXA-48, que deve ser considerado na ausência de sinergismo com inibidores de carbapenemases das classes A e B.

Existem atualmente várias alternativas mais rápidas ao método do disco combinado. A análise da hidrólise de carbapenêmicos com MALDI-ToF MS (19) tem sido descrita como capaz de confirmar a produção de carbapenemase em algumas horas, e o teste Carba NP (20, 21) pode confirmar a produção carbapenemase ainda mais rapidamente. No entanto, desses testes, há evidências publicadas apenas para o teste Carba NP em outros centros além daquele no qual foi desenvolvido. Uma publicação indica elevadas sensibilidade e especificidade (22), enquanto em outra publicação foram observados problemas de sensibilidade para os isolados com fenótipo mucóide e algumas *Enterobacteriaceae* produtoras de OXA-48 (23).

Várias abordagens genotípicas têm sido relatadas com base em técnicas de PCR (24).

Esses métodos, no entanto, têm a desvantagem de não serem capazes de identificar novas variantes de β-lactamases, e podem ser considerados de custo elevado em algumas situações (10). Métodos de *microarray* de DNA comercialmente disponíveis podem aumentar a facilidade de uso desses testes (25), embora eles não possam superar as limitações gerais das técnicas genotípicas. Recomenda-se que, pelo menos, os laboratórios de referência tenham acesso a técnicas de confirmação genotípicas, embora isso não seja estritamente necessário para fins de vigilância.

2.4.3 Interpretação dos métodos fenotípicos de detecção

O algoritmo na Tabela 2 permite a diferenciação entre metalo-β-lactamases, carbapenemases da classe A, carbapenemases da classe D e não carbapenemases (ESBL e / ou AmpC mais perda porina). Os testes podem ser feitos com o método de disco-difusão, do EUCAST, para organismos não exigentes. Testes comerciais devem ser realizados de acordo com as instruções do respectivo fabricante.

Até o momento não existem inibidores disponíveis para as enzimas OXA-48-like. Alto nível de resistência à temocilina (CIM > 32 mg/L) tem sido proposto como um marcador fenotípico para os produtores de carbapenemase OXA-48-like (12, 17, 18). No entanto, este marcador não é específico para carbapenemases do tipo OXA-48, uma vez que outros mecanismos de resistência podem conferir este fenótipo. A presença de enzimas OXA-48-like, portanto, deve ser confirmada com um método genotípico.

A utilização do teste Hodge modificado não é recomendada, uma vez que os resultados são difíceis de interpretar, a especificidade é baixa e, em alguns casos, a sensibilidade não é ideal (10). Algumas novas modificações da técnica têm sido descritas, mas elas são trabalhosas para uso em laboratórios clínicos de rotina e não resolvem todos os problemas de sensibilidade e especificidade.

Tabela 2. Interpretação dos testes fenotípicos (carbapenemases em *negrito*) por métodos de disco-difusão. As definições exatas de sinergismo são fornecidas em bulas para os vários produtos comerciais.

β-lactamase	Sinergismo observado como aumento do halo de inibição (mm) com disco de meropenem (10 µg)				CIM de temocilina >32 mg/L ou diâmetro do halo de inibição <11 mm
	ADP/EDTA	AAFB/AFB	ADP+AAFB	CLX	
MBL	+	-	-	-	Variável ¹
KPC	-	+	-	-	Variável ¹
MBL + KPC²	Variável	Variável	+	-	Variável ¹
OXA-48-like	-	-	-	-	Sim
AmpC + perda de porina	-	+	-	+	Variável ¹
ESBL + perda de porina	-	-	-	-	Não

Abreviaturas: MBL = metalo-β-lactamase, KPC = Carbapenemase de *Klebsiella pneumoniae*, ADP = ácido dipicolínico, EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético, AAFB = ácido aminofenilborônico, AFB = ácido

fenilborônico, CLX = cloxacilina.

1 O teste de sensibilidade com temocilina é recomendado apenas em casos em que não é detectado nenhum sinergismo, a fim de diferenciar entre ESBL + perda de porinas e enzimas OXA-48-like (12, 17, 18). Quando outras enzimas estão presentes a sensibilidade é variável e não fornece qualquer indicação adicional da β -lactamase presente.

2 Há um relato que suporta o uso de comprimidos comerciais contendo dois inibidores (ADP ou EDTA mais AAFB ou AFB) (26), mas ainda faltam estudos multicêntricos ou múltiplos estudos de um único centro. Esta combinação confere alto nível de resistência a carbapenêmicos e é rara fora da Grécia.

2.4.4 O teste Carba NP

O princípio deste teste é que a hidrólise de um carbapenêmico irá dar origem a uma alteração de pH que vai resultar numa mudança de cor de vermelho para amarelo com uma solução de vermelho de fenol (20,21). O teste Carba NP foi validado com colônias de bactérias cultivadas em ágar Mueller-Hinton, ágar sangue, ágar TSA e a maioria dos meios seletivos utilizados no rastreamento de produtores carbapenemase. O teste Carba NP não pode ser realizado com as colônias bacterianas cultivadas em ágar Drigalski ou ágar MacConkey. Os diferentes passos do método devem ser seguidos cuidadosamente, a fim de se obter resultados reprodutíveis.

2.4.5 Cepas controle

As cepas controle adequadas para testar carbapenemases estão detalhadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Cepas controle adequadas para testar carbapenemases.

Cepa	Mecanismo
<i>Enterobacter cloacae</i> CCUG 59627	AmpC combinada com redução da expressão de porinas
<i>K. pneumoniae</i> CCUG 58547 or <i>K. pneumoniae</i> NCTC 13440	Metalo- β -lactamase (VIM)
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13443	Metalo- β -lactamase (NDM-1)
<i>E. coli</i> NCTC 13476	Metalo- β -lactamase (IMP)
<i>K. pneumoniae</i> CCUG 56233 or <i>K. pneumoniae</i> NCTC 13438	Carbapenemase de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KPC)
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13442	carbapenemase OXA-48
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 25955	controle negativo

2.5 Referências

1. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:413-31
2. Vatopoulos A. High rates of metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece – a review of the current evidence. *Euro Surveill.* 2008;13(4). doi:pil: 8023
3. European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)
4. Souli M, Galani I, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Poulakou G et al. An outbreak of infection due to β -lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clin Infect Dis* 2010;50:364–73.
5. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med.* 2005; 165:1430-5.
6. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant Enterobacter species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1413-8
7. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440–58
8. Falcone M, Mezzatesta ML, Perilli M, Forcella C, Giordano A et al. Infections with VIM-1 metallo β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* and their correlation with clinical outcome. *J Clin Microbiol* 2009;47: 3514–9.
9. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63:659-67
10. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:432-8.
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Website with MIC-distributions. (<http://mic.eucast.org/>, accessed on 23 December 2012)
12. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39:168-72
13. Tato M, Coque TM, Ruíz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo- β -lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis.* 2007;45(9):1171-8.
14. Vading M, Samuelsen Ø, Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske CG. Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:668-74.
15. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:552-6.
16. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2012;50:3877-80.
17. van Dijk K, Voets G, Scharringa J, Voskuil S, Fluit A, Rottier W, Leverstein-Van Hall M, Cohen Stuart J. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenyl boronic acid, dipicolinic acid, and temocillin. *Clin Microbiol Infect* 2013. In press
18. Hartl R, Widhalm S, Kerschner H, Apfalter P. Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:E230-2.
19. Hrabák J, Studentová V, Walková R, Zemlicková H, Jakubu V et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2441-3

20. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1503-7.
21. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:6437-40.
22. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Simner PJ, Mandrekar JN, Lolans K, Hayden MK, Patel R. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3097-101.
23. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:4578-80.
24. Milillo M, Kwak YI, Snesrud E, Waterman PE, Lesho E, McGann P. Rapid and simultaneous detection of *bla*_{KPC}^{and} *bla*_{NDM} by use of multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1247-9.
25. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:1865-9.
26. Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis SD, Daikos GL, Bou Casals J, Tzouveleki LS. Combined disc methods for the detection of KPC- and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: improving reliability for the double carbapenemase producers. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:E412-5

3. *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL)

Importância da detecção do mecanismo de resistência	
Necessário para categorização de sensibilidade antimicrobiana	Não
Controle de infecção	Sim
Saúde pública	Sim

3.1 Definição

ESBLs são enzimas capazes de hidrolisar a maioria das penicilinas e cefalosporinas, incluindo compostos oximino- β -lactâmicos (cefuroxima, cefalosporinas de terceira e quarta gerações e aztreonam), mas não cefamicinas ou carbapenêmicos. A maioria das ESBLs pertence à classe A de Ambler e é inibida por inibidores de β -lactamase (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) (1).

3.2 Importância clínica e/ou epidemiológica

As primeiras cepas produtoras de ESBL foram identificadas em 1983, e desde então têm sido detectadas em todo o mundo. Essa distribuição é um resultado da expansão clonal de organismos produtores de ESBL, da transferência horizontal de genes de ESBL em plasmídeos e, menos comumente, surgimento de novas enzimas. Certamente os grupos clinicamente mais importantes de ESBLs são as enzimas CTX-M, seguido de SHV e ESBLs derivados de TEM (2-5). Certas enzimas derivadas de OXA da classe D também estão incluídas dentro do grupo das ESBLs, embora a inibição por inibidores de β -lactamases de classe A seja mais fraca do que para outras ESBLs.

A produção de ESBL tem sido observada principalmente em *Enterobacteriaceae*, inicialmente em ambientes hospitalares, mais tarde, em casas de repouso, e desde o ano 2000, na comunidade (pacientes ambulatoriais, portadores saudáveis, animais doentes e saudáveis, produtos alimentícios). As espécies produtoras de ESBL mais frequentemente encontradas são *Escherichia coli* e *K. pneumoniae*. No entanto, todas as outras espécies de *Enterobacteriaceae* clinicamente relevantes são também comumente produtoras de ESBL. A prevalência de isolados ESBL positivo depende de uma série de fatores, incluindo a espécie, a localidade geográfica, hospital/ala, grupo de pacientes e tipo de infecção; grandes variações têm sido relatadas em diferentes estudos (2,3,6,7). Os dados do EARS-Net de 2011 mostraram que a taxa de isolados de *K. pneumoniae* invasivos não sensíveis às cefalosporinas de terceira geração ultrapassou os 10% na maioria dos países europeus, com alguns relatando taxas de resistência superiores a 50%. A maioria desses isolados foi assumida como produtores de ESBL com base nos resultados de testes de ESBL locais (8).

3.3 Mecanismos de resistência

A grande maioria das ESBLs é constituída de enzimas adquiridas, codificadas por genes localizados em plasmídeos. As ESBLs adquiridas são expressas em vários níveis, e diferem significativamente quanto às suas características bioquímicas, tais como

atividade contra β -lactâmicos específicos (por exemplo, cefotaxima, ceftazidima, aztreonam). O nível de expressão e as propriedades de uma enzima, e a presença simultânea de outros mecanismos de resistência (outras β -lactamases, efluxo, permeabilidade alterada) resultam em uma grande diversidade de fenótipos de resistência observados entre os isolados ESBL-positivos (1-4, 9, 10).

3.4 Métodos recomendados para a detecção de ESBLs em *Enterobacteriaceae*

Em muitas áreas, a detecção e caracterização de ESBLs é recomendada ou obrigatória para fins de controle de infecção. A estratégia recomendada para a detecção de ESBLs em *Enterobacteriaceae* baseia-se na não sensibilidade a oximiino-cefalosporinas, ditas indicadoras, seguido por testes fenotípicos de confirmação (e em alguns casos genotípicos) (Tabela 1, Figura 1).

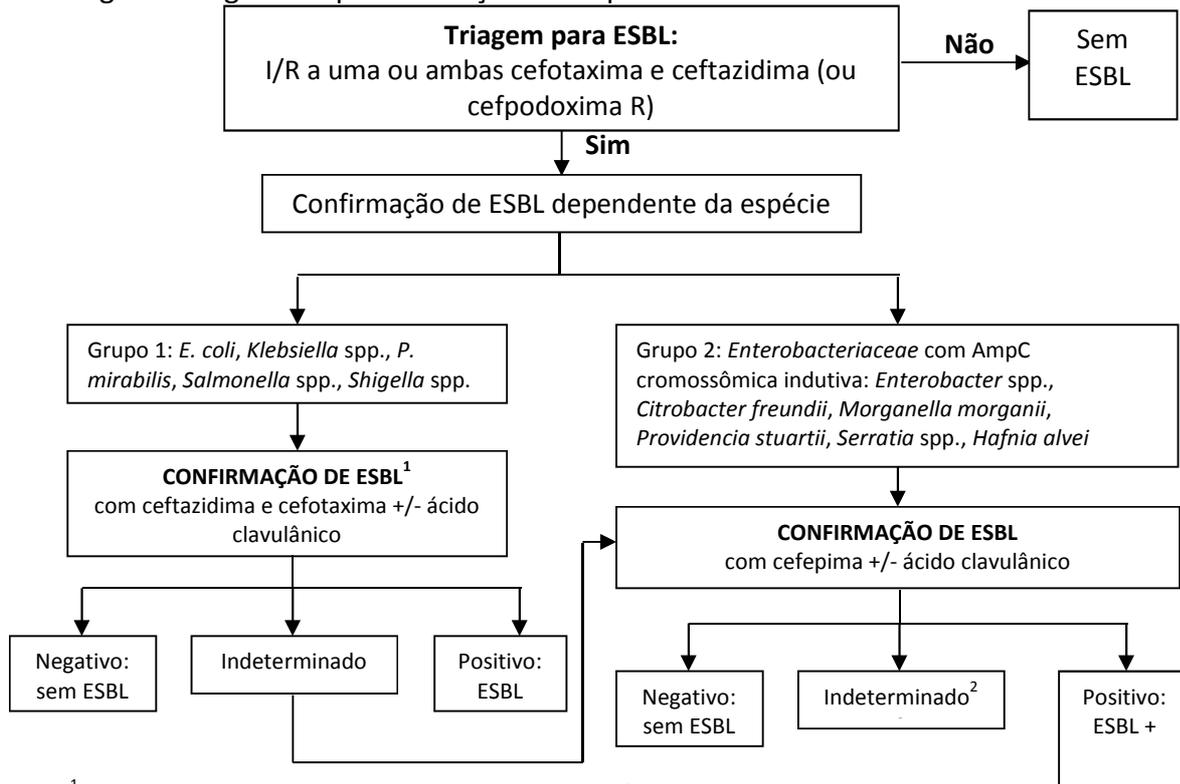
O valor de corte para triagem > 1 mg/L é recomendado para cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e cefpodoxima, de acordo com as diretrizes do EUCAST e do CLSI (Tabela 1) (11, 12). O ponto de corte clínico do EUCAST para *Enterobacteriaceae* é também $S \leq 1$ mg/L (11). A cefpodoxima é a cefalosporina indicadora individualmente mais sensível para a detecção da produção de ESBL e pode ser utilizada para triagem. No entanto, é menos específica do que a combinação de cefotaxima (ou ceftriaxona) e ceftazidima (13, 14) e apenas os últimos compostos são utilizados no teste de confirmação. Os diâmetros dos halos correspondentes às cefalosporinas indicadoras estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Métodos de triagem para detecção de ESBL em *Enterobacteriaceae* (12-18).

Método	Antibiótico	Realizar teste para ESBL se
Diluição em caldo ou ágar ¹	Cefotaxima/ceftriaxona E ceftazidima	CIM >1 mg/L para qualquer um dos antimicrobianos
	Cefpodoxima	CIM >1 mg/L
Disco-difusão ¹	Cefotaxima (5 μ g) ou Ceftriaxona (30 μ g) E ceftazidima (10 μ g)	Halo de inibição < 21 mm Halo de inibição < 23 mm Halo de inibição < 22 mm
	Cefpodoxima (10 μ g)	Halo de inibição < 21 mm

¹ Em todos os métodos testar cefotaxima ou ceftriaxona E ceftazidima OU testar cefpodoxima isoladamente.

Figure 1. Algoritmo para detecção fenotípica de ESBLs



¹Caso a cefoxitina tenha sido testada e a CIM seja >8 mg/L, realizar teste confirmatório com cefepima +/- ácido clavulânico

²Não pode ser determinado como positivo ou negativo (i.e. a fita não pode ser lida devido ao crescimento além da faixa de CIM da fita ou nenhum sinergismo evidente com o disco combinado e com o teste de sinergismo do duplo disco). Caso a confirmação com cefepima +/- ácido clavulânico seja indeterminada há necessidade de teste genotípico.

3.4.1 Triagem de ESBL em *Enterobacteriaceae*

A. Triagem no grupo 1 de *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *P. mirabilis*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.)

Os métodos recomendados para triagem de ESBL no grupo 1 de *Enterobacteriaceae* são diluição em caldo, diluição em ágar, disco-difusão ou sistema automatizado (12, 19, 20). É necessário que tanto a cefotaxima (ou ceftriaxona) e ceftazidima sejam utilizadas como cefalosporinas indicadoras, uma vez que pode haver grandes diferenças de CIMs de cefotaxima (ou ceftriaxona) e ceftazidima para diferentes isolados produtores de ESBL (13, 21, 22). O algoritmo de triagem e os métodos fenotípicos para confirmação de ESBL, para o grupo 1 de *Enterobacteriaceae* que são positivas em testes de triagem, estão descritos na Figura 1 e Tabela 2.

B. Triagem no grupo 2 de *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter* spp, *Serratia* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp, *Hafnia alvei*)

Para o grupo 2 de *Enterobacteriaceae*, recomenda-se que a triagem de ESBL seja realizada de acordo com os métodos acima descritos para o grupo 1 de *Enterobacteriaceae* (Figura 1 e Tabela 3) (18). No entanto, um mecanismo muito comum de resistência às cefalosporinas é a desrepressão da expressão de β -lactamase AmpC cromossômica nessas espécies. Uma vez que a cefepima é estável a hidrólise por AmpC, pode ser utilizada em testes fenotípicos com ácido clavulânico.

3.4.2 Métodos fenotípicos de confirmação

Quatro dos vários métodos fenotípicos, com base na inibição *in vitro* da atividade de ESBL por ácido clavulânico, são recomendados para confirmação ESBL: o teste do disco combinado (TDC), o teste de sinergismo de duplo disco (TSDD), o teste de gradiente ESBL, e teste de microdiluição em caldo (Tabelas 2 e 3) (19, 20, 23). Em um estudo multicêntrico o TDC apresentou especificidade superior ao teste gradiente ESBL e sensibilidade comparável (24). Os fabricantes de sistemas automatizados de testes de sensibilidade implementaram os testes de detecção baseados na inibição de enzimas ESBL pelo ácido clavulânico. Os desempenhos dos métodos de confirmação diferem em diferentes estudos, dependendo da coleção de cepas testadas e do equipamento utilizado (16-18).

A. Teste do disco combinado (TDC)

Para cada ensaio, os discos contendo a cefalosporina isoladamente (cefotaxima, ceftazidima, cefepima) e em combinação com o ácido clavulânico, são aplicados. O halo de inibição em torno do disco de cefalosporina combinado com o ácido clavulânico é comparado com o halo em torno do disco com a cefalosporina isoladamente. O teste é positivo se o diâmetro do halo de inibição com o disco combinado for pelo menos 5 mm maior do que aquele com o disco sem o ácido clavulânico (Tabela 3) (25, 26).

B. Teste de sinergismo de disco duplo (TSDD)

Os discos contendo as cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, cefepima) são aplicados à placa, próximos a um disco com o ácido clavulânico (amoxicilina-ácido clavulânico). Um resultado positivo é indicado quando as zonas de inibição em torno de qualquer um dos discos de cefalosporinas são aumentadas na direção do disco que contém o ácido clavulânico. A distância entre os discos é crítica e 20 mm de centro a centro parece ser a distância ótima para discos de cefalosporinas de 30 µg; no entanto, pode ser reduzida (15 mm) ou aumentada (30 mm) para testar as cepas com níveis muito elevados ou baixos de resistência, respectivamente (19). As recomendações precisam ser reavaliadas para discos com menor conteúdo de cefalosporinas, como utilizado no método de disco-difusão do EUCAST.

C. Método do gradiente

Testes de gradiente são realizados, lidos e interpretados de acordo com as instruções do fabricante. O teste é positivo se uma redução de oito vezes é observada na CIM de cefalosporina combinada com ácido clavulânico em comparação com a CIM da cefalosporina isoladamente ou se uma zona fantasma ou elipse deformada está presente (ver instruções do fabricante para as ilustrações) (Tabela 3). O resultado do teste é indeterminado se a tira não puder ser lida, devido ao crescimento para além da faixa de CIM da tira. Em todos os outros casos, o resultado do teste é negativo. O teste do gradiente para ESBL deve ser utilizado para a confirmação da produção de ESBL e não é confiável para determinação da CIM.

D. Microdiluição em caldo

A microdiluição em caldo é realizada com caldo Mueller-Hinton contendo diluições seriadas de razão 2 de cefotaxima, ceftazidima e cefepima em concentrações

compreendidas entre 0,25 e 512 mg/L, com e sem ácido clavulânico, a uma concentração fixa de 4 mg/L. O teste é positivo se uma redução igual ou maior que 8 vezes for observada na CIM da cefalosporina combinada com ácido clavulânico em comparação com a CIM da cefalosporina isoladamente. Em todos os outros casos, o resultado do teste é negativo (23).

E. Considerações especiais na interpretação

Testes de confirmação de ESBL que usam cefotaxima como a cefalosporina indicadora podem ser falsamente positivos para cepas de *Klebsiella oxytoca* com hiperprodução de β-lactamase cromossômica K1 (*OXY-like*) (27). Um fenótipo semelhante também pode ser encontrado em *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Citrobacter koseri* e *Kluyvera* spp. e em algumas espécies relacionadas a *C. koseri*, como *C. sedlakii*, *C. farmeri* e *C. amalonaticus*, que têm β-lactamases cromossômicas que são inibidas pelo ácido clavulânico (28, 29). Outra possível causa de resultados falso-positivos é hiperprodução de SHV-1, TEM-1 ou β-lactamase OXA-1-like de amplo espectro combinado com permeabilidade alterada (17). Problemas semelhantes com resultados falso-positivos para *K. oxytoca* produtores de K1 podem surgir quando se utiliza os testes de confirmação com base apenas em cefepima (30).

Tabela 2. Testes confirmatórios para ESBL em *Enterobacteriaceae* que são positivos nos testes de triagem para ESBL (ver Tabela 1). Grupo 1 de *Enterobacteriaceae* (ver Figura 1).

Método	Agente antimicrobiano (conteúdo do disco)	A confirmação de ESBL é positiva se
Teste de gradiente para ESBL	Cefotaxima +/- ácido clavulânico	A razão de CIMs for ≥ 8 ou se houver deformação da elipse
	Ceftazidima +/- ácido clavulânico	A razão de CIMs for ≥ 8 ou se houver deformação da elipse
Teste de disco-difusão combinado (TDC)	Cefotaxima (30 µg) +/- ácido clavulânico (10 µg)	Aumento no halo de inibição ≥ 5 mm
	Ceftazidima (30 µg) +/- ácido clavulânico (10 µg)	Aumento no halo de inibição ≥ 5 mm
Microdiluição em caldo	Cefotaxima +/- ácido clavulânico (4 mg/L)	Razão entre CIMs ≥ 8
	Ceftazidima +/- ácido clavulânico (4 mg/L)	Razão entre CIMs ≥ 8
	Cefepima +/- ácido clavulânico (4 mg/L)	Razão entre CIMs ≥ 8
Teste de sinergismo do duplo disco (TSDD)	Cefotaxima, ceftazidima e cefepima	Expansão do halo de inibição da cefalosporina indicadora em direção ao disco de amoxicilina-ácido clavulânico

Tabela 3. Testes confirmatórios para ESBL em *Enterobacteriaceae* que são positivas nos testes de triagem para ESBL (ver Tabela 1). Grupo 2 de *Enterobacteriaceae* (ver Figura 1).

Método	Antimicrobiano	A confirmação é positiva se
Teste de gradiente para ESBL - Etest ESBL	Cefepima +/- ácido clavulânico	A razão de CIMs for ≥ 8 ou se houver deformação da elipse
Teste de disco-difusão combinado (TDC)	Cefepima (30 μg) +/- ácido clavulânico (10 μg)	Aumento ≥ 5 mm no halo de inibição
Microdiluição em caldo	Cefepima +/- ácido clavulânico (concentração fixa de 4 mg/L)	Razão entre CIMs ≥ 8
Teste de sinergismo do duplo disco (TSDD)	Cefotaxima, ceftazidima, cefepima	Expansão do halo de inibição da cefalosporina indicadora em direção ao disco de amoxicilina-ácido clavulânico

3.4.3 Detecção fenotípica de ESBL na presença de outras β -lactamases que mascaram o sinergismo

Testes com resultados indeterminados (Etest) e resultados falso-negativos (TDC, TSDD, Etest e microdiluição) podem resultar da expressão de alto nível de β -lactamases AmpC, que mascaram a presença de ESBLs (19, 31, 32). Isolados com expressão de alto nível de β -lactamases AmpC geralmente mostram clara resistência às cefalosporinas de terceira geração. Além disso, a resistência à cefamicinas, ou seja, CIM de cefoxitina >8 mg/L, podem ser indicativos de expressão de alto nível de β -lactamases AmpC, (31), com a rara exceção das β -lactamases ACC, que não conferem resistência à cefoxitina (33).

Para confirmar a presença de ESBL em isolados com expressão de alto nível de β -lactamases AmpC, recomenda-se que um teste confirmatório adicional para ESBL seja realizado com cefepima como cefalosporina indicadora, uma vez que a cefepima geralmente não é hidrolisada por β -lactamases AmpC. A cefepima pode ser utilizada em todos os formatos de ensaios TDC, TSDD, gradiente ou diluição em caldo (27, 34-36). Abordagens alternativas incluem o uso de cloxacilina, que é um bom inibidor de enzimas AmpC. Este formato de TDC utiliza discos que contêm as duas cefalosporinas indicadoras (cefotaxima e ceftazidima) com ácido clavulânico e cloxacilina juntos; e TDC ou TSDD padrão em placas de ágar suplementado com 200-250 mg de cloxacilina por litro (19). Há também discos contendo tanto ácido clavulânico e cloxacilina no mercado, mas as avaliações multicêntricas destes produtos são insuficientes.

A presença de ESBLs pode também ser mascarada por carbapenemases tais como MBL ou KPCs (mas não enzimas OXA-48-like) e / ou por defeitos graves de permeabilidade (37, 38). A importância epidemiológica das ESBLs, nestes contextos, poderia ser questionada, uma vez que a carbapenemase tem maior importância para a saúde pública, mas se a detecção ainda é considerada relevante, recomenda-se que os métodos moleculares para detecção de ESBL sejam utilizados.

Deve ser lembrado que ESBLs da classe D (do tipo OXA) são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico e, por conseguinte, não podem ser detectadas pelos métodos

descritos acima (4, 19). Essas enzimas são raras atualmente em *Enterobacteriaceae*.

3.4.4 Confirmação genotípica

Para a confirmação genotípica da presença de genes de ESBL, a utilização de PCR e sequenciamento de genes ESBL (3) ou de um método à base de *microarray* de DNA são recomendados. Avaliações recentes do microarranjo Check-KPC ESBL (Check-Points, Wageningen, Holanda) com diferentes coleções de organismos abrangendo a maioria dos genes de ESBL conhecidos mostrou bom desempenho (39-43). Os resultados do teste são usualmente obtidos em 24 horas. Deve-se notar que os genes que ocorrem esporadicamente e novos genes de ESBL não são detectados por este *microarray*.

3.4.5 Controle de qualidade

Cepas apropriadas para controle de qualidade dos testes de detecção de ESBL são mostradas na Tabela 4.

Table 4. Cepas apropriadas para controle de qualidade dos testes de detecção de ESBLs.

Cepas	Mecanismo
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	ESBL SHV-18
<i>E. coli</i> CCUG62975	ESBL grupo CTX-M-1 e AmpC CMY adquirida
<i>E. coli</i> ATCC 25922	ESBL negativo

3.5 Referências

1. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:211-1233
2. Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:557-584
3. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:933-951
4. Naas T, Poirel L, Nordmann P. 2008. Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):42-52
5. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):144-153
6. Livermore DM, Cantón R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:165-174
7. Carattoli A. Animal reservoirs for extended-spectrum β -lactamase producers. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):117-123
8. European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)
9. Gniadkowski M. 2008. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):11-32
10. Livermore DM. Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect.*

2008;14(Suppl1):3-10

11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST; 2013. Version 3.0 http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (last accessed 23 December 2012).
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M 100-S21. Wayne, PA, USA: CLSI; 2011.
13. Hope R, Potz NA, Warner M, Fagan EJ, Arnold E, Livermore DM. Efficacy of practised screening methods for detection of cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(1):110-3.
14. Oliver A, Weigel LM, Rasheed JK, McGowan Jr JE Jr, Raney P, Tenover FC. Mechanisms of decreased susceptibility to cefpodoxime in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3829-36.
15. Garrec H, Drieux-Rouzet L, Golmard JL, Jarlier V, Robert J. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum beta-lactamase production by Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1048-57.
16. Leverstein-van Hall MA, Fluit AC, Paauw A, Box AT, Brisse S, Verhoef J. Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum β -lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3703-11.
17. Spanu T, Sanguinetti M, Tumbarello M, D'Inzeo T, Fiori B, Posteraro B, Santangelo R, Cauda R, Fadda G. Evaluation of the new VITEK 2 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL production in Enterobacteriaceae isolates. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3257-62.
18. Thomson KS, Cornish NE, Hong SG, Hemrick K, Herdt C, Moland ES. Comparison of Phoenix and VITEK 2 extended-spectrum- β -lactamase detection tests for analysis of *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with well-characterized β -lactamases. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2380-4.
19. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 (Suppl 1):90-103.
20. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:657-86.
21. Biedenbach DJ, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;54:13-21.
22. Hiramata Y, Matsuda J, Miyazaki Y, Kamihira S, Kawakami S et al. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;52:323-9.
23. Jeong SH, Song W, Kim JS, Kim HS, Lee KM. Broth microdilution method to detect extended-spectrum β -lactamases and AmpC β -lactamases in Enterobacteriaceae isolates by use of clavulanic acid and boronic acid as inhibitors. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3409-12.
24. Platteel TN, Cohen Stuart JW, de Neeling AJ, Voets GM, Scharringa J et al. Multi-centre evaluation of a phenotypic extended spectrum β -lactamase detection guideline in the routine setting. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:70-6.
25. M'Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, Birkenhead D, Hawkey PM. Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45:881-5.
26. Towne TG, Lewis JS 2nd, Herrera M, Wickes B, Jorgensen JH. Detection of SHV-type extended-spectrum β -lactamase in *Enterobacter* isolates. *J Clin Microbiol.* 2010;48:298-9.
27. Stürenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum β -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:134-8.
28. Nukaga M, Mayama K, Crichlow GV, Knox JR. Structure of an extended-spectrum class A β -lactamase from *Proteus vulgaris* K1. *J Mol Biol.* 2002;317:109-17.

29. Petrella S, Renard M, Ziental-Gelus N, Clermont D, Jarlier V, Sougakoff W. Characterization of the chromosomal class A β -lactamase CKO from *Citrobacter koseri*. FEMS Microbiol Lett. 2006;254:285-92.
30. Stürenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum beta-lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. J Antimicrob Chemother. 2004; 54:134-8.
31. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009;22:161-82
32. Munier GK, Johnson CL, Snyder JW, Moland ES, Hanson ND, Thomson KS. Positive extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) screening results may be due to AmpC β -lactamases more often than to ESBLs. J Clin Microbiol. 2010;48:673-4.
33. Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC β -lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:1924-31.
34. Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Böttger EC, Hombach M. Evaluation of a diagnostic flow chart for detection and confirmation of extended spectrum β -lactamases (ESBL) in Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect. 2012;18:1194-204.
35. Yang JL, Wang JT, Lauderdale TL, Chang SC. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacter cloacae* in Taiwan and comparison of 3 phenotypic confirmatory methods for detecting extended-spectrum beta-lactamase production. J Microbiol Immunol Infect. 2009;42:310-6.
36. Jeong SH, Song W, Kim JS, Kim HS, Lee KM. Broth microdilution method to detect extended-spectrum beta-lactamases and AmpC beta-lactamases in enterobacteriaceae isolates by use of clavulanic acid and boronic acid as inhibitors. J Clin Microbiol. 2009;47:3409-12.
37. Tsakris A, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Voulgari E, Pittaras T, Sofianou D, Pournaras S, Petropoulou D. Use of boronic acid disk tests to detect extended- spectrum β -lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-possessing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2009;47:3420-6.
38. March A, Aschbacher R, Dhanji H, Livermore DM, Böttcher A et al. Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. Clin Microbiol Infect. 2010;16:934-44.
39. Cohen Stuart J, Dierikx C, Al Naiemi N, Karczmarek A, Van Hoek AH et al. Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis. J Antimicrob Chemother. 2010;65:1377-81
40. Endimiani A, Hujer AM, Hujer KM, Gatta JA, Schriver AC et al. Evaluation of a commercial microarray system for detection of SHV-, TEM-, CTX-M-, and KPC-type β -lactamase genes in Gram-negative isolates. J Clin Microbiol. 2010;48:2618-22.
41. Naas T, Cuzon G, Truong H, Bernabeu S, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray, the Check-Points ESBL/KPC array, for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and KPC carbapenemases. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:3086-92.
42. Platteel TN, Stuart JW, Voets GM, Scharringa J, van de Sande N et al. Evaluation of a commercial microarray as a confirmation test for the presence of extended-spectrum β -lactamases in isolates from the routine clinical setting. Clin Microbiol Infect. 2011;17:1435-8.
43. Willemsen I, Overdevest I, Al Naiemi N, Rijnsburger M, Savelkoul P et al. New diagnostic microarray (Check-KPC ESBL) for detection and identification of extended-spectrum β -lactamases in highly resistant Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2011;49:2985-7.

4. *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases AmpC adquiridas

Importância da detecção de mecanismos de resistência	
Necessário para categorização de sensibilidade antimicrobiana	Não
Controle de infecção	Sim
Saúde pública	Sim

4.1 Definição

Cefalosporinas do tipo AmpC são β -lactamases da classe C de Ambler. Elas hidrolisam penicilinas, cefalosporinas (incluindo a terceira geração, mas geralmente não os compostos de quarta geração) e monobactâmicos. Em geral, as enzimas do tipo AmpC são fracamente inibidas pelos inibidores de ESBL clássicos, especialmente o ácido clavulânico (1).

4.2 Importância clínica e/ou epidemiológica

Os primeiros isolados produtores de AmpCs adquiridas foram identificados no final da década de 1980, e desde então têm sido detectadas globalmente, como resultado da disseminação clonal e a transferência horizontal de genes AmpC (muitas vezes referida como AmpC mediada por plasmídeo). Há diversas linhagens de genes AmpC móveis, provenientes de produtores naturais, a saber, o grupo *Enterobacter* (MIR, ACT), o grupo *C. freundii* (CMY-2 like LAT, FCE), o grupo *M. organii* (DHA), o grupo *Hafnia alvei* (ACC), o grupo *Aeromonas* (CMY-1-like, FOX, MOX) e o grupo *Acinetobacter baumannii* (ABA). As mais comuns e mais amplamente disseminadas são as enzimas de CMY-2-like, embora β -lactamases DHA-like induzíveis e algumas outras também tenham se disseminado amplamente (1).

As principais espécies produtoras de AmpCs adquiridas são *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella enterica* e *P. mirabilis*. Isolados com essas enzimas foram recuperados tanto a partir de pacientes hospitalizados quanto da comunidade, e foram recuperadas em animais de produção e nos produtos alimentares (em *E. coli* e *S. enterica*) anteriormente às enzimas ESBL clássicas. Embora as AmpCs adquiridas tenham se disseminado amplamente e terem sido reportadas em estudos multicêntricos de resistência de enterobactérias às cefalosporinas de terceira geração, a sua frequência global tem se mantido muito abaixo daquela das ESBLs. No entanto, em alguns locais e situações epidemiológicas específicas, o significado de organismos produtores dessas enzimas pode aumentar substancialmente (1-5).

4.3 Mecanismos de resistência

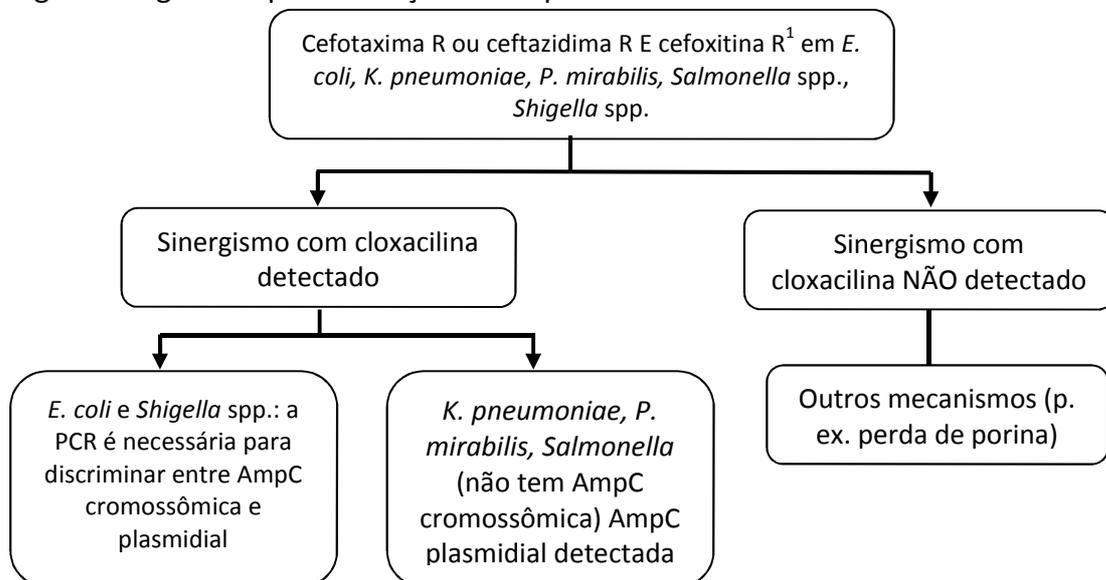
Numerosas *Enterobacteriaceae* e alguns outros bacilos Gram-negativos produzem AmpCs naturais, seja constitutivamente a um nível mínimo (por exemplo, *E. coli*,

Acinetobacter baumannii) ou por indução (por exemplo, *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *M. morgani*, *P. aeruginosa*). A desrepressão ou hiperprodução de AmpCs naturais são devidas a várias alterações genéticas e conferem alto nível de resistência às cefalosporinas e combinações de penicilina com inibidores de β -lactamase. As cefalosporinas da classe C também podem ocorrer como enzimas adquiridas, principalmente em *Enterobacteriaceae*. Exceto para alguns tipos induzíveis (por exemplo, DHA), as AmpCs adquiridas são expressas constitutivamente, o que confere resistência semelhante àquela observada em mutantes desreprimidos ou hiperprodutores de AmpCs naturais. Os níveis de resistência dependem das quantidades de enzimas expressas, bem como da presença de outros mecanismos de resistência. De modo semelhante às ESBLs, as AmpCs adquiridas são normalmente codificadas por genes mediados por plasmídeos (1-3).

4.4 Métodos recomendados para a detecção de AmpCs adquiridas em *Enterobacteriaceae*

Uma CIM de cefoxitina >8 mg/L combinada com uma CIM de ceftazidima e/ou cefotaxima > 1 mg/L podem ser utilizadas como critérios fenotípicos para investigação de produção de AmpC no grupo 1 de *Enterobacteriaceae*, embora esta estratégia não detecte ACC-1, uma AmpC mediada por plasmídeos que não hidrolisa cefoxitina (6). Deve-se notar que a resistência à cefoxitina também pode ser devida à deficiência de porinas (1).

Figura 1. Algoritmo para detecção de AmpC.



1-Cefoxitina R é aqui definido como do tipo não selvagem (CIM > 8 mg/L ou diâmetro do halo <19 mm). Investigação dos isolados com não sensibilidade à cefotaxima e ceftazidima é uma abordagem com maior sensibilidade, mas baixa especificidade em comparação com o foco em isolados resistentes à cefoxitina (7). AmpC também pode estar presente em isolados com um teste positivo para ESBL (sinergismo com ácido clavulânico). Por conseguinte, pode ser relevante realizar testes, independentemente do resultado do teste de ESBL. Para os laboratórios que não testam cefoxitina, sensibilidade à cefepima juntamente com resistência à cefotaxima e/ou ceftazidima é outro indicador fenotípico de AmpC, embora menos específico.

Testes fenotípicos de confirmação para AmpC são geralmente baseados na inibição de AmpC por cloxacilina ou derivados do ácido borônico. No entanto, os derivados de ácido borônico também inibem carbapenemases da classe A. Embora dados avaliando esses métodos sejam escassos, a detecção razoavelmente precisa com métodos *in house* tem sido descrita (8-10), bem como com os testes comercialmente disponíveis, tais como o Mast "AmpC Detecção Disc Set" (96-100% de sensibilidade, especificidade de 98% -100%) (11, 12), o teste de gradiente para AmpC, atualmente disponível apenas na bioMérieux (sensibilidade 84-93%, especificidade de 70-100%) (12, 13) e comprimidos Rosco com cefotaxima-cloxacilina e ceftazidima-cloxacilina (sensibilidade 96%, especificidade de 92%) (7,14). Para *E. coli*, no entanto, os testes de confirmação de AmpC não podem discriminar entre AmpC adquirida e hiperprodução constitutiva de AmpC cromossômica.

A presença de AmpCs adquiridas também pode ser confirmada por meio da técnica de PCR (15, 16), ou com um método baseado em *microarray* de DNA (Check-Points) (17).

Cepas apropriadas para o controle de qualidade de testes de detecção AmpC são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Cepas apropriadas para o controle de qualidade de testes de detecção de AmpC

Cepa	Mecanismo
<i>E. coli</i> CCUG 58543	AmpC CMY-2 adquirida
<i>E. coli</i> CCUG62975	AmpC CMY AmpC e ESBL grupo CTX-M-1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	AmpC negativa

4.5 Referências

- Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009;22:161-82
- Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:1-11
- Beceiro A, Bou G. Class C β -lactamases: an increasing problem worldwide. Rev Med Microbiol. 2004;15:141-152
- Empel J, Hrabák J, Koziowska A, Bergerová T, Urbášková P, Kern-Zdanowicz I, Gniadkowski M. DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in the Czech Republic. Microb Drug Resist. 2010;16:291-295
- D'Andrea MM, Literacka E, Zioga A, Giani T, Baraniak A, Fiett J, Sadowy E, Tassios PT, Rossolini GM, Gniadkowski M, Miriagou V. Evolution of a multi-drug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases spreading in Europe. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:2735-2742
- Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U. A novel type of AmpC β -lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:1924-31.
- Edquist P, Ringman M, Liljequist BO, Wisell KT, Giske CG. Phenotypic detection of plasmid-acquired AmpC in *Escherichia coli*-evaluation of screening criteria and performance of two commercial methods for the phenotypic confirmation of AmpC production. Eur J Clin Microbiol

- Infect Dis. 2013; 32:1205-10
8. Yagi T, Wachino J, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2005;43:2551-8.
 9. Tenover FC, Emery SL, Spiegel CA, Bradford PA, Eells S et al. Identification of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus* spp. can potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results. J Clin Microbiol. 2009;47:294-9.
 10. Tan TY, Ng LS, He J, Koh TH, Hsu LY. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:146-9
 11. Halstead FD, Vanstone GL, Balakrishnan I. An evaluation of the Mast D69C AmpC Detection Disc Set for the detection of inducible and derepressed AmpC beta-lactamases. J Antimicrob Chemother. 2012;67:2303-4.
 12. Ingram PR, Inglis TJ, Vanzetti TR, Henderson BA, Harnett GB, Murray RJ. Comparison of methods for AmpC beta-lactamase detection in Enterobacteriaceae. J Med Microbiol. 2011; 60(Pt 6):715-21.
 13. Peter-Getzlaff S, Polsfuss S, Poledica M, Hombach M, Giger J et al. Detection of AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli*: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. J Clin Microbiol. 2011;49:2924-32.
 14. Hansen F, Hammerum AM, Skov RL, Giske CG, Sundsfjord A, Samuelsen O. Evaluation of ROSCO Neo-Sensitabs for phenotypic detection and subgrouping of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. APMIS. 2012;120:724-32.
 15. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2002;40:2153-62.
 16. Brolund A, Wisell KT, Edquist PJ, Elfström L, Walder M, Giske CG. Development of a real-time SYBRGreen PCR assay for rapid detection of acquired AmpC in Enterobacteriaceae. J Microbiol Methods. 2010; 82:229-33.
 17. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). J Antimicrob Chemother. 2012;67:1865-9.

5. *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (oxacilina) (MRSA)

Importância do mecanismo de resistência	
Necessário para categorização da sensibilidade antimicrobiana	Sim
Controle de infecção	Sim
Saúde pública	Sim

5.1 Definição

Isolados de *S. aureus* com uma proteína de ligação à penicilina auxiliar (PBP2a ou a PBP2 alternativa, recentemente descoberta, e codificada por *mecC*) para a qual os agentes β -lactâmicos, exceto para a nova classe de cefalosporinas que têm atividade anti-MRSA, têm uma baixa afinidade.

5.2 Importância clínica e/ou epidemiológica

S. aureus resistente à metilina (oxacilina) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (1,2). A mortalidade das infecções da corrente sanguínea por MRSA é o dobro daquela das infecções semelhantes causadas por cepas sensíveis à metilina (oxacilina) devido ao retardo no tratamento adequado e regimes de tratamento alternativos inferiores (3). Infecções por MRSA são endêmicas tanto em hospitais quanto na comunidade em todas as partes do mundo.

5.3 Mecanismos de resistência

O principal mecanismo de resistência é a produção de uma proteína de ligação à penicilina auxiliar, PBP2a ou a recentemente descoberta PBP2 codificada por *mecC*, que tornam o isolado resistente a todos os β -lactâmicos, exceto a nova classe de cefalosporinas, que têm afinidade suficientemente elevada à PBP2a, e provavelmente também à PBP2 codificada por *mecC* (anteriormente designado *mecA*_{LGA251}), para serem ativas contra MRSA (4). As PBPs auxiliares são codificadas pelo gene *mecA* ou *mecC* recentemente descrito (anteriormente conhecida como *mecA*-LGA251) (5), respectivamente. O elemento *mec* é exógeno ao *S. aureus* e não está presente em *S. aureus* sensível à metilina (oxacilina). Cepas com expressão marcadamente heterogênea do gene *mecA* e CIMs de oxacilina frequentemente baixas prejudicam a acurácia dos testes de sensibilidade (5). Além disso, alguns isolados expressam a resistência de baixo nível à oxacilina, mas são *mecA* e *mecC* negativo e não produzem PBPs auxiliares [*S. aureus* com sensibilidade *borderline* (BORSA)]. Essas cepas são relativamente raras e o mecanismo de resistência é mal caracterizado, mas pode incluir hiperprodução de β -lactamases ou alteração das PBPs pré-existentes (6).

5.4 Métodos recomendados para a detecção da resistência à metilina (oxacilina) em *S. aureus*

A resistência à oxacilina/meticilina pode ser detectada tanto por testes fenotípicos como determinação da CIM, testes de disco-difusão, aglutinação do látex para detectar PBP2a, quanto genotipicamente utilizando a PCR.

5.4.1 Detecção por determinação da CIM ou disco-difusão

A expressão de resistência heterogênea afeta particularmente a CIM de oxacilina.

A cefoxitina é um marcador muito sensível e específico da resistência mediada por *mecA/mecC* e é o fármaco de eleição para a disco-difusão. O uso da disco-difusão com oxacilina deve ser desencorajado e os critérios interpretativos para os halos de inibição não estão mais incluídos na tabela de pontos de corte do EUCAST devido à fraca correlação com a presença de *mecA*. As cepas com aumento de CIM de oxacilina (CIM > 2 mg/L), mas que permanecem sensíveis à cefoxitina (diâmetro do halo ≥ 22 mm, CIM ≤ 4 mg/L) são incomuns. Se a oxacilina for testada e gerar uma interpretação diferente daquela obtida com cefoxitina, a interpretação deve ser como mostrado abaixo. Recomenda-se submeter essas cepas a investigações fenotípicas e genotípicas para *mecA* ou *mecC*.

Tabela 1. Interpretação quando os resultados com oxacilina e cefoxitina são discrepantes.

		Resultado da CIM ou disco-difusão para cefoxitina	
		S	R
Categoria da CIM de oxacilina	S	Reportar como oxacilina S	Reportar como oxacilina R
	R	Reportar como oxacilina R	Reportar como oxacilina R

A. Microdiluição em caldo: A metodologia padrão (ISO 20776-1) deve ser utilizada e cepas com CIM de cefoxitina > 4 mg/L devem ser relatadas como resistentes à meticilina (oxacilina).

B. Disco-difusão: O método de disco-difusão do EUCAST deve ser utilizado. As cepas com um diâmetro do halo de cefoxitina (disco de 30 μ g) <22 mm devem ser reportadas como resistentes à meticilina (oxacilina).

5.4.2 Detecção com métodos genotípicos e aglutinação de látex

A detecção genotípica do gene *mecA* por PCR e a detecção da proteína PBP2a com kits de aglutinação de látex é possível utilizando-se ensaios comerciais ou *in house*. No entanto, *mecC* e a PBP codificada por este gene atualmente não podem ser detectadas utilizando os métodos genotípicos ou fenotípicos disponíveis comercialmente. Os iniciadores e os métodos para a detecção de *mecC* foram recentemente publicados (7, 8).

5.4.3 Cepas controle

Cepas adequadas para o controle de qualidade de testes de sensibilidade à meticilina são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Cepas apropriadas para controle de qualidade dos testes de sensibilidade à meticilina (oxacilina).

Cepa	Mecanismo
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Sensível à meticilina (oxacilina)
<i>S. aureus</i> NCTC 12493	Resistente à meticilina (oxacilina) (<i>mecA</i>)
<i>S. aureus</i> NCTC 13552	Resistente à meticilina (oxacilina) (<i>mecC</i>)

5.5 Referências

1. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2003;36:53-9.
2. de Kraker ME, Wolkewitz M, Davey PG, Koller W, Berger J, et al. Clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay related to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:1598-605.
3. de Kraker ME, Davey PG, Grundmann H; BURDEN study group. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. PLoS Med. 2011;8(10):e1001104.
4. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009;7:629-41.
5. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect Dis. 2011;11:595-603
6. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 1997;10:781-91.
7. Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, Laurent F, Teale C, Skov R, Larsen AR. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*. Clin Microbiol Infect. 2012; 4:395-400.
8. Pichon B, Hill R, Laurent F, Larsen AR, Skov RL, Holmes M, Edwards GF, Teale C, Kearns AM. Development of a real-time quadruplex PCR assay for simultaneous detection of *nuc*, Panton-Valentine leucocidin (PVL), *mecA* and homologue *mecALGA251*. J Antimicrob Chemother. 2012; 67:2338-41.

6. *Staphylococcus aureus* não sensíveis aos Glicopeptídeos

Importância da detecção do mecanismo	
Necessário para categorização da sensibilidade antimicrobiana	Sim
Controle de infecção	Sim
Saúde pública	Sim

6.1 Definição

O ponto de corte clínico (CIM) do EUCAST para a resistência à vancomicina em *S. aureus* é > 2 mg/L. Nos últimos anos, os pontos de corte para vancomicina foram reduzidos, eliminando assim o grupo intermediário. No entanto, existem diferenças importantes no mecanismo de resistência mediada por VanA em *S. aureus* com alto nível de resistência a glicopeptídeos (GRSA) e isolados com resistência de baixo nível não mediada por VanA. Assim, os termos *S. aureus* intermediário aos glicopeptídeos (GISA) e *S. aureus* com heterorresistência intermediária aos glicopeptídeos (hGISA) tem sido mantidos para os isolados com resistência de baixo nível à vancomicina não mediada por VanA. A CIM deve ser sempre determinada ao utilizar a vancomicina para tratar um paciente com uma infecção grave por *S. aureus*. Em casos selecionados, por exemplo, quando há suspeita de falha terapêutica, o teste para hGISA é justificável. Devido à complexidade da confirmação de um hGISA, a vigilância antimicrobiana está focada na detecção de GISA e GRSA.

GRSA: *S. aureus* resistente aos glicopeptídeos:

Isolados de *S. aureus* com alto nível de resistência à vancomicina (CIM > 8 mg/L).

GISA: *S. aureus* intermediário aos glicopeptídeos:

Isolados de *S. aureus* com resistência de baixo nível à vancomicina (CIM 4-8 mg/L).

hGISA: *S. aureus* com heterorresistência intermediária aos glicopeptídeos:

Isolados de *S. aureus* sensíveis à vancomicina (CIMs ≤ 2 mg/L), mas com populações minoritárias (1 em cada 10^6 células) com CIM de vancomicina > 2 mg/L, a julgar pela investigação do perfil por análise populacional.

6.2 Importância clínica e/ou epidemiológica

Não há pesquisas recentes sobre a prevalência de isolados com sensibilidade reduzida aos glicopeptídeos na Europa. Com base em relatórios de instituições individuais, estima-se que a prevalência de hGISA é $\leq 2\%$ daquela dos MRSA na Europa, e GISA abaixo de 0,1% (1). GRSA ainda não foi relatado na Europa e atualmente é extremamente raro em todo o mundo (1). A prevalência de hGISA pode ser consideravelmente maior localmente (1), mais frequentemente associada com propagação de linhagens clonais específicas (2). Quase todos os isolados com CIM elevada (GISA) ou contendo subpopulações resistentes (hGISA) são MRSA.

Tem sido difícil determinar o significado clínico do hGISA uma vez que nenhum estudo prospectivo bem controlado foi realizado. No entanto, acredita-se que a presença do fenótipo hGISA possa estar associada com pior resposta clínica, pelo menos em infecções graves (1, 2). Por isso, é prudente investigar hGISA em infecções da corrente sanguínea que não respondem à terapia. Recentemente, tem havido cada vez mais evidências de que os isolados com CIMs correspondentes ao maior valor do intervalo de sensibilidade (CIM > 1 mg/L) estão associados com resposta clínica reduzida e pode ser ligada a um aumento da mortalidade, pelo menos, na infecção da corrente sanguínea (2-7). Ainda é incerto se a presença de subpopulações resistentes é responsável pela resposta clínica inadequada, como também pode ser uma consequência das CIMs de vancomicina ligeiramente elevadas observadas nessas cepas.

O mecanismo de hGISA é complexo e a detecção depende de análise populacional (8), o que é complicado, requer equipamentos especiais e precisa de um alto nível de conhecimento técnico. A metodologia para a detecção de hGISA será descrita, mas para fins de vigilância a informação é restrita a GISA e GRSA, que são definidos em conjunto como isolados com uma CIM > 2 mg/L.

6.3 Mecanismo de resistência

Para GRSA a resistência é mediada pelo gene *vanA* exogenamente adquirido de *Enterococcus*. Tanto para os isolados GISA como hGISA a resistência é endógena (ou seja, mutações cromossômicas) e o mecanismo é de alta complexidade, sem um único gene responsável. O fenótipo GISA / hGISA está ligado a um espessamento da parede celular bacteriana, com hiperprodução de alvos de ligação de glicopeptídeos. O fenótipo hGISA é frequentemente instável no laboratório, mas hGISA têm a capacidade de se tornar um GISA *in vivo* (1).

6.4 Métodos recomendados para a detecção de *S. aureus* não sensíveis aos glicopeptídeos

A disco-difusão NÃO PODE SER utilizada para testar hGISA ou GISA, mas pode ser usado para testar a GRSA.

6.4.1 Determinação da CIM

A metodologia de microdiluição em caldo como recomendado pelo EUCAST (ISO 20776-1) é o padrão ouro, mas a CIM também pode ser determinada por métodos de tira gradiente, diluição em ágar, ou sistemas automatizados. Deve-se notar que os resultados obtidos com os métodos de tira gradiente podem ser, 0,5-1 diluições de razão 2, mais elevadas do que os resultados obtidos por microdiluição em caldo (7). O ponto de corte EUCAST para resistência à vancomicina em *S. aureus* é CIM > 2 mg/L. Isolados com CIMs confirmados como > 2 mg/L (de acordo com a microdiluição) devem ser encaminhados para um laboratório de referência. hGISA não são detectados por determinação da CIM.

6.4.2 Teste para detecção de GRSA, GISA e hGISA

A detecção de hGISA tem-se revelado difícil e, portanto, a detecção é dividida em triagem e confirmação. Para a triagem, uma série de métodos especializados tem sido

desenvolvidos. A confirmação deve ser feita por análise populacional em ágar contendo uma gama de concentrações de vancomicina (PAP-AUC) (8). Este método é tecnicamente desafiador, para aqueles sem uma vasta experiência, e consequentemente, é realizado principalmente pelos laboratórios de referência. Um método baseado em triagem em ágar com vancomicina e caseína (9) mostrou alta sensibilidade e especificidade, mas até agora só foi avaliada em um estudo, e por isso não foi incluída. Os métodos a seguir irão detectar GRSA e GISA, e foram avaliados num estudo multicêntrico (10).

A. Teste Macro gradiente:

Este teste dá uma indicação da sensibilidade reduzida à vancomicina, mas note que as leituras não são CIMs. Além disso, o teste não diferencia hGISA, GISA e GRSA. O teste é configurado de acordo com as instruções do fabricante. Note-se também que o inóculo é mais denso (McFarland 2,0) do que aquele utilizado nos testes regulares de gradiente. Um resultado positivo é indicado por leituras ≥ 8 mg/L tanto de vancomicina quanto teicoplanina OU ≥ 12 mg / L para a teicoplanina isoladamente. Como ambos os critérios incluem a teicoplanina, o teste de vancomicina pode ser dependente do resultado do teste de teicoplanina. O algoritmo seria:

- Leitura da teicoplanina ≥ 12 mg/L: GRSA, GISA ou hGISA
- Leitura da teicoplanina 8 mg/L: Testar a vancomicina. Se a leitura da vancomicina for ≥ 8 mg/L, então se trata de GRSA, GISA ou hGISA
- Leitura da teicoplanina < 8 mg/L: Não é GRSA, GISA ou hGISA

B. Detecção da resistência aos glicopeptídeos pelo teste de gradiente (GRD):

Testar de acordo com as instruções do fabricante. O teste é considerado positivo se o resultado com fita GRD for ≥ 8 mg/L de vancomicina ou teicoplanina.

C. Triagem em ágar com teicoplanina:

Uma placa de Mueller Hinton contendo 5 mg de teicoplanina por litro é utilizada (10). Várias colônias são suspensas em solução salina a 0,9% para se obter um inóculo com turbidez equivalente ao padrão 2,0 da escala de McFarland. Dez microlitros de inóculo são distribuídos como um *spot* sobre a superfície do ágar, e a placa deve ser incubada a 35 °C em ar ambiente durante 24 a 48 h. Crescimento de mais de duas colônias em até 48h indica suspeita de sensibilidade reduzida aos glicopeptídeos.

D. Teste confirmatório para hGISA/GISA:

Qualquer isolado com triagem positiva para sensibilidade reduzida e não identificado como GRSA ou GISA por determinação da CIM pode ser hGISA e deve ser investigado pela análise do perfil populacional-área sob a curva (PAP-AUC) (8), normalmente por meio de encaminhamento para um laboratório de referência.

6.4.3 Cepas controle

As cepas adequadas para o controle de qualidade de testes de sensibilidade aos glicopeptídeos estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Cepas adequadas para o controle de qualidade dos testes de sensibilidade aos glicopeptídeos.

Cepa	Mecanismo
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Sensível aos glicopeptídeos
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	hGISA (Mu3)
<i>S. aureus</i> ATCC 700699	GISA (Mu50)

6.5 Referências

1. Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 2010;1: 99-139
2. Van Hal SJ, Lodise TP, Paterson DL. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 54: 755-771.
3. Chang HJ, Hsu PC, Yang CC, Siu LK, Kuo AJ, et al. Influence of teicoplanin MICs on treatment outcomes among patients with teicoplanin-treated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a hospital based retrospective study. *J. Antimicrob Chemother* 2012, 67:736-41.
4. Honda H, Doern CD, Michael-Dunne W Jr, Warren DK. The impact of vancomycin susceptibility on treatment outcomes among patients with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *BMC Infect Dis.* 2011; 5:11:335.
5. Lodise TP, Graves J, Evans A, Graffunder E, Helmecke M, et al. Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 3315-20
6. Rojas L, Bunsow E, Munoz P, Cercenado E, Rodriguez-Creixems, Bouza E. Vancomycin MICs do not predict the outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in correctly treated patients. *J. Antimicrob Chemother* 2012; 7: 1760-8.
7. Sader HS, Jones RN, Rossi KL, Rybak MJ. Occurrence of vancomycin tolerant and heterogeneous vancomycin resistant strains (hVISA) among *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in nine USA hospitals. *Antimicrob Chemother.* 2009; 64: 1024-8.
8. Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 47: 399-403
9. Satola SW, Farley MM, Anderson KF, Patel JB. Comparison of Detection Methods for Heteroresistant Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*, with the Population Analysis Profile Method as the Reference Method. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 177-183.
10. Wootton M, MacGowan AP, Walsh TR, Howe RA. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol.* 2007;45:329-32.

7. *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina

Importância da detecção da resistência	
Necessário para categorização da sensibilidade	Sim
Controle de infecção/saúde pública	Sim
Saúde pública	Sim

7.1 Definição

Enterococcus faecium ou *Enterococcus faecalis* com resistência à vancomicina (VRE) (CIM de vancomicina > 4 mg/L).

7.2 Importância clínica e/ou epidemiológica

Enterococos, especialmente *E. faecium*, são geralmente resistentes aos agentes antimicrobianos mais utilizadas na clínica. O tratamento de infecções causadas por enterococos resistentes à vancomicina (VRE) é, portanto difícil, com poucas opções de tratamento. VRE são conhecidos por se disseminarem de forma eficiente, persistirem no ambiente hospitalar, e poder colonizar muitos indivíduos, dos quais apenas alguns desenvolvem infecções (6-7). Isolados expressando VanB são geralmente fenotipicamente sensíveis à teicoplanina. Há dois relatos de casos de seleção de resistência à teicoplanina durante o tratamento infecção por enterococos expressando VanB (8, 9), mas os relatos de falhas clínicas são escassos e a recomendação atual do EUCAST é reportar o resultado para teicoplanina tal como obtido. Os valores de CIM típicos para as enzimas Van mais importantes clinicamente são mostrados na Tabela 1.

Table 1. CIMs de glicopeptídeos para enterococos expressando VanA ou VanB.

Glicopeptídeo	CIM (mg/L)	
	VanA	VanB
Vancomicina	64-1024	4-1024
Teicoplanina	8-512	0,06-1

7.3 Mecanismo de resistência

A resistência clinicamente relevante é mais frequentemente mediada por ligases VanA e VanB, codificadas por plasmídeos, que substituem no peptidoglicano o terminal D-Ala por D-Lac. Esta substituição reduz a ligação de glicopeptídeos ao alvo. As cepas VanA exibem resistência tanto à vancomicina quanto à teicoplanina, enquanto as cepas VanB geralmente permanecem sensíveis à teicoplanina, devido à ausência de indução do operon de resistência. Outras enzimas Van de menor prevalência são VanD, VanE, VanG, VanL, VanM e VanN (1 a 4).

Outras espécies de enterococos (isto é, *E. raffinosus*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*), podem conter *vanA*, *vanB* ou outros genes que codificam as enzimas Van listadas

acima, mas estas cepas são relativamente raras. Enzimas VanC cromossomicamente codificadas são encontradas em todos os isolados de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. VanC medeia baixo nível de resistência à vancomicina (CIM 4-16 mg/L), mas geralmente não deve ser considerado importante do ponto de vista de controle de infecção (5).

7.4 Métodos recomendados para a detecção de resistência aos glicopeptídeos em *E. faecium* e *E. faecalis*

A resistência à vancomicina pode ser detectada pelos métodos de determinação da CIM, disco-difusão e triagem em ágar. Para todos os três métodos, é essencial que as placas sejam incubadas durante um total de 24 h, a fim de detectar isolados com resistência induzível.

Todos os três métodos detectam prontamente a resistência mediada por *vanA*. A detecção de resistência mediada por *vanB* é mais desafiadora. A determinação da CIM por diluição em ágar ou microdiluição em caldo é precisa, mas raramente é utilizada em laboratórios de rotina (10, 11). Relatos mais antigos mostram que a detecção de resistência mediada por *vanB* é problemática por métodos automatizados (12). Desde então, atualizações tem sido feitas para os métodos automatizados, mas ainda faltam estudos mais recentes sobre o desempenho desses métodos para detecção de resistência mediada por *vanB*. A disco-difusão com um disco de vancomicina de 5 µg pode ser difícil, mas o teste funciona bem desde que as diretrizes para a leitura, conforme especificado pelo EUCAST, sejam seguidas meticulosamente (dados não publicados do laboratório de referência EUCAST).

Quando se interpreta resultados de teste de CIM ou disco-difusão é importante assegurar que o isolado não é *E. gallinarum* ou *E. casseliflavus*, que podem ser erradamente identificados como *E. faecium*, devido a um teste positivo de arabinose. O MGP (alfa-metil-D-glucopiranosídeo) ou um ensaio de teste de motilidade pode ser usado para distinguir *E. gallinarum* / *E. casseliflavus* de *E. faecium* (MGP negativo, não móveis). A espectrometria de massa MALDI-TOF, também é útil para a identificação de espécies de enterococos (13).

7.4.1 Determinação da CIM

A determinação da CIM pode ser realizada por diluição em ágar, microdiluição em caldo ou pelo método do gradiente em ágar.

A microdiluição em caldo deve ser realizada de acordo com a norma ISO 20776-1, como recomendado pelo EUCAST. A determinação da CIM com testes de gradiente deve ser realizada de acordo com as instruções dos fabricantes. Por favor, notar que as tiras de gradiente de CIM são por vezes utilizadas com um inóculo maior (padrão 2,0 da escala de McFarland) em um meio rico (*Brain Heart Infusion Agar*) para triagem de resistência à vancomicina, mas esta análise não fornece um valor de CIM.

7.4.2 Teste de disco-difusão

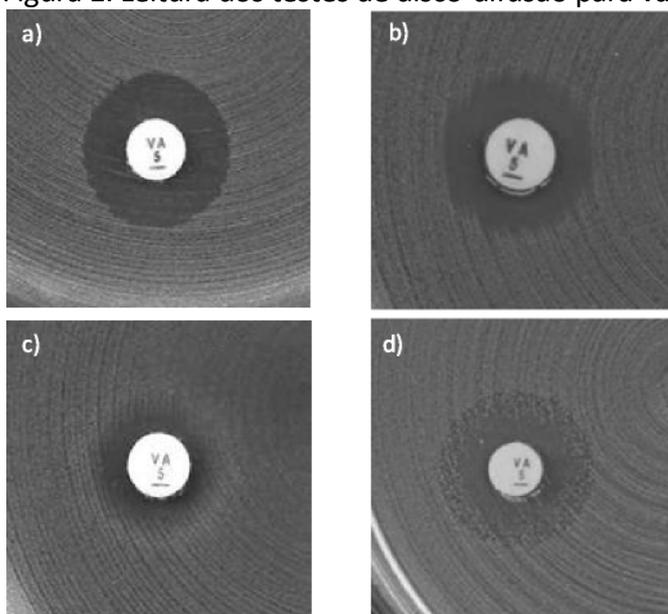
Para a disco-difusão o método especificado pelo EUCAST deve ser seguido meticulosamente. Inspeção os halos de inibição quanto a bordas irregulares e / ou microcolônias, utilizando luz transmitida. Bordas do halo bem delimitadas indicam que o isolado é sensível e diâmetro de halos de inibição acima do ponto de corte podem

ser reportados sensíveis à vancomicina.

Isolados com bordas de halo de inibição difusas ou colônias dentro do halo (Figura 1) podem ser resistentes, independentemente do tamanho do halo de inibição e não devem ser relatados como sensíveis sem confirmação por determinação da CIM.

- A disco-difusão deve ser realizada de acordo com a metodologia de disco-difusão EUCAST para organismos não fastidiosos. A incubação durante 24 horas é necessária para a detecção de resistência em alguns isolados com resistência induzível.

Figura 1. Leitura dos testes de disco-difusão para vancomicina em *Enterococcus* spp.



a) Halos de inibição com bordas bem delimitadas e diâmetro ≥ 12 mm. Reportar como sensível.

b-d) Halos de inibição com bordas irregulares e/ou colônias no interior do halo de inibição. Reportar como resistente, independente do diâmetro do halo, uma vez confirmada a pureza da cultura.

7.4.3 Triagem em ágar

Ensaio de triagem em *Brain Heart Infusion Agar* e 6 mg de vancomicina por litro são confiáveis para a detecção de isolados *vanA* e *vanB* positivos. Placas de triagem podem ser obtidas comercialmente ou preparadas no laboratório. O teste de triagem em ágar é realizado por aplicação de 1×10^5 - 1×10^6 UFC (10 μ l de uma suspensão McFarland 0,5) em *Brain Heart Infusion Agar* 6 mg de vancomicina por litro. A incubação durante 24 horas a 35 ± 1 °C em ar ambiente é necessária a fim de detectar a resistência em alguns isolados com resistência induzível. O crescimento de mais do que uma colônia deve ser interpretado como positivo.

7.4.4 Testes genotípicos

A detecção de resistência à vancomicina pela utilização de PCR para *vanA* e *vanB* pode também ser realizada utilizando-se metodologias *in house* ou comerciais (14-16).

7.4.5 Controle de qualidade

As cepas para controle de qualidade dos testes de sensibilidade aos glicopeptídeos estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Cepas controle apropriados para o controle de qualidade dos testes de sensibilidade aos glicopeptídeos.

Cepa	Mecanismo
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Vancomicina sensível
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	Vancomicina resistente (<i>vanB</i>)
<i>E. faecium</i> NCTC 12202	Vancomicina resistente (<i>vanA</i>)

7.5 Referências

1. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the *van* alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5857-60.
2. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2667-72.
3. Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, Zhu D, Hu F, Zhang Y, Wang F, Jacoby GA, Wang M. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:4643-7.
4. Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, Leclercq R, Courvalin P, Cattoir V. D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(10):4606-12.
5. Ramotar K, Woods W, Larocque L, Toye B. Comparison of phenotypic methods to identify enterococci intrinsically resistant to vancomycin (VanC VRE). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000;36:119-24.
6. Mazuski JE. Vancomycin-resistant enterococcus: risk factors, surveillance, infections, and treatment. *Surg Infect.* 2008;9:567-71.
7. Tenover FC, McDonald LC. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. *Curr Opin Infect Dis.* 2005;18:300-5.
8. Hayden MK, Trenholme GM, Schultz JE, Sahm DF. In vivo development of teicoplanin resistance in a VanB *Enterococcus faecium* isolate. *J Infect Dis.* 1993;167:1224-7.
9. Kawalec M, Gniadkowski M, Kedzierska J, Skotnicki A, Fiett J, Hryniewicz W. Selection of a teicoplanin-resistant *Enterococcus faecium* mutant during an outbreak caused by vancomycin-resistant enterococci with the *vanB* phenotype. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4274-82.
10. Swenson JM, Clark NC, Sahm DF, Ferraro MJ, Doern G, Hindler J, Jorgensen JH, Pfaller MA, Reller LB, Weinstein MP, et al. Molecular characterization and multilaboratory evaluation of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 for quality control of screening tests for vancomycin and high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J Clin Microbiol.* 1995;33:3019-21.
11. Klare I, Fleige C, Geringer U, Witte W, Werner G. Performance of three chromogenic VRE screening agars, two Etest vancomycin protocols, and different microdilution methods in detecting *vanB* genotype *Enterococcus faecium* with varying vancomycin MICs. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74:171-6.
12. Endtz HP, Van Den Braak N, Van Belkum A, Goessens WH, Kreft D, Stroebel AB, Verbrugh HA. Comparison of eight methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *J Clin Microbiol.* 1998;36:592-4.
13. Fang H, Ohlsson AK, Ullberg M, Özenci V. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31: 3073-7

14. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1434.
15. Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik O, Sundsfjord A. Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:1105-10.
16. Gazin M, Lammens C, Goossens H, Malhotra-Kumar S; MOSAR WP2 Study Team. Evaluation of GeneOhm VanR and Xpert *vanA/vanB* molecular assays for the rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:273-6.

8. *Streptococcus pneumoniae* não sensíveis à penicilina

Importância da detecção da resistência	
Necessário para categorização da sensibilidade antimicrobiana	Sim
Controle de infecção	Não
Saúde pública	Sim

8.1 Definição

Isolados de *S. pneumoniae* com sensibilidade reduzida à penicilina (CIMs superiores aos do tipo selvagem, ou seja, > 0,06 mg/L), devido à presença de proteínas de ligação à penicilina (PBPs) modificadas com menor afinidade aos β -lactâmicos.

36

8.2 Importância clínica e/ou epidemiológica

S. pneumoniae é a causa mais comum de pneumonia em todo o mundo. A morbidade e a mortalidade são altas e estima-se que cerca de três milhões de pessoas morram anualmente de infecções pneumocócicas. A não sensibilidade de baixo grau à penicilina está associada com o aumento da mortalidade quando a meningite é tratada com penicilina. Em outros tipos de infecção não é observado aumento da mortalidade devido à resistência de baixa intensidade se doses mais elevadas são utilizadas. Muitos países realizam programas de vacinação contra vários sorotipos de pneumococo, e isso também pode afetar os níveis de resistência observados em isolados invasivos (1). No entanto, *S. pneumoniae* não sensíveis à penicilina continuam sendo um problema clínico importante, do ponto de vista da saúde pública, embora esses microrganismos não estejam associados com a disseminação em instituições de saúde, ao contrário de muitos outros agentes patogênicos descritos neste documento.

8.3 Mecanismo de resistência

S. pneumoniae contém seis PBPs, dos quais PBP2x é o alvo principal da penicilina (2). A presença de genes "mosaico" que codificam PBPs de baixa afinidade é resultado de transferência horizontal de genes de estreptococos viridans comensais (2). O nível de resistência aos β -lactâmicos não depende apenas das PBPs em mosaico de baixa afinidade presentes no isolado, mas também de alterações em PBPs específicas que são essenciais para *S. pneumoniae* (3). As cepas com CIMs de benzilpenicilina no intervalo 0,12-2 mg/L são consideradas sensíveis em infecções não meníngeas quando uma dose mais elevada de penicilina é utilizada, enquanto que para a meningite tais cepas devem sempre ser reportadas como resistentes (4).

8.4 Métodos recomendados para a detecção de *S. pneumoniae* não sensíveis à penicilina

A não sensibilidade à penicilina pode ser detectada fenotipicamente por métodos de CIM

ou disco-difusão.

8.4.1 Método de disco-difusão

O método de disco-difusão com discos de oxacilina 1 µg é um método de triagem eficaz para a detecção de pneumococos não sensíveis à penicilina (5, 6, 7). O método é muito sensível, mas não é altamente específico, uma vez que cepas com diâmetro do halo de inibição ≤19 mm podem ter sensibilidade à benzilpenicilina, e a CIM de benzilpenicilina deve ser determinada para todas as amostras que não sejam sensíveis pelo método de triagem (7). O diâmetro do halo de inibição de oxacilina pode ser utilizado para prever a sensibilidade a outros β-lactâmicos além da penicilina, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Triagem da resistência aos β-lactâmicos em *S. pneumoniae*

Diâmetro do halo de inibição (mm) com oxacilina	Agente antimicrobiano	Testes adicionais e/ou interpretação
≥ 20 mm	Todos os agentes β-lactâmicos para os quais estão listados pontos de corte clínicos (incluindo aqueles com observações)	Reportar sensível independente da indicação clínica, exceto para cefaclor, o qual deve ser reportado como intermediário
< 20 mm*	Benzilpenicilina (meningite) e fenoximetilpenicilina (todas as indicações)	Reportar resistente
	Ampicilina, amoxicilina e piperacilina (com e sem inibidores de β-lactamase), cefotaxima, ceftriaxona, ceftarolina and cefepima.	Diâmetro do halo de oxacilina ≥ 8 mm: Reportar sensível. Em meningites: confirmar por determinação da CIM do agente considerado para uso clínico Diâmetro do halo de oxacilina < 8 mm: determinar a CIM do β-lactâmico considerado para uso clínico, mas para ampicilina, amoxicilina e piperacilina (com e sem inibidores de β-lactamases) inferir a sensibilidade a partir da CIM de ampicilina
	Outros agentes β-lactâmicos (incluindo benzilpenicilina para infecções não meníngeas)	Testar por método de determinação da CIM para o agente considerado para uso clínico e interpretar de acordo com os pontos de corte clínicos

*Oxacilina 1 µg <20 mm: sempre determinar a CIM de benzilpenicilina, mas não retardar o relato de outros β-lactâmicos, como recomendado acima.

8.4.2 Pontos de corte clínicos

Os pontos de corte de penicilina foram primariamente determinados principalmente para garantir o sucesso da terapia para meningite pneumocócica. Entretanto, os estudos clínicos demonstraram que a resposta clínica nos casos de pneumonia pneumocócica causada por cepas com sensibilidade intermediária à penicilina e tratados com penicilina parenteral não foi diferente daquele dos doentes tratados com outros agentes. Considerando dados

microbiológicos, farmacocinéticos e farmacodinâmicos, os pontos de corte clínicos para benzilpenicilina para isolados de infecções não meningéas foram revisados (3) e os pontos de corte atuais do EUCAST estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Reportando a sensibilidade à benzilpenicilina em meningites e não meningites.

Indicações	Ponto de corte CIM (mg/L)		Notas
	S ≤	R >	
Benzilpenicilina (não meningite)	0,06	2	<p>Na pneumonia, quando a dose de 1,2 g 6/6 h é utilizada, os isolados com CIM ≤0,5 mg/L devem ser considerados sensíveis à benzilpenicilina.</p> <p>Na pneumonia, quando a dose de 2,4 g 6/6 h ou 1,2 g 4/4 h é utilizada, os isolados com CIM ≤1 mg/L devem ser considerados sensíveis à benzilpenicilina.</p> <p>Na pneumonia, quando a dose de 2,4 g 4/4 h é utilizada, os isolados com CIM ≤2 mg/L devem ser considerados sensíveis.</p>
Benzilpenicilina (meningite)	0,06	0,06	

Nota: 1,2 g de benzilpenicilina é igual a 2 milhões de unidades de benzilpenicilina.

8.4.3 Controle de qualidade

Cepas apropriadas para controle de qualidade dos testes de sensibilidade à benzilpenicilina estão mostradas na Table 3.

Tabela 3. Cepas apropriadas para controle de qualidade dos testes de sensibilidade à benzilpenicilina.

Cepa	Mecanismo
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	PBP mosaico, CIM de benzilpenicilina 0,5 mg/L

8.5 Referências

1. Dagan R. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Infect. 2009;15 (Suppl 3):16-20.
2. Hakenbeck R, Kaminski K, König A, van der Linden M, Paik J, Reichmann P, Zähner D. Penicillin-binding proteins in beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist 1999; 5: 91-99.
3. Grebe T, Hakenbeck R. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of β -lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 829-834.
4. Weinstein MP, Klugman KP, Jones RN. Rationale for revised penicillin susceptibility breakpoints versus *Streptococcus pneumoniae*: Coping with antimicrobial susceptibility in an era of resistance. Clin Infect Dis 2009; 48: 1596 – 1600.
5. Dixon JMS, Lipinski AE, Graham MEP. Detection and prevalence of pneumococci with increased resistance to penicillin. Can Med Assoc J 1977; 117: 1159-61.
6. Swenson JM, Hill BC, Thornsberry C. Screening pneumococci for penicillin resistance. J Clin Microbiol 1986; 24: 749-52.
7. Jetté LP and C Sinave. Use of an oxacillin disk screening test for detection of penicillin- and ceftriaxone-resistant pneumococci. J Clin Microbiol 1999; 37: 1178-81.

9. Declarações de transparência

CGG: apoio para conferência e colaboração de pesquisa com AB Biodisk (posteriormente comprada pela bioMérieux), tem recebido honorários como palestrante da BioRad e Liofilchem, membro do Comitê Gestor do EUCAST e do Grupo de Coordenação EARS-Net.

LMM: foi consultor da Wyeth e Pfizer, apresentou palestras para Wyeth, Merck, Pfizer, Janssen-Cilag e Astra-Zeneca, e tem recebido bolsas de pesquisa da Merck, Wyeth, Janssen-Cilag e Astra-Zeneca, membro do Comitê Gestor do EUCAST.

RC: participou de programas educativos patrocinados pela Siemens, BioRad e Liofilchem e em projetos de pesquisa patrocinados pela BD, BioRad e Liofilchem, presidente do EUCAST.

RS: conselheiro científico para a Novartis (terminado em 2012), consultor da bioMérieux e Pfizer, recebeu honorários como palestrante da Cepheid e Becton Dickinson do Comitê Gestor do EUCAST.

SS: não há conflitos de interesse a declarar

YG: não há conflitos de interesse a declarar

PN: depositou patente para os testes Carba NP e ESBL PDN em nome do INSERM (Paris, França)

MW: não há conflitos de interesse a declarar

VM: não há conflitos de interesse a declarar

GSS: membro do Grupo de Coordenação do EARS-Net

HS: membro do Grupo de Coordenação do EARS-Net

JCS: não há conflitos de interesse a declarar.

MG: participou de um programa educacional patrocinado pela Liofilchem