

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

Versão 2.0¹

Julho de 2017

¹Baseada na versão 1.0 de dezembro de 2013 dos subcomitês do EUCAST para detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica:

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

Setembro de 2018



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. Bacilos Gram negativos resistentes a polimixina	27
6. <i>P. aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter</i> resistentes aos carbapenêmicos	29
7. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à Meticilina (Oxacilina)	31
8. <i>Staphylococcus aureus</i> não sensível aos glicopeptídeos	34
9. <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> resistentes à Vancomicina	39
10. <i>S. pneumoniae</i> não sensíveis à Penicilina	44

1. Introdução

O atual documento é uma atualização das diretrizes desenvolvidas pelo subcomitê de mecanismos de resistência do EUCAST. O comitê diretor do EUCAST desenvolveu essa atualização. 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 na literatura científica, 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. Isso possivelmente se deve ao fato que alguns mecanismos não estão sendo expressos ou são expressos somente em baixos níveis o que não resulta em resistência fenotípica. 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 clinicamente resistente.

Christian G. Giske

Chairman of EUCAST- Past Chairman of the subcommittee on detection of resistance mechanisms

2. Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases

Importância da detecção do mecanismo de resistência	
Necessário para categorização clínica de sensibilidade	Não
Para propósitos de controle de infecção	Sim
Para propósitos de 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). Atualmente, as carbapenemases OXA-48 compreendem o grupo de carbapenemases que mais rapidamente aumentam na Europa (3). Na Grécia e na Itália em torno de 60 e 15%, respectivamente, das *K. pneumoniae* invasivas são atualmente não sensíveis aos carbapenêmicos (4). Em 2015, 13/38 países relataram disseminação inter-regional de situação endêmica de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemase (CPE), em comparação com 6/38 em 2013 (3). 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 (3), existe também exemplos de disseminação regional em alguns países (5). As carbapenemases do tipo IMP são também comuns em algumas partes do mundo (6).

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 (7-9).

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 (10-11). 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 (12), e possivelmente também por proteínas ligantes de penicilina (13).

CPE normalmente apresentam diminuição de sensibilidade aos carbapenêmicos e na maioria dos casos são resistentes as cefalosporinas (oximino) de espectro estendido (ceftaxima, ceftriaxona, ceftazidima e/ou cefepime) (14). No entanto, com algumas dessas enzimas (enzimas OXA-48-like) os organismos podem se apresentar totalmente sensíveis às cefalosporinas. Atualmente, a maioria dos CPE podem expressar também enzimas que hidrolisam cefalosporinas, tipo as ESBLs 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 (15).

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 (14-16). 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 (14-17). 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 (14). 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 μ g	
	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	$<28^2$
Ertapenem ³	$\leq 0,5$	$>0,12$	≥ 25	<25

1 Melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade

2 Isolados com 25-27 mm só necessitam ser investigados para produção de carbapenemases se forem resistentes a piperacilina-tazobactam e/ou temocilina (temocilina contribui mais para especificidade). Investigação de carbapenemases é sempre necessária

se o diâmetro da zona para meropenem for < 25 mm.

3 Elevada sensibilidade, mas baixa especificidade. Pode ser usado como um agente de triagem alternativo, mas isolados com ESBL e AmpC podem apresentar resistência mesmo sem ter carbapenemase.

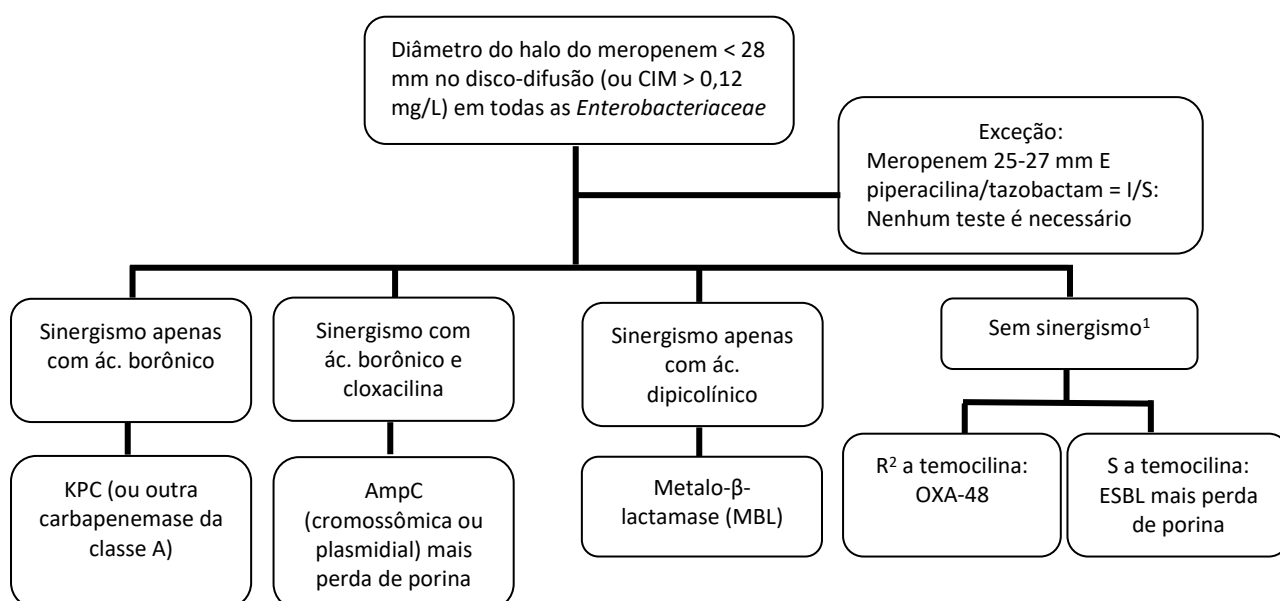
Uma vez detectada sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos nos testes de sensibilidade de rotina, os métodos fenotípicos para detecção de carbapenemases devem ser aplicados. Os principais tipos de métodos incluem o teste de disco combinado, teste colorimétricos baseados na hidrólise do carbapenêmico, outros métodos de detecção de hidrólise de carbapenems e, finalmente, um método imunocromatográfico (ensaio de fluxo lateral). Estes diversos testes são descritos abaixo

6

2.4.2 Teste do disco combinado

O teste do disco combinado tem a vantagem de ser bem validado em estudos e também estar disponível comercialmente (MAST, Reino Unido; Rosco, Dinamarca) (18-22). Os discos ou tablets contêm meropenem +/- vários inibidores. Resumidamente, o ácido borônico inibe carbapenemases da classe A (embora dados além de KPC sejam raros) e o ácido dipicolínico e o EDTA inibem carbapenemases classe B. Além disso, a OXA-48 é inibida pelo avibactam, mas esse último ainda não foi incluído nos painéis fenotípicos (21,22). 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 e tabela 2. 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.



¹ Combinação de várias carbapenemases pode não mostrar o sinergismo – ou seja, MBL e KPC em combinação. Testes moleculares são necessários nestes casos.

² Alto nível de resistência à temocilina (CIM > 128 mg / L, diâmetro do halo <11 mm) é indicador fenotípico de produção de OXA-48.

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 fastidiosos. 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 > 128 mg/L) tem sido proposto como um marcador fenotípico para os produtores de carbapenemase OXA-48-like (23,24). 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 (12). 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(tablets)-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 μ g)				CIM de temocilina >128 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 (23, 24). 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) (25), 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.

2.4.3 Testes bioquímicos (colorimétricos)

O teste Carba NP é um teste rápido (<2h) de detecção de hidrólise de carbapenêmico, o qual resulta em alteração de pH e mudança de cor de amarelo para vermelho em uma solução de vermelho de fenol (26, 27). 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. Várias publicações indicam que o método apresenta alta sensibilidade e especificidade (28), embora uma publicação tenha indicado problemas de sensibilidade para isolados com fenótipo mucoide e para alguma Enterobacteriaceae produtoras de OXA-48 (29). Um produto comercial baseado nesse método demonstrou apresentar boa performance para detecção de carbapenemases em Enterobacteriaceae (30, 31). Alguns testes comerciais, incluindo a versão comercial do Carba NP, apresentam alguns problemas de interpretação visto que a leitura visual da mudança de coloração pode ser duvidosa; além disso, uma certa proporção (3-5%) de resultados são não interpretáveis.

Um derivado do teste Carba NP, o teste Blue-Carba (BCT) é um teste bioquímico rápido (<2 h) de detecção de produção de carbapenemase (32, 33). Baseia-se na hidrólise in vitro do imipenem por colônias bacterianas (inoculação direta sem lise prévia), que é detectada por variação no pH que resulta em alteração do indicador azul de bromotimol (azul para verde/amarelo ou verde para amarelo). Em uma grande avaliação realizada por Pasteran et al. (34), mas realizado em apenas um único laboratório, o teste apresentou excelente sensibilidade para as enzimas classe A e B, mas a sensibilidade subótima para detecção de enzimas OXA-48.

Um terceiro teste bioquímico é o β CARBA test®, que também pode ser realizado em <2h. O teste é feito pela adição de 1 a 3 colônias nos reagentes. As leituras devem ser feitas após um máximo de 30 min de incubação. Mudança de cor de amarelo para laranja, vermelho ou roxo indica reação positiva. Um estudo indicou que o tempo de incubação de 0,5 horas, recomendado pelo fabricante, é muito curto para cepas produtoras de OXA-48. A coleção de cepas avaliada foi bastante limitada, e seria necessário um estudo maior para investigar como o teste se compara a outros testes bioquímicos (35). Numa outra avaliação, o β CARBA test® mostrou excelente desempenho para detectar CPE, especialmente OXA-48. No entanto, a capacidade de detectar outras carbapenemases de classe A deve ser verificada sendo que alguns resultados falso-positivos ocorreram com outras β -lactamases tais como a superprodução de β -lactamase K1 em *Klebsiella oxytoca* (33).

2.4.4 Método de inativação de carbapenêmico (CIM)

O princípio deste método é detectar a hidrólise enzimática pela incubação de um carbapenem com uma suspensão bacteriana. O teste CIM utiliza discos de teste de sensibilidade a antibióticos como substrato. Após duas horas de incubação de uma alça carregada de colônias bacterianas com um disco de meropenem, o disco é colocado em um ágar previamente inoculado com *Escherichia coli* ATCC 25922. A inativação enzimática é indicada por ausência de zona de inibição, enquanto que ausência de atividade de carbapenemase implicará na formação de zona de inibição visto que o meropenem no disco não foi hidrolisado. O teste CIM apresentou desempenho variável

em diferentes estudos (36-38), mas é uma técnica alternativa, embora o valor preditivo negativo da mesma não esteja bem estabelecido. Uma das principais desvantagens dessa técnica é que ela requer geralmente pelo menos 18 horas para obter os resultados.

2.4.5 Detecção de hidrólise de carbapenêmico por MALDI-TOF

O princípio é detectar em um equipamento de espectrometria de massa (MALDI TOF) a diminuição ou desaparecimento de certos picos específicos de carbapenêmicos em um espectro de massa quando a suspensão é previamente incubada com o carbapenêmico (39, 40). Os espectros são medidos entre m/z 160 e 600, utilizando um espectrômetro de massa Microflex LT (39). O método foi descrito em vários estudos como tendo boa sensibilidade e especificidade, com exceção de enzimas do grupo OXA-48. Para corrigir este problema, NH_4HCO_3 pode ser adicionado à reação, e esta modificação, conforme mostrado indicado em um estudo, melhora a detecção de OXA-48 (41). No entanto, essa metodologia ainda não foi avaliada em um estudo multicêntrico ou em vários estudos de centro único. Outra característica pouco prática é que as configurações para o MALDI-TOF precisam ser alteradas em comparação para o que é usado para identificação de espécies (41).

Técnica de fluxo lateral

Uma nova técnica imunocromatográfica de fluxo lateral foi recentemente descrita. O teste é baseado na captura imunológica de epítomos de OXA-48, utilizando nanopartículas de ouro coloidais ligadas a uma membrana de nitrocelulose dentro de um dispositivo de fluxo lateral. O teste se baseia no princípio que anticorpos monoclonais anti-OXA-48 são selecionados como reagentes de captura específicos, para identificação direta de enzimas OXA-48-like (42). O ensaio demora cerca de quatro minutos e foi avaliado tanto em colônias e de frascos de hemocultura contaminados (43-46). Recentemente, um teste semelhante para KPC também foi desenvolvido, mas a sua robustez não foi avaliada em estudos multicêntricos ou em vários estudos de centro único (46).

2.4.6 Cepas controle

Abaixo estão listadas algumas cepas controle para experimentos fenotípicos e genotípicos. Intervalos de controle de qualidade para essas cepas não estão disponíveis. Usuários de métodos comerciais devem consultar os manuais específicos para selecionar a cepa controle mais adequada.

Tabela 3 – Exemplos de cepas controle para testes de 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 negative

2.5 Referências

1. Canton R, Akova 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:pii: 8023.
3. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. Euro Surveill. 2015;20(45).
4. European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)
5. Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Gawryszewska I, Bojarska K, et al. NDM-producing Enterobacteriaceae in Poland, 2012-2014: interregional outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST11 and sporadic cases. J Antimicrob Chemother. 2016;71:85-91.
6. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2011;17(10):1791-8.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. Clin Microbiol Rev 2007;20:440–58.
11. 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.

12. 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.
13. Yamachika S, Sugihara C, Kamai Y, Yamashita M. Correlation between penicillin-binding protein 2 mutations and carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* 2013;62:429-36.
14. 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.
15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Website with MIC-distributions. (<http://mic.eucast.org/>, accessed on 23 December 2012).
16. 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.
17. Tato M, Coque TM, Ruiz-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.
18. Vading M, Samuelsen O, 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.
19. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen O, 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.
20. 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.
21. Porres-Osante N, de Champs C, Dupont H, Torres C, Mammeri H. Use of avibactam to detect Ambler class A carbapenemases and OXA-48 β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;79:399-400.
22. Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Evaluation of avibactam-supplemented combination disk tests for the detection of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;79:252-4.
23. 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
24. 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.
25. Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis SD, Daikos GL, Bou Casals J, Tzouveleakis 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.
26. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1503-7.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of the RAPIDE CR CARBA NP, the Rapid CARB ScreenR and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2015 ; 70):3014-22.
31. Kabir MH, Meunier D, Hopkins KL, Giske CG, Woodford N. A two-centre evaluation of RAPIDE CR CARBA NP for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother.* 2016 ;71:1213-6.
32. Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Comparative evaluation of two chromogenic tests for rapid detection of carbapenemase in Enterobacteriaceae and in *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Clin Microbiol.* 2014;52(8):3060-3.

33. Noel A, Huang TD, Berhin C, Hoebeke M, et al. Comparative Evaluation of Four Phenotypic Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. *J Clin Microbiol.* 2017 Feb;55(2):510-518.
34. Pasteran F, Veliz O, Ceriana P, Lucero C, Rapoport M, et al. Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2015 ;53(6):1996-8.
35. Compain F, Gallah S, Eckert C, Arlet G, Ramahefasolo A, et al. Assessment of Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae with the Rapid and Easy-to-Use Chromogenic β -Carba Test. *J Clin Microbiol.* 2016;54(12):3065-3068
36. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One.* 2015;10(3):e0123690.
37. Yamada K, Kashiwa M, Arai K, Nagano N, Saito R. Comparison of the Modified-Hodge test, Carba NP test, and carbapenem inactivation method as screening methods for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods.* 2016;128:48-51.
38. Tijet N, Patel SN, Melano RG. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test *J Antimicrob Chemother.* 2016 ;71(1):274-6.
39. Hrabak J, Studentova V, Walkova R, Zemlickova 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.
40. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, et al. Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *J Clin Microbiol.* 2015; 53:2163-71.
41. Papagiannitsis CC, Študentova V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol.* 2015;53(5):1731.
42. Pasteran F, Denorme L, Ote I, Gomez S, De Belder D, Glupczynski Y, Bogaerts P, Ghiglione B, Power P, Mertens P, Corso A. Rapid identification of OXA-48 and OXA-163 Subfamilies in carbapenem-resistant gram-negative bacilli with a novel immunochromatographic lateral flow assay. *J Clin Microbiol.* 2016;54(11):2832-2836.
43. Dortet L, Jousset A, Sainte-Rose V, Cuzon G, Naas T. Prospective evaluation of the OXA-48 K-SeT assay, an immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(7):1834-40.
44. Wareham DW, Shah R, Betts JW, Phee LM, Momin MH. Evaluation of an Immunochromatographic Lateral Flow Assay (OXA-48 K-SeT) for Rapid Detection of OXA-48-Like Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2016;54(2):471-3.
45. Meunier D, Vickers A, Pike R, Hill RL, Woodford N, Hopkins KL. Evaluation of the K-SeT R.E.S.I.S.T. immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC and OXA-48-like carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2357-9.
46. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang TD, et al. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(5):1217-22.

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

Importância da detecção do mecanismo de resistência	
Necessário para categorização clínica de sensibilidade	Não
Para propósitos de controle de infecção	Sim
Para propósitos de saúde pública	Sim

3.1 Definição

ESBLs são enzimas capazes de hidrolisar a maioria das penicilinas e cefalosporinas, incluindo compostos oximiino- 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) e por diazabicyclooctanonas (avibactam) (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).

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 2015 mostraram que a taxa de isolados de *K. pneumoniae* invasivos não sensíveis às cefalosporinas de terceira geração ultrapassou os 20% ou mesmo 50% em muitos países europeus. Com exceção da Grécia e da Itália que apresentam uma alta proporção de isolados produtores de carbapenemases tipo KPC, 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 determinada 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, 9-11).

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).

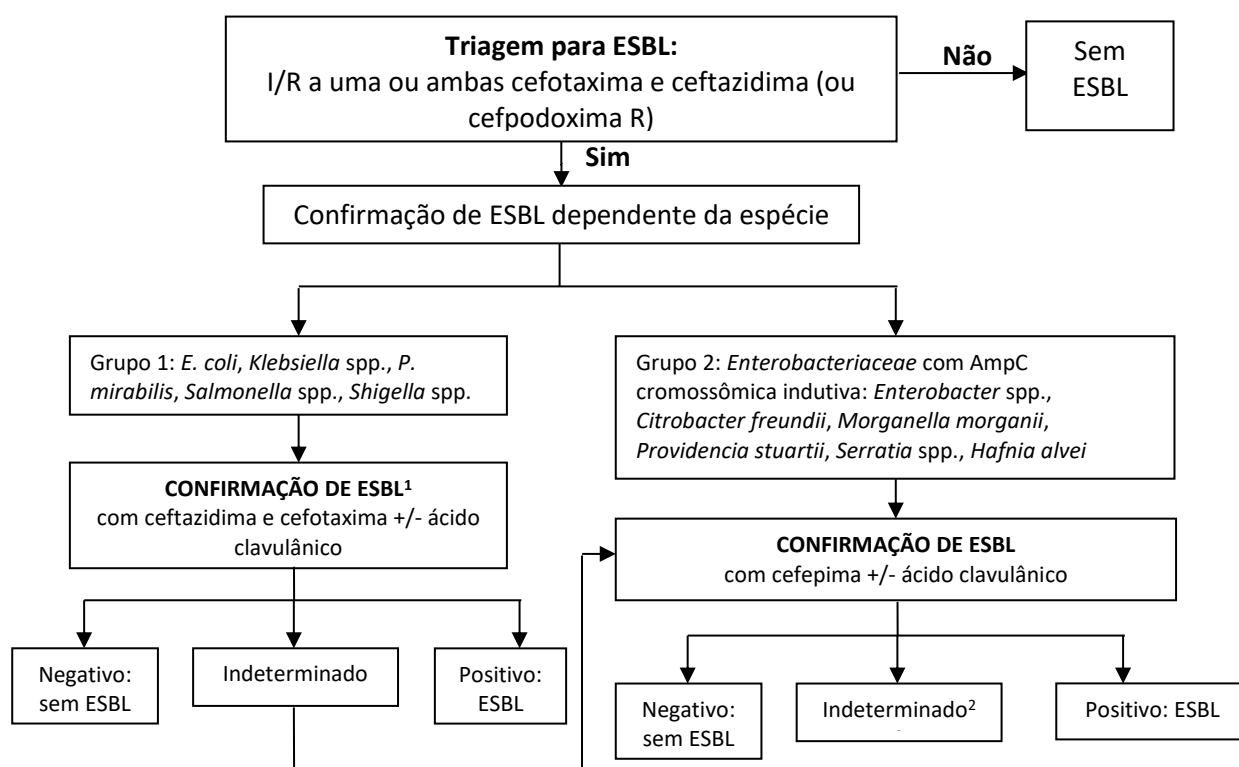
O valor de corte para triagem > 1 mg/L é recomendado para cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e cefpodoxima, de acordo com as diretrizes do EUCAST e do CLSI (Tabela 1) (12, 13). O ponto de corte clínico do EUCAST para *Enterobacteriaceae* é também $S \leq 1$ mg/L (12). A cefpodoxima é a cefalosporina 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 (14, 15) 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* (13-19).

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 µg) ou Ceftriaxona (30 µg) E ceftazidima (10 µg)	Halo de inibição < 21 mm Halo de inibição < 23 mm Halo de inibição < 22 mm
	Cefpodoxima (10 µg)	Halo de inibição < 21 mm

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

Figura 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., *Raoutella* 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 (14, 22, 23).

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) (20, 21, 24). Em um estudo multicêntrico o TDC apresentou especificidade superior ao teste gradiente ESBL e sensibilidade comparável (25). 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 (17-19).

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) (26, 27).

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 (20). 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 (24).

E. Testes bioquímicos (colorimétricos)

O teste ESBL NDP foi descrito primeiramente em 2012, e usa cefotaxima como indicador antimicrobiano, com tazobactam como inibidor (28). É realizado em placas de 96 poços ou em tubos separados. Mudança de cor de vermelho para amarelo é considerado um teste positivo. O teste também foi usado diretamente em amostras do paciente (29). Excelentes sensibilidades e especificidades foram descritas, mas o teste não foi avaliado em estudo multicêntrico.

O teste β -LACTA é um teste colorimétrico utilizando um substrato de cefalosporina cromogênica (HMRZ-86) em isolados bacterianos e também diretamente em amostras clínicas (30). Em um estudo prospectivo multicêntrico na Bélgica e na França, verificou-se que apresentava uma excelente sensibilidade e especificidade para *E. coli* e *K. pneumoniae* (96% e 100%, respectivamente), enquanto mostrou menor sensibilidade (67%) para espécies que produzem β -lactamases AmpC induzíveis. O alto valor preditivo negativo para *E. coli* e *K. pneumoniae* (99% em áreas com prevalência de resistência as C3G variando entre 10-30%) faz com que este teste simples seja muito eficiente para a previsão de resistência a cefalosporinas de terceira geração, particularmente em cepas produtoras de β -lactamase de espectro estendido.

F. 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 (34).

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 (20, 34, 35). 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, (34), com a rara exceção das β -lactamases ACC, que não conferem resistência à cefoxitina (36).

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, 37-39). 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 (40, 41). Se a detecção ainda é considerada relevante, recomenda-se que os métodos moleculares para detecção de ESBL sejam utilizados.

3.4.4 Confirmação genotípica

Para a confirmação genotípica da presença de genes de ESBL, existem diversos métodos disponíveis desde de PCR com sequenciamento até o sequenciamento de genoma completo bacteriano seguido de mapeamento *in silico* dos genes de resistência. Existem também técnicas à base de *microarray* de DNA. Existem métodos comerciais e *in-house* disponíveis, mas estes métodos não foram sistematicamente avaliados e, portanto, não serão abordados nesse documento. Informações sobre sequenciamento de genoma completo estão descritas em outro documento do EUCAST (42).

3.4.5 Controle de qualidade

Abaixo estão listadas algumas cepas controle para experimentos fenotípicos e genotípicos. Intervalos de controle de qualidade para essas cepas não estão disponíveis. Usuários de métodos comerciais devem consultar os manuais específicos para selecionar a cepa controle mais adequada.

Table 4. Exemplos de cepas 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, Canton 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 2014. 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 β -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 EtestR 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. Hirakata 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 EtestR 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. Sturenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL EtestR to detect extended-spectrum β -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. J Antimicrob Chemother. 2004;54:134-8.
28. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2012;50(9):3016-22.
29. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of ESBL-producing Enterobacteriaceae in blood cultures. Emerg Infect Dis. 2015;21(3):504-7.
30. Renvoise A, Decre D, Amarsy-Guerle R, Huang TD, Jost C, et al. Evaluation of the β -Lacta test, a rapid test detecting resistance to third-generation cephalosporins in clinical strains of Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2013;51(12):4012-7.
31. 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.
32. 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.
33. Sturenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL EtestR to detect extended-spectrum β -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. J Antimicrob Chemother. 2004; 54:134-8.
34. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009;22:161-82.
35. Munier GK, Johnson CL, Snyder JW, Moland ES, et al. 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.
36. 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.
37. Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Bottger 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.
38. Yang JL, Wang JT, Lauderdale TL, Chang SC. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacter cloacae* in Taiwan and comparison of 3 phenotypic confirmatory methods for detecting extended-spectrum β -lactamase production. J Microbiol Immunol Infect. 2009;42:310-6.
39. 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.

40. 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.
41. March A, Aschbacher R, Dhanji H, Livermore DM, Bottcher 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.
42. Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, et al. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(1):2-22.

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

Importância da detecção de mecanismos de resistência	
Necessário para categorização clínica de sensibilidade	Não
Para propósitos de controle de infecção	Sim
Para propósitos de saúde pública	Sim

23

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. morganii* (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, pelo menos na Europa. 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

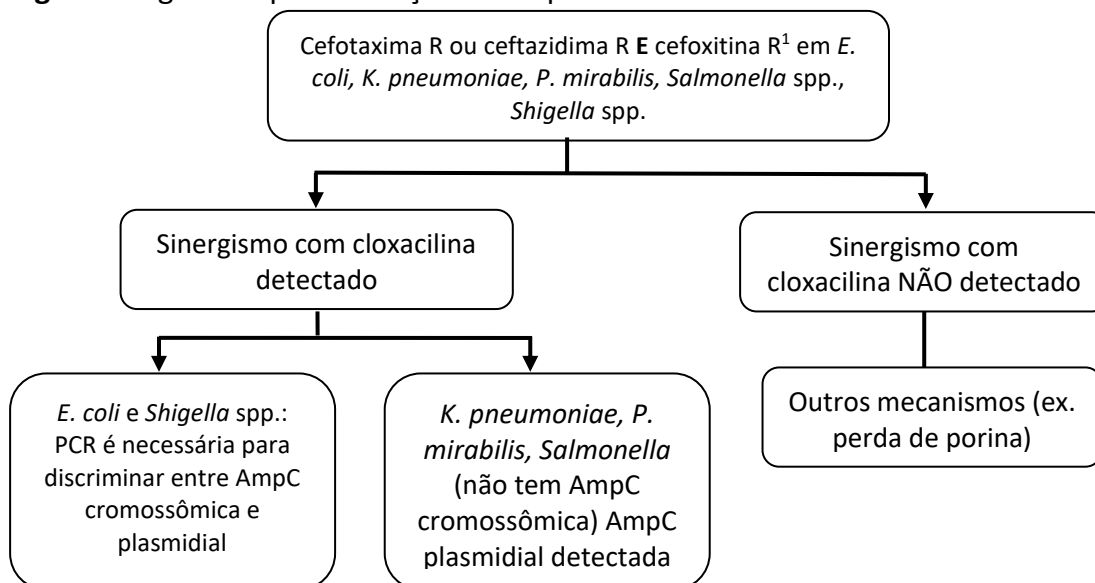
Numerosas *Enterobacteriaceae* e alguns outros bacilos Gram-negativos produzem AmpCs naturais, seja constitutivamente a um nível mínimo (por exemplo, *E. coli*,

Acinetobacter baumannii) ou por indução (por exemplo, *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *M. morganii*, *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 (zona de inibição < 19 mm) combinada com resistência fenotípica de ceftazidima e/ou cefotaxima (conforme definida pelos pontos de corte) 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). Para definição de resistência a cefotaxima e ceftazidima utilizar os pontos de corte do EUCAST atuais. 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). 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.

Abaixo estão listadas algumas cepas controle para experimentos fenotípicos e genotípicos. Intervalos de controle de qualidade para essas cepas não estão disponíveis. Usuários de métodos comerciais devem consultar os manuais específicos para selecionar a cepa controle mais adequada.

Tabela 1. Exemplos de cepas controle 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>K. pneumoniae</i> CCUG 58545	Acquired DHA
<i>E. coli</i> ATCC 25922	AmpC negativa

4.5 Referências

1. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009;22:161-82.
2. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:1-11.
3. Beceiro A, Bou G. Class C β -lactamases: an increasing problem worldwide. Rev Med Microbiol. 2004;15:141-152.
4. Empel J, Hrabák J, Kozińska A, Bergerová T, Urbášková P, Kern-Zdanowicz I, Gniadkowski M. DHA1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in the Czech Republic. Microb Drug Resist. 2010;16:291-295.
5. 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.
6. 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.
7. 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 β -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. Martinez-Martinez L. Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier. Clin Microbiol Infect. 2008;14 Suppl 1:82-9.
12. Halstead FD, Vanstone GL, Balakrishnan I. An evaluation of the Mast D69C AmpC Detection Disc Set for the detection of inducible and derepressed AmpC β -lactamases. J Antimicrob Chemother. 2012;67:2303-4.
13. Ingram PR, Inglis TJ, Vanzetti TR, Henderson BA, Harnett GB, Murray RJ. Comparison of methods for AmpC β -lactamase detection in Enterobacteriaceae. J Med Microbiol. 2011; 60(Pt 6):715-21.
14. Peter-Getzlaff S, Polsfuss S, Poledica M, Hombach M, Giger J et al. Detection of AmpC β -lactamase in *Escherichia coli*: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. J

Clin Microbiol. 2011;49:2924-32.

15. 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.
16. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2002;40:2153-62.
17. 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.
18. 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.

5. Bacilos Gram negativos resistentes a polimixina

Importância da detecção de mecanismos de resistência	
Necessário para categorização clínica de sensibilidade	Sim
Para propósito de controle de infecção	Sim
Para propósito de saúde pública	Sim

A resistência adquirida às polimixinas em Enterobacteriaceae surgiu nos últimos anos no mundo inteiro. A resistência, em especial, a mediada por plasmídeos, tanto em animais, produtos alimentares e seres humanos é preocupante, uma vez que há uma grande propensão para a disseminação horizontal.

27

Anteriormente, a resistência às polimixinas foi relatada como sendo sempre mediada cromossomicamente e geralmente relacionada a mutações em vários genes do sistema regulador de dois componentes para a biossíntese do lípido A e, portanto, regulação da carga no lipopolissacarídeo (LPS) (1,2). Em 2015, foram feitos os primeiros relatos sobre resistência à colistina mediada por plasmídeo os quais foram relacionados a uma fosfoetanolamina transferase de origem plasmidial, que adiciona um grupo fosfoetanolamina ao lípido A. O efeito resultante é a diminuição da carga negativa no LPS e, assim, menor interação com as polimixinas carregadas positivamente. O novo determinante de resistência foi denominado MCR-1 (3). Desde então, este mecanismo de resistência foi documentado em todos os continentes. Um isolado remonta à década de 1980, mas parece que o surgimento mundial ocorreu há cerca de 5 anos (4). Durante 2016, duas novas variantes do MCR-1 foram descritas - MCR-1.2 e MCR-2 (5, 6).

Em cepas invasivas europeias de *K. pneumoniae*, as taxas gerais de resistência à colistina são de 8,6% e podem chegar a 29% em isolados resistentes aos carbapenêmicos (7). Deve-se notar que a variação nas taxas entre diferentes países é muito alta e que questões metodológicas podem contribuir para números inflacionados. Acredita-se que a maioria da resistência seja devido a mecanismos cromossômicos, embora existam vários relatos sobre Enterobacteriaceae produtora de carbapenemase com MCR-1 (4).

Atualmente, não existem métodos que tenham sido avaliados extensivamente para a caracterização fenotípica dos diferentes mecanismos de resistência às polimixinas, exceto a determinação da CIM pela microdiluição em caldo (as técnicas de gradiente de difusão e de disco-difusão não são confiáveis para esta classe de antibióticos). Recentemente, descobriu-se que as enzimas MCR são dependentes de zinco para sua hidrólise e que a quelatação de zinco pode, portanto, inibir sua atividade (8). Por conseguinte, são esperados o desenvolvimento de testes de inibição baseados em EDTA ou ácido dipicolínico. No entanto, o foco atual está na detecção da resistência às polimixinas, independentemente do mecanismo. Os laboratórios são aconselhados a usar sempre a microdiluição em caldo para os testes de suscetibilidade à colistina e a usar sempre o sulfato de colistina (9). Especificamente, os testes de disco-difusão e de gradiente não devem ser usados, pois estão associados ao alto risco de erros maiores (major erros) e erros muito maiores (very major erros) no teste de suscetibilidade (10). Recentemente, um método colorimétrico também foi descrito, mas ainda não foi testado quanto à robustez em mais de um centro (11). Quando necessário realizar estudos mais aprofundados sobre os mecanismos de resistência, deve-se utilizar métodos moleculares. A recomendação atual é realizar tais testes adicionais somente em isolados resistentes à colistina.

O controle de qualidade para teste da colistina deve ser realizado tanto com uma cepa sensível

de QC (*E. coli* ATCC 25922 ou *P. aeruginosa* ATCC 27853) como com cepa resistente à colistina *E. coli* NCTC 13846 (positiva para *mcr-1*). Para *E. coli* NCTC 13846, o valor alvo de MIC para colistina é 4 mg/L e apenas ocasionalmente, 2 ou 8 mg/L.

5.1 Referências

1. Giske CG. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomicin, mecillinam and nitrofurantoin. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(10):899-905.
2. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 2014; 5:643.
3. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016 ;16(2):161-8.
4. Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill.* 2016;21(9).
5. Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, Henrici De Angelis L, et al. *mcr-1.2*, a New *mcr* Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60:5612-5.
6. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* 2016; 21(27).
7. European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)
8. Hinchliffe P, Yang QE, Portal E, Young T, Li H, et al. Insights into the Mechanistic Basis of Plasmid-Mediated Colistin Resistance from Crystal Structures of the Catalytic Domain of MCR-1. *Sci Rep.* 2017;7: 39392.
9. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(6):1953-8.
10. Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S, Tsakris A. Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Aug;59(8):4625-30.
11. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(6):1038-43.

6. *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* produtores de carbapenemase

Importância da detecção de mecanismos de resistência	
Necessário para categorização clínica de sensibilidade	Não
Para propósito de controle de infecção	Sim
Para propósito de saúde pública	Sim

P. aeruginosa e o complexo *Acinetobacter baumannii* produtores de carbapenemases são comuns em muitas partes da Europa (1). Em *Pseudomonas aeruginosa*, VIM, principalmente VIM-2, é a enzima predominante na Europa, mas os produtores de KPC também têm sido notados em países da América Latina (2). Em *Acinetobacter*, as carbapenemases OXA, principalmente as enzimas OXA-23-, OXA 24/40-, OXA-58-, OXA-143-, OXA-235-like, são encontradas mais frequentemente (3).

Atualmente, não há inibidores específicos das carbapenemases tipo OXA de classe D e nenhum dos métodos fenotípicos existentes fornece resultados satisfatórios para a detecção/identificação dessas carbapenemases em *Acinetobacter*. Testes colorimétricos foram testados, mas em geral não se mostraram precisos neste gênero (4). *Acinetobacter* pode também ter carbapenemases do tipo MBL e é possível que os ensaios possam funcionar melhor com estas enzimas.

Para *P. aeruginosa*, os ensaios de Etest® para MBL, assim como os ensaios baseados em disco, têm sido usados há várias décadas, mas são prejudicados pela sua baixa especificidade (5-7). Recentemente, vários autores também sugeriram várias modificações dos testes de combinação de disco (de imipenem ou meropenem combinado com vários compostos inibidores da classe B (EDTA ou DPA), mas estes foram validados em estudos de centro único, podendo ser diferentes em cenário diferentes (8, 9). Os testes colorimétricos apresentam melhor desempenho para *P. aeruginosa* do que para *Acinetobacter* (10) e provavelmente são os testes com maior especificidade comprovada no momento. Ainda assim, nenhum teste parece suficientemente específico para ser usado como teste autônomo sem confirmação molecular.

Em geral, devem ser utilizadas métodos genotípicos para a caracterização de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* possivelmente produtoras de carbapenemases, mas particularmente para *P. aeruginosa*, algumas das abordagens fenotípicas acima mencionadas poderiam, provavelmente, ter valor para testes iniciais.

Deve-se notar que o teste de carbapenemase seria clinicamente mais relevante em *P. aeruginosa*, uma vez que esta espécie pode ser resistente a carbapenêmicos através de múltiplos mecanismos cromossômicos (efluxo ativo, alteração ou deficiência de porina). Inversamente, a resistência a carbapenêmicos em *Acinetobacter* é quase sempre devido à produção de carbapenemases tipo OXA.

Algumas cepas controle sugeridas são *P. aeruginosa* NCTC 13437 (produtora de VIM-10) e *A. baumannii* NCTC 13301 (produtora de OXA-23). Não existem intervalos de CQ para estas cepas.

6.1 Referências

1. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36 Suppl 3:S8-14.
2. Labarca JA, Salles MJ, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42:276-92.
3. Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(5):2121-6.
4. Noël A, Huang TD, Berhin C, Hoebeke M, Bouchahrouf W, Yunus S, Bogaerts P, Glupczynski Y. Comparative Evaluation of Four Phenotypic Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. *J Clin Microbiol*. 2017;55(2):510-518.
5. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 41, 4623-4629.
6. Hansen F, Hammerum AM, Skov R, Haldorsen B, Sundsfjord A, Samuelsen O. Evaluation of the total MBL confirm kit (ROSCO) for detection of metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;79(4):486-8.
7. Samuelsen O, Buarø L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(4):827-30.
8. Fournier D, Garnier P, Jeannot K, Mille A, Gomez AS, Plésiat P. A convenient method to screen for carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2013;51(11):3846-8.
9. Heinrichs A, Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Evaluation of several phenotypic methods for the detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(7):1467-74.
10. Kabir MH, Meunier D, Hopkins KL, Giske CG, Woodford N. A two-centre evaluation of RAPIDEC® CARBA NP for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(5):1213-6.

7. *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA)

Importância do mecanismo de resistência	
Necessário para categorização clínica da sensibilidade	Sim
Para propósito de controle de infecção	Sim
Para propósito de saúde pública	Sim

7.1 Definição

Isolados de *S. aureus* com uma proteína auxiliar de ligação à penicilina (PBP2a ou a PBP2c codificada pelos genes *mecA* ou *mecC*) para a qual os agentes β -lactâmicos têm uma baixa afinidade, exceto para a nova classe de cefalosporinas que têm atividade anti-MRSA (ceftarolina e ceftobiprole).

31

7.2 Importância clínica e/ou epidemiológica

S. aureus resistente à meticilina 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 meticilina 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.

7.3 Mecanismos de resistência

O principal mecanismo de resistência é a produção de proteína auxiliar de ligação à penicilina PBP2a/PBP2c que tornam o isolado resistente a todos os β -lactâmicos, exceto a nova classe de cefalosporinas “anti-MRSA”. Esses agentes têm afinidade suficientemente elevada à PBP2a, e provavelmente também à PBP2 codificada por *mecC* (anteriormente designado *mecA*_{LGA251}), para serem ativos contra MRSA (4). As PBPs auxiliares são codificadas pelo gene *mecA* ou *mecC* recentemente descrito (5). O elemento *mec* é exógeno ao *S. aureus* e não está presente em *S. aureus* sensível à meticilina. Cepas com expressão heterogênea do gene *mecA* e CIMs 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).

Isolados de *S. aureus* positivos para *mecA* que são sensíveis tanto a cefoxitina como a oxacilina (OS-MRSA) devido à inativação do *mecA* foram descritos em diferentes partes do mundo. Essas cepas são diferentes dos MRSA com resistência heterogênea, **que também são sensíveis à oxacilina, mas resistentes à cefoxitina** (7, 8). Estima-se que a frequência de tais isolados seja aproximadamente 3% de acordo com resultados fenotípicos convencionais combinados com resultados de PCR positivos para *mecA*.

Reversão da suscetibilidade à resistência a meticilina durante o uso prolongado de antibioticoterapia foi bem documentada em um caso (9), mas estima-se que tenha ocorrido em outros casos; a taxa dessa resistência reversível é, no entanto, desconhecida no momento atual. Tais isolados podem, por definição, ser detectados apenas por análise molecular. Deve-se notar que isso não se aplica para o fato que a análise molecular deva ser feita com todas as cepas, mas o fenômeno pode ter importância em caso de falha terapêutica. Se o gene *mecA* for detectado aleatoriamente ou devido a triagem por falha terapêutica, o isolado deve ser sempre relatado como resistente.

7.4 Métodos recomendados para a detecção da resistência à meticilina em *S. aureus*

A resistência à oxacilina/meticilina pode ser detectada fenotipicamente pela determinação da CIM bem como por teste de disco-difusão. Aglutinação com látex pode ser usado para detectar PBP2a, mas não é confiável para detectar PBP2c. Detecção genotípica utilizando a PCR é confiável.

7.4.1 Detecção por determinação da CIM ou disco-difusão

A expressão heterogênea de resistência afeta particularmente a CIM de oxacilina, a qual pode se mostrar sensível. A cefoxitina é um marcador muito sensível e específico da resistência mediada por *mecA/mecC* e é o fármaco de eleição para o disco-difusão. O uso do teste de 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*.

A. Microdiluição em caldo:

A metodologia padrão (ISSO 20776-1) deve ser utilizada e cepas com CIM > 4 mg/L deve ser reportadas como resistentes a meticilina.

B. Disco-difusão:

Utilizar a metodologia de disco-difusão do EUCAST. Cepas com um halo de inibição < 22 mm para a cefoxitina devem ser reportadas como resistentes a meticilina.

7.4.2 Detecção por métodos genotípicos e aglutinação com látex

A detecção genotípica dos genes *mecA* e *mecC* por PCR (10, 11) e a detecção da proteína PBP2a por kit de aglutinação com látex é possível pela utilização de testes comerciais ou “in house”. A proteína PBP2c não é detectada pela maioria dos testes comerciais.

7.4.3 Cepas controle

Abaixo estão listadas algumas cepas controle para experimentos fenotípicos e genotípicos. Intervalos de controle de qualidade para essas cepas não estão disponíveis. Usuários de métodos comerciais devem consultar os manuais específicos para selecionar a cepa controle mais adequada.

Tabela 1. Exemplos de cepas controle para detecção de MRSA.

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

7.5 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. Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. J Infect Chemother 2007; 13:79–86.
8. Andrade-Figueiredo M, Leal-Balbino TC. Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. BMC Microbiol. 2016; 16:115.
9. Proulx MK, Palace SG, Gandra S, Torres B, Weir S, Stiles T, Ellison RT 3rd, Goguen JD. Reversion From Methicillin Susceptibility to Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* During Treatment of Bacteremia. J Infect Dis. 2016; 213:1041-8.
10. 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.
11. 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.

8. *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina

Importância da detecção do mecanismo	
Necessário para categorização clínica da sensibilidade	Sim
Para propósito de controle de infecção	Sim
Para propósito de saúde pública	Sim

8.1 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 de alto nível à vancomicina mediada por VanA (VRSA) e isolados com resistência de baixo nível não mediada por VanA. Assim, a denominação de *S. aureus* intermediário à vancomicina (VISA) e *S. aureus* com heterorresistência intermediária aos vancomicina (hVISA) tem sido mantidas 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 específicos, por exemplo, quando há suspeita de falha terapêutica, o teste para hVISA é justificável. Devido à complexidade da confirmação de um hVISA, a vigilância antimicrobiana está focada na detecção de VISA e VRSA.

VRSA: *S. aureus* resistente à vancomicina:

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

VISA: *S. aureus* intermediário à vancomicina:

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

hVISA: *S. aureus* com heterorresistência intermediária à vancomicina:

Isolados de *S. aureus* sensíveis à vancomicina (CIMs ≤ 2 mg/L), mas com populações minoritárias (1 em cada 10⁶ células) com CIM de vancomicina > 2 mg/L, conforme investigação do perfil por análise populacional.

Deve ser mencionado que embora os termos acima ainda sejam utilizados, todas as categorias acima devem ser consideradas como clinicamente resistentes.

8.2 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 hVISA é ≤ 2% dos MRSA na Europa, e VISA abaixo de 0,1% (1). VRSA ainda não foi relatado na Europa (1) e atualmente é extremamente raro em todo o mundo (2). A prevalência de hVISA pode ser consideravelmente maior em uma região específica (1), o que é mais frequentemente associado a disseminação de linhagens clonais específicas (2). A grande maioria dos isolados com CIM elevada (VISA) ou contendo subpopulações resistentes (hVISA) são MRSA.

Tem sido difícil determinar o significado clínico do hVISA uma vez que nenhum estudo prospectivo bem controlado foi realizado. No entanto, acredita-se que a presença do fenótipo hVISA possa estar associada com pior resposta clínica, pelo menos em infecções graves (2, 3). Por isso, é prudente investigar hVISA em infecções da corrente sanguínea que não respondem à terapia. Recentemente, tem surgido cada vez mais evidências de que os isolados com CIMs correspondentes a valores no limite superior do intervalo de sensibilidade (CIM > 1 mg/L) estão associados com resposta clínica reduzida bem como a um aumento da mortalidade em, pelo menos, infecções da corrente sanguínea (3-8). A possível causa dessas observações não é clara, mas pode estar associada a exposição a baixos níveis de vancomicina (9,10). Além disso, a interpretação dos achados de diferentes estudos se torna confusa devido as diferenças de CIM as quais são geradas por diferentes métodos (8, 9).

O mecanismo de hVISA é complexo e a detecção depende de análise populacional (11), o que é complicado porque requer equipamentos especiais bem como um alto nível de conhecimento técnico. A metodologia para a detecção de hVISA será descrita, mas para fins de vigilância a informação é restrita a VISA e VRSA, que são definidos em conjunto como isolados com uma CIM > 2 mg/L.

8.3 Mecanismo de resistência

Para VRSA a resistência é mediada pelo gene *vanA* exogenamente adquirido de *Enterococcus*. Tanto para os isolados VISA como hVISA a resistência é endógena (ou seja, mutações cromossômicas) e o mecanismo é de alta complexidade, sem que apenas um único gene seja responsável. O fenótipo VISA/hVISA está ligado a um espessamento da parede celular bacteriana, com hiperprodução dos alvos de ligação de glicopeptídeos. O fenótipo hVISA é frequentemente instável no laboratório, mas hVISA têm a capacidade de se tornar um GISA *in vivo* (2).

8.4 Métodos recomendados para a detecção de *S. aureus* não sensíveis à vancomicina

O método de disco-difusão não pode ser utilizado para detectar hVISA ou VISA, mas possivelmente pode ser usado para detectar VRSA, embora exista apenas um número limitado de estudos que suportem essa evidência (12).

8.4.1 Determinação da CIM

A metodologia de microdiluição em caldo como recomendado pelo EUCAST (ISO 20776-1) é o padrão ouro. Deve ser mencionado que a CIM determinada por métodos de tira gradiente apresentam resultados que podem ser 0,5 a 1 diluições de razão 2, mais altos que a CIM determinada por microdiluição em caldo (8, 9). O ponto de corte do 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. hVISA não são detectados por determinação da CIM.

8.4.2 Teste para detecção de VRSA, VISA e hVISA

A detecção de hVISA tem-se revelado difícil e, portanto, a detecção é dividida em

triagem e confirmação. Para a triagem, uma série de métodos específicos foram desenvolvidos. A confirmação deve ser feita por análise populacional em ágar contendo uma gama de concentrações de vancomicina (PAP-AUC) (11). Este método é tecnicamente desafiador, para aqueles sem uma vasta experiência laboratorial e, consequentemente, é realizado principalmente por laboratórios de referência. Um método baseado em triagem em ágar com vancomicina e caseína (13) mostrou alta sensibilidade e especificidade, mas até agora só foi avaliado em um estudo, e por isso não pode ser recomendado. Os métodos a seguir irão detectar VRSA e VISA, e foram avaliados em estudos multicêntricos (14, 15).

A. Teste de macro gradiente:

Este teste fornece uma indicação da sensibilidade reduzida à vancomicina, mas deve ficar claro que as leituras não são CIMs. Além disso, o teste não diferencia hVISA, VISA e VRSA. O teste deve ser feito de acordo com as instruções do fabricante. É importante ficar claro que o inóculo é bem maior (McFarland 2,0) do que aquele utilizado nos testes convencionais com tiras de gradiente. Este teste deve ser feito com placas de Infuso Cérebro-Coração (Brain Heart Infusion) e não em Mueller-Hinton. Além disso, o teste deve ser lido em 48h. Um resultado positivo é indicado por leituras ≥ 8 mg/L tanto de vancomicina quanto de 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: VRSA, VISA ou hVISA
- Leitura da teicoplanina 8 mg/L: Testar a vancomicina, se a leitura da vancomicina for ≥ 8 mg/L, então se trata de VRSA, VISA ou hVISA
- Leitura da teicoplanina < 8 mg/L: Não é VRSA, VISA ou hVISA

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/L de teicoplanina é utilizada (14). 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 colocados 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 hVISA/VISA:

Qualquer isolado com triagem positiva para sensibilidade reduzida e não identificado como VRSA ou VISA por determinação da CIM pode ser hVISA e deve ser investigado por análise de perfil populacional-área sob a curva (PAP-AUC) (9), normalmente via encaminhamento para um laboratório de referência.

8.4.3 Cepas controle

Abaixo estão listadas algumas cepas controle para experimentos fenotípicos e genotípicos. Intervalos de controle de qualidade para essas cepas não estão disponíveis. Usuários de métodos comerciais devem consultar os manuais específicos para selecionar a cepa controle mais adequada.

Tabela 1 – Exemplos de cepas controle para testes de resistência à vancomicina em *S. aureus*.

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

8.5 Referências

1. Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet*. 2013;382(9888):205
2. 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
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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
7. 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.
8. 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.
9. Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MV, Anderson TL, Roberts SA, Warren SJ, Gao W, Howden BP, Johnson PD. Vancomycin AUC/MIC ratio and 30-day mortality in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Apr;57(4):1654-63.
10. Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MV, Anderson TL, Roberts SA, Warren SJ, Gao W, Johnson PD, Howden BP. Vancomycin minimum inhibitory concentration, host comorbidities and mortality in *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Dec;19(12):1163-8.
11. 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
12. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, McDougal LK, Chaitram J, McAllister S, Clark N, Killgore G, O'Hara CM, Jevitt L, Patel JB, Bozdogan B. Vancomycin-resistant

Staphylococcus aureus isolate from a patient in Pennsylvania. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48:275-80

13. 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.
14. 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.
15. Voss A, Mouton JW, van Elzakker EP, Hendrix RG, Goessens W, et al. A multi-center blinded study on the efficiency of phenotypic screening methods to detect glycopeptide intermediately susceptible *Staphylococcus aureus* (GISA) and heterogeneous GISA (hGISA). Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2007;6:9.

9. *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* resistentes à Vancomicina

Importância da detecção da resistência	
Necessário para categorização clínica da sensibilidade	Sim
Para propósito de controle de infecção/saúde pública	Sim
Para propósito de saúde pública	Sim

9.1 Definição

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

9.2 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 (1, 2). 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 (3, 4), e recentemente foram descritos quatro casos de falha terapêutica (5) indicando que teicoplanina deve ser utilizada com cuidado para o tratamento de infecção com Enterococo com VanB. Os valores de CIM típicos para as enzimas Van mais importantes clinicamente são mostrados na Tabela 1.

Table 1. CIMs típicas 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

9.3 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 (6-9), embora a VanM tenha aumentado significativamente em *E. faecium* na China (10).

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 (11). Enterococo variável a vancomicina (VVE) é um termo utilizado para VRE quando a expressão dos genes *van* é silenciosa devido a rearranjos genéticos os quais podem ser revertidos sob pressão seletiva pelo uso de glicopeptídeos (12,13). Além disso, VRE com baixa CIM é um termo utilizado para isolados VanB positivos que devido à pouca capacidade de serem induzidos por vancomicina apresentam baixa expressão dos genes *vanB* o que acarreta em valores de CIM abaixo do ponto de corte. Esses isolados com baixas CIM podem aumentar a CIM acima do ponto de corte devido a longas exposições à vancomicina (14). Ambos VVE e VRE com baixas CIM podem ser detectados apenas por testes moleculares. Sua prevalência atual em diferentes regiões geográficas é desconhecida.

9.4 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 nem sempre é confiável para detecção de isolados VANB positivos (15-17). Relatos mais antigos mostram que a detecção de resistência mediada por *vanB* é problemática por métodos automatizados (18). Desde então, atualizações tem sido feitas nos métodos automatizados, mas ainda faltam estudos mais recentes sobre o desempenho desses métodos para detecção de resistência mediada por *vanB*. O 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 (19).

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 ao teste positivo de arabinose. A espectrometria de massa MALDI-TOF nesse contexto é muito útil para a identificação de espécies de enterococos (20). Em locais onde MALDI-TOF não está disponível, o MGP (Metil-Alfa-D-Piranoside) ou o teste da motilidade pode ser utilizado para distinguir *E. gallinarum*/*E. casseliflavus* de *E. faecium* (MGP negativo e imóvel).

9.4.1 Determinação da CIM

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

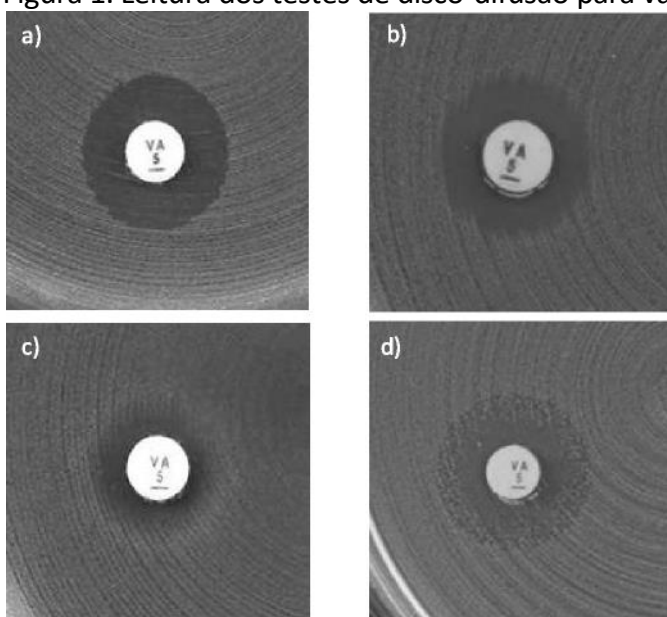
A microdiluição em caldo deve ser realizada de acordo com a norma ISO 20776-1, como recomendado pelo EUCAST.

9.4.2 Teste de disco-difusão

Para o 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. Em um estudo multicêntrico recente, o método de disco-difusão apresentou melhores resultados que o VITEK2 para detecção de *Enterococcus* produtores de VanB, em particular em laboratórios com experiência na leitura de halos de inibição difusos (19). O disco-difusão deve ser realizado de acordo com a metodologia de disco-difusão do 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 difusos com bordas irregulares e/ou colônias no interior do halo de inibição. Reportar como resistente independentemente do tamanho da zona de inibição.

9.4.3 Triagem em ágar

Ensaios 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 (19). 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* com 6 mg/L de vancomicina. 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.

9.4.4 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 (20-22).

9.4.5 Controle de qualidade

Abaixo estão listadas algumas cepas controle para experimentos fenotípicos e genotípicos. Intervalos de controle de qualidade para essas cepas não estão disponíveis. Usuários de métodos comerciais devem consultar os manuais específicos para selecionar a cepa controle mais adequada.

Tabela 2. Exemplos de cepas controle para Enterococos.

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>)

9.5 Referências

1. Mazuski JE. Vancomycin-resistant enterococcus: risk factors, surveillance, infections, and treatment. *Surg Infect*. 2008;9:567-71.
2. Tenover FC, McDonald LC. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. *Curr Opin Infect Dis*. 2005;18:300-5.
3. 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.
4. 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.
5. Holmes NE, Ballard SA, Lam MM, Johnson PD, Grayson ML, Stinear TP, Howden BP. Genomic analysis of teicoplanin resistance emerging during treatment of vanB vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infections in solid organ transplant recipients including donor-derived cases, *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(9):2134-9.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, Leclercq R, Courvalin P, Cattoir V. DAla-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(10):4606-12.
10. Chen C, Sun J, Guo Y, Lin D, Guo Q, et al. High Prevalence of *vanM* in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(12):7795-8.
11. 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.
12. Sivertsen A, Pedersen T, Larssen KW, Bergh K, Ronning TG, et al. A Silenced *vanA* Gene Cluster on a Transferable Plasmid Caused an Outbreak of Vancomycin-Variable Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(7):4119-27.
13. Thaker MN, Kalan L, Waglechner N, Eshaghi A, Patel SN, et al. Vancomycin-variable enterococci can give rise to constitutive resistance during antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother*.

2015;59(3):1405-10.

14. Grabsch EA, Chua K, Xie S, Byrne J, Ballard SA, Ward PB, Grayson ML. Improved Detection of *vanB2*-Containing *Enterococcus faecium* with Vancomycin Susceptibility by Etest Using Oxgall Supplementation. J. Clin. Microbiol 2008; 46; 1961-4
15. 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.
16. Klare I, Fleige C, Geringer U, Witte W, Werner G. Performance of three chromogenic VRE screening agars, two EtestR vancomycin protocols, and different microdilution methods in detecting *vanB* genotype *Enterococcus faecium* with varying vancomycin MICs. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;74:171-6.
17. Wijesuriya TM, Perry P, Pryce T, Boehm J, Kay I, Flexman J, Coombs GW, Ingram PR. Low vancomycin MICs and fecal densities reduce the sensitivity of screening methods for vancomycin resistance in Enterococci. J Clin Microbiol. 2014 Aug;52(8):2829-33
18. Endtz HP, Van Den Braak N, Van Belkum A, Goessens WH, Kreft D, Stroebe AB, Verbrugh HA. Comparison of eight methods to detect vancomycin resistance in enterococci. J Clin Microbiol. 1998;36:592-4.
19. Hegstad K, Giske CG, Haldorsen B, Matuschek E, Schonning K, et al. Performance of the EUCAST disk diffusion method, the CLSI agar screen method, and the Vitek 2 automated antimicrobial susceptibility testing system for detection of clinical isolates of Enterococci with low- and medium-level VanB-type vancomycin resistance: a multicenter study. J Clin Microbiol. 2014;52(5):1582-9
20. Fang H, Ohlsson AK, Ullberg M, Ozenci 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
21. 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.
22. 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.
23. 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.

10. *Streptococcus pneumoniae* (tipo não-selvagem) não sensível à Penicilina

Importância da detecção da resistência	
Necessário para categorização clínica da sensibilidade	Sim
Para propósito de controle de infecção	Não
Para propósito de saúde pública	Sim

10.1 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 ligantes de penicilina (PBPs) modificadas com menor afinidade aos β -lactâmicos.

10.2 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 (1). 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 (2). 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.

10.3 Mecanismo de resistência

S. pneumoniae contém seis PBPs, dos quais PBP2x é o alvo principal da penicilina (3). A presença de genes "mosaico" que codificam PBPs de baixa afinidade é resultado de transferência horizontal de genes de estreptococos viridans comensais (3). 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* (4). 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 (5).

10.4 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.

10.4.1 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-tipos selvagens (sensíveis a penicilina) (6-8). 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 variada à benzilpenicilina, e a CIM de benzilpenicilina deve ser determinada para todas as amostras que não sejam sensíveis pelo método de triagem (8). O diâmetro do halo de inibição de oxacilina pode ser utilizado para prever a sensibilidade a outros β -lactâmicos além da penicilina, conforme Figura 1.

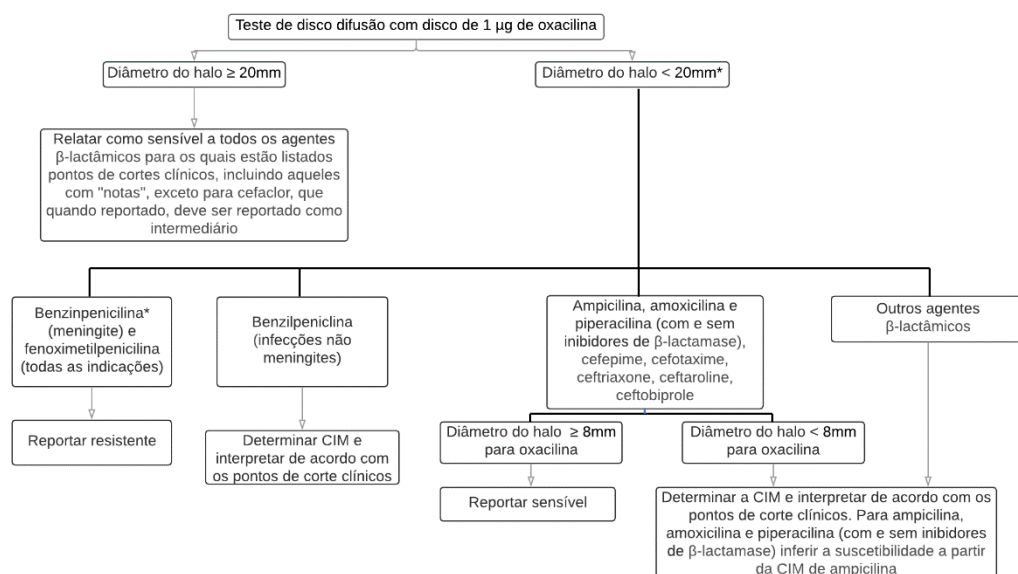


Figura 1: Triagem para resistência aos β -lactâmicos em *S. pneumoniae*

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

10.4.2 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 meníngeas foram revisados (4) e os pontos de corte atuais do EUCAST estão listados na Tabela 1 bem como na última versão da tabela de pontos de corte do EUCAST.

Tabela 1. 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	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. 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. 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.
Benzilpenicilina (meningite)	0,06	0,06	

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

10.4.3 Controle de qualidade

Abaixo está listada a cepa para controle de qualidade.

Tabela 2. Exemplo de cepas controle para teste de sensibilidade à benzilpenicilina.

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

10.5 Referências

- Kaplan SL, Mason EO Jr. Management of infections due to antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):628-44.
- Dagan R. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Infect. 2009;15 (Suppl 3):16-20.
- Hakenbeck R, Kaminski K, König A, van der Linden M, Paik J, Reichmann P, Zähler D. Penicillin-binding proteins in beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist 1999; 5: 91-99.
- 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.
- 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.
- Dixon JMS, Lipinski AE, Graham MEP. Detection and prevalence of pneumococci with increased resistance to penicillin. Can Med Assoc J 1977; 117: 1159-61.
- Swenson JM, Hill BC, Thornsberry C. Screening pneumococci for penicillin resistance. J Clin Microbiol 1986; 24: 749-52.
- 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