

**U.** PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

**Deteção molecular e caracterização de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado e / ou carbapenemases produzidas por Enterobactereaceas, responsáveis por infeções adquiridas no hospital e associadas a elevadas taxas de morbilidade e mortalidade.**

**Inês Alexandra Martins Oliveira**

**Dissertação de Mestrado em Medicina Legal**

**2014**



Inês Alexandra Martins Oliveira

**Deteção molecular e caracterização de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado e / ou carbapenemases produzidas por Enterobactereaceas, responsáveis por infeções adquiridas no hospital e associadas a elevadas taxas de morbilidade e mortalidade.**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Dra. Ana Constança Mendes

Categoria – Mestre em Microbiologia Molecular

Afiliação – Centro Hospitalar do Porto

Co-orientador – Prof<sup>a</sup> Doutora Paula Ferreira

Categoria – Professora Associada

Afiliação – Instituto de Ciências

Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.



---

## Agradecimentos

Em cada fase da vida de uma pessoa, surgem dificuldades e receios. Estes ajudam-nos a crescer e a testar os nossos limites, mas por outro lado, sabemos que existem sempre pessoas que nos apoiam em todas as adversidades que vão surgindo.

Assim, gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para a realização da presente dissertação de Mestrado.

Agradeço à minha orientadora, à Dra. Ana Constança Mendes. Pela sua orientação, pelo seu apoio incessável e pela sua amizade. Por ter confiado em mim e no meu trabalho.

À prof<sup>a</sup> Doutora Paula Ferreira pela sua co-orientação e pela sua amizade. Este trabalho não teria sido possível, sem a confiança que a professora antecipadamente depositou em mim.

À Prof<sup>a</sup> Doutora Margarida Lima e à Doutora Helena Ramos, por terem possibilitado o meu estudo e o meu trabalho no Centro Hospitalar do Porto.

À Professora Doutora Maria José Pinto Da Costa, por todo o conhecimento transmitido ao longo do Mestrado. Pelas pequenas, mas curiosas conversas, que tivemos sobre o desenvolvimento do meu estudo.

À Unidade de Biologia Molecular e ao Centro Hospitalar do Porto, por me terem facultado todo o material necessário. Assim como, aos profissionais da Unidade de Biologia Molecular, pela amizade e auxílio nas diversas tarefas.

A todos os meus amigos, por todos os momentos de descontração e de diálogo, fossem estes de preocupação ou de felicidade. E até mesmo, aqueles momentos de gracinhas sobre a demora da escrita da minha tese, que tanto me divertiram. Obrigado Miguel, por seres aquele amigo que até nessas circunstâncias me consegues arrancar sorrisos. E principalmente à minha melhor amiga, a ti Méliça, por tudo o que simplesmente representas para mim.

Ao meu namorado, pela partilha de todos os momentos, pelo seu apoio incondicional e por todo o seu afeto. Obrigado Pedro, por fazeres parte desta etapa da minha vida.

---

E finalmente, mas muito importante à minha família. Especialmente aos meus pais, por serem o meu maior apoio, pelo seu amor e carinho. Sem eles eu seria diferente.

**"O mundo está a caminhar para uma era pós-antibióticos, em que as  
infecções comuns e os pequenos ferimentos, tratáveis há décadas,  
podem voltar a matar".**

*Organização Mundial de Saúde*



---

## Resumo

O aumento da incidência de infeções causadas por bactérias Gram-negativo, produtoras de  $\beta$ -lactamases tornou-se uma grande preocupação, principalmente devido à produção de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs) e carbapenemases.

As infeções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos estão associadas a elevadas taxas de morbilidade e mortalidade, ao tempo de hospitalização prolongado, ao aumento dos custos de saúde e a opções terapêuticas limitadas. Por este motivo, a deteção precoce e a identificação destas enzimas de resistência é fundamental para a terapia antimicrobiana ideal, garantindo a introdução atempada dos procedimentos de controlo de infeção, a fim de impedir uma maior disseminação das bactérias para outros doentes, contribuindo para a diminuição da mortalidade e morbilidade.

Destacando esta importância, a partir de 104 culturas de isolados bacterianos provenientes de amostras biológicas de doentes hospitalizados no Centro Hospitalar do Porto, detetaram-se as bactérias que “habitam” no hospital, e no caso de suspeita de produção de  $\beta$ -lactamases e/ou carbapenemases procedeu-se à confirmação destes mecanismos de resistência por métodos moleculares.

Foi exequível verificar a presença de 30 isolados bacterianos produtores de ESBLs do tipo CTX-M-1 (43%), 21 isolados do tipo TEM (30%), 15 isolados produtores do tipo SHV (21%) e ainda, 9 isolados produtores de carbapenemases (12%). Assim como, a resistência que apresentam aos diferentes antibióticos, havendo muitas vezes e em muitos doentes, um elevado nível de resistência aos antibióticos disponíveis. Comprometendo assim, a recuperação do doente e deixando os profissionais de saúde, algumas vezes sem opção terapêutica adequada e eficaz.

Consequentemente, e sendo um dos objetivos deste estudo, foi possível apurar o número de mortes ocorridas entre os doentes hospitalizados e verificar que a presença de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado, poderá ser um fator adjuvante para a morte do doente em causa, mas não é factível, que por si só, este mecanismo de resistência seja preponderante relativamente à morte dos doentes.

---

## Abstract

The increasing incidence of infections caused by  $\beta$ -lactamase producing Gram-negative bacteria, has become a major concern, mostly due to extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) and carbapenemases.

Infections caused by antibiotic-resistant bacteria are associated with higher morbidity and mortality, prolonged hospitalization, increased healthcare costs and limited therapeutic options. For this reason, early detection and identification of resistance of these enzymes is essential for optimal antimicrobial therapy, ensuring the timely implementation of infection control procedures in order to prevent further spread of the bacteria to other patients, contributing to the decrease mortality and morbidity.

Underlining this importance, from biological samples of hospitalized patients in Centro Hospitalar of Porto, 104 bacterial isolates were studied allowing the recognition of the bacteria that “inhabit” the hospital, and in case of suspected production of  $\beta$ -lactamases and / or carbapenemase proceeded to confirm these mechanisms of resistance by molecular methods.

It was feasible to verify the presence of 30 bacterial isolates producing CTX-M-1 ESBLs (43%), 21 isolates TEM (30%), 15 isolates producing SHV (21%) and also 9 isolates producing carbapenemases (12%). As for the resistance profile to the different antibiotics, often a high level of resistance to available antibiotics was observed, compromising the recovery of the sick and leaving health professionals, sometimes without adequate and effective therapeutic option.

Consequently, and being one of the objectives of this study, it was possible to calculate the number of deaths among hospitalized patients and verify that the presence of extended spectrum  $\beta$ -lactamases, may be an adjuvant factor in the death of the patient in question, but it is not conclusive that by itself the resistance mechanism is predominant when it comes to patient’s death.

---

## Índice

Lista de Figuras .....	x
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de siglas e abreviaturas.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1 As infeções e as bactérias Gram-negativo.....	2
1.2 O conceito e o sistema de classificação de $\beta$ -lactamases.....	4
1.3 Diversidade dos tipos de ESBL.....	6
1.3.1 TEM.....	6
1.3.2 SHV.....	7
1.3.3 CTX-M.....	7
1.3.4 OXA.....	8
1.3.5 PER.....	9
1.3.6 VEB e GES.....	9
1.3.7 $\beta$ -lactamases AmpC codificadas por plasmídeos.....	10
1.4 Carbapenemases.....	11
1.5 Evolução da resistência antibacteriana.....	13
Evolução da resistência antibacteriana em <i>Escherichia coli</i> .....	13
Evolução da resistência antibacteriana em <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	14
1.6 Implicações para a saúde pública.....	16
1.6.1 A resistência antimicrobiana e a saúde pública.....	16
1.6.2 O uso de antimicrobianos na produção animal.....	18
1.7 A mortalidade em Portugal, a resistência aos antimicrobianos e a higiene das mãos.....	19
2. Objetivos.....	23
3. Material e Métodos.....	25
3.1 Detecção e caracterização de $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs).....	25
3.1.1 Extração de DNA Bacteriano.....	25
3.1.2 Reações de PCR Multiplex.....	26
3.2 Detecção e caracterização de Carbapenemases.....	27
3.2.1 Teste Blue-CARBA.....	27
3.2.2. Reações de PCR CARBA Multiplex.....	28

---

4. Resultados.....	29
4.1 Isolados estudados.....	29
4.2 Prevalência de ESBLs CTX-M.....	29
4.3 ESBLs TEM e SHV.....	32
4.4. Carbapenemases .....	37
4.5. Perfil de Suscetibilidade aos antibióticos .....	42
4.6. A mortalidade e as ESBLs.....	44
5. Discussão .....	45
6. Conclusão.....	51
7. Perspetivas futuras .....	53
8. Bibliografia.....	55
Anexo(s).....	61

---

## Lista de Figuras

Figura 1- Ilustração do “discovery void”. As datas indicadas correspondem à descoberta inicial ou à patente de várias classes de drogas antibacterianas.....	3
Figura 2- Taxa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> multirresistente em Portugal, desde 2006 a 2011.....	16
Figura 3- Distribuição Mundial de diferentes metalo- $\beta$ -lactamases.....	17
Figura 4- Nº de médicos (gráfico da esquerda) e de enfermeiros (gráfico da direita) de controlo de infeção a tempo inteiro por cada 250 camas em hospitais, por país (n=866 hospitais).....	20
Figura 5- Distribuição das estirpes produtoras de CTX-M-1, caracterizadas no CHP.....	30
Figura 6- Distribuição dos produtos que serviram de amostra biológica para caracterizar os isolados produtores de CTX-M-1.....	31
Figura 7- Distribuição das idades dos doentes, nos quais se encontraram bactérias produtoras de CTX-M-1.....	32
Figura 8- Distribuição das estirpes produtoras de TEM, caracterizadas no CHP...33	33
Figura 9- Distribuição dos produtos que serviram de amostra biológica para caracterizar os isolados produtores de TEM.....	34
Figura 10- Distribuição das idades dos doentes, nos quais se encontraram bactérias produtoras de TEM.....	35
Figura 11- Distribuição das estirpes produtoras de SHV, caracterizadas no CHP.....	35
Figura 12- Distribuição dos produtos que serviram de amostra biológica para caracterizar os isolados produtores de SHV.....	36

---

Figura 13- Distribuição das idades dos doentes, nos quais se encontraram bactérias produtoras de SHV.....	37
Figura 14- Isolados caracterizados no CHP, produtores de carbapenemases.....	38
Figura 15- Distribuição dos produtos que serviram de amostra biológica para caracterizar os isolados produtores de carbapenemases.....	39
Figura 16- Distribuição das idades dos doentes, nos quais se encontraram bactérias produtoras de carbapenemases.....	40
Figura 17- Caracterização das carbapenemases e respetivos isolados produtores, identificados no CHP.....	41

---

## Lista de Tabelas

Tabela 1- $\beta$ -lactamases que ameaçam o papel dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos em bactérias Gram-negativo.....	5
Tabela 2- Percentagem de óbitos associados à infeção, dados referentes a Portugal Continental no período de 2007 a 2011.....	21
Tabela 3- Grupo específico de <i>primers</i> para as reações de PCR Multiplex.....	26
Tabela 4- Grupo específico de <i>primers</i> para as reações de PCR CARBA Multiplex.....	28
Tabela 5- Isolados estudados da família <i>Enterobacteriaceae</i> .....	29
Tabela 6- Distribuição dos isolados produtores de CTX-M-1 pelos diferentes Serviços do CHP.....	30
Tabela 7- Distribuição dos isolados produtores de TEM pelos diferentes Serviços do CHP.....	33
Tabela 8- Distribuição dos isolados produtores de SHV pelos diferentes Serviços do CHP.....	36
Tabela 9- Distribuição dos isolados produtores de carbapenemases pelos diferentes Serviços do CHP.....	39
Tabela 10- Isolados estudados da família <i>Pseudomonadaceae</i> .....	41
Tabela 11- Isolados produtores de Carbapenemases e ESBLs.....	42

---

## Lista de siglas e abreviaturas

ACSS: Administração Central do Sistema de Saúde

CHP: Centro Hospitalar do Porto

CIRA: Controlo de Infeções e de Resistência a Antimicrobianos

DGS: Direção Geral de Saúde

E.coli: *Escherichia coli*

ESBL:  $\beta$ -lactamase de espectro alargado

FAO: *Food and Agriculture Organization*

GDH: Grupos de Diagnóstico Homogéneo

KPC: Carbapenemase *Klebsiella pneumoniae*

OIE: *World Organisation for Animal Health*

OMS: Organização Mundial de saúde

PCR: *Polymerase chain reaction*

RAM: Resistência antimicrobiana

WHO: *World Health Organization*

## 1. Introdução

Um microrganismo pode ser a arma perfeita quando é altamente infecioso (necessário um inóculo pequeno para conseguir o efeito desejado ex.: varíola); altamente eficiente (necessário apenas uma quantidade muito pequena para provocar o efeito desejado (ex.: *Clostridium botulinum*); quando tem uma grande eficiência de dispersão (ex.: ar, água); a sua produção é rápida, barata e abundante, o seu armazenamento estável e quando é resistente aos tratamentos disponíveis (antibióticos, anticorpos, antivirais, etc.) (1).

Apesar do progresso na saúde pública e hospitalar, as infeções continuam a desenvolver-se em doentes hospitalizados, podendo atingir os profissionais de saúde e os funcionários do hospital (2).

Muitos são os fatores que promovem a infeção entre os doentes hospitalizados: a diminuição da imunidade entre os doentes; a crescente variedade de procedimentos médicos e técnicas invasivas, criando rumos potenciais de infeção; e a transmissão de bactérias resistentes a fármacos entre as populações hospitalares, podendo a sua transmissão ser facilitada quando as práticas de controlo de infeção são ineficazes (2).

As Infeções adquiridas nos cuidados de saúde estão entre as principais causas de mortalidade e do aumento da morbilidade entre os doentes hospitalizados. As mais frequentes são as infeções de feridas cirúrgicas, infeções urinárias e infeções do trato respiratório inferior (2). O estudo da OMS sobre a prevenção de infeções adquiridas no hospital, entre outros, também tem demonstrado que a maior prevalência das infeções hospitalares ocorre nas unidades de cuidados intensivos e em enfermarias de cirurgias agudas e ortopédicas (2). As taxas de infeção são maiores nos doentes com suscetibilidade acrescida devido à idade avançada, a uma doença subjacente ou a quimioterapia (2).

Antes da introdução de práticas de higiene básicas e antibióticos no ato médico, a maioria das infeções hospitalares eram devidas a agentes patogénicos de origem externa (doenças transmitidas por alimentos e no ar, gangrena gasosa, tétano, etc) ou causadas por microrganismos não presentes na flora normal dos doentes (por exemplo, difteria, tuberculose) (2). Estudos realizados em todo o

mundo documentam que as infeções associadas aos cuidados de saúde são a principal causa da morbidade e mortalidade (3-13).

O progresso na antibioterapia no tratamento de infeções bacterianas reduziu consideravelmente a mortalidade de várias doenças infecciosas. A maioria das infeções adquiridas no hospital, são hoje em dia, originadas por microrganismos que são comuns na população em geral (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase-negativa*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae*) (2).

### 1.1 As infeções e as bactérias Gram-negativo

Durante mais de sessenta anos, as drogas antibacterianas tinham sido consideradas a forma de cura das infeções, independentemente da sua utilização ser apropriada ou não, ou se a infeção fosse adquirida em comunidade ou em ambientes hospitalares. Alexander Fleming descobriu a penicilina, e no seu discurso do prémio Nobel em 1945, realçou o facto das bactérias se poderem tornar resistentes a essas drogas notáveis. E de facto, cada novo medicamento anti-bacteriano tem sido desenvolvido após se detetar resistência a um medicamento precedente (14).

As infeções causadas por bactérias Gram-positivo representavam a maioria das infeções graves nos finais dos anos de 1950 (15). Portanto, não é surpreendente que o aumento do uso de penicilinas para o tratamento de doenças associadas com origem num ambiente clínico, tenha motivado a resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, inicialmente em *Staphylococcus* e depois em bactérias Gram-negativo. Quando as penicilinas perderam a sua utilidade como monoterapia para muitos estados de doença, desenvolveram-se penicilinas e cefalosporinas mais potentes, com o objetivo de conservar as propriedades clínicas favoráveis dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (15).

Até 1970, muitas novas drogas antibacterianas foram desenvolvidas, às quais muitos agentes patogénicos comuns eram suscetíveis, mas a última classe de medicamentos antibacterianos foi descoberta na década de 1980 (Figura 1) (16). No início de 1980, a introdução das cefalosporinas da terceira geração na prática clínica, foi declarada como um dos principais avanços na luta contra  $\beta$ -lactamases, responsáveis pela resistência bacteriana aos antibióticos (17).

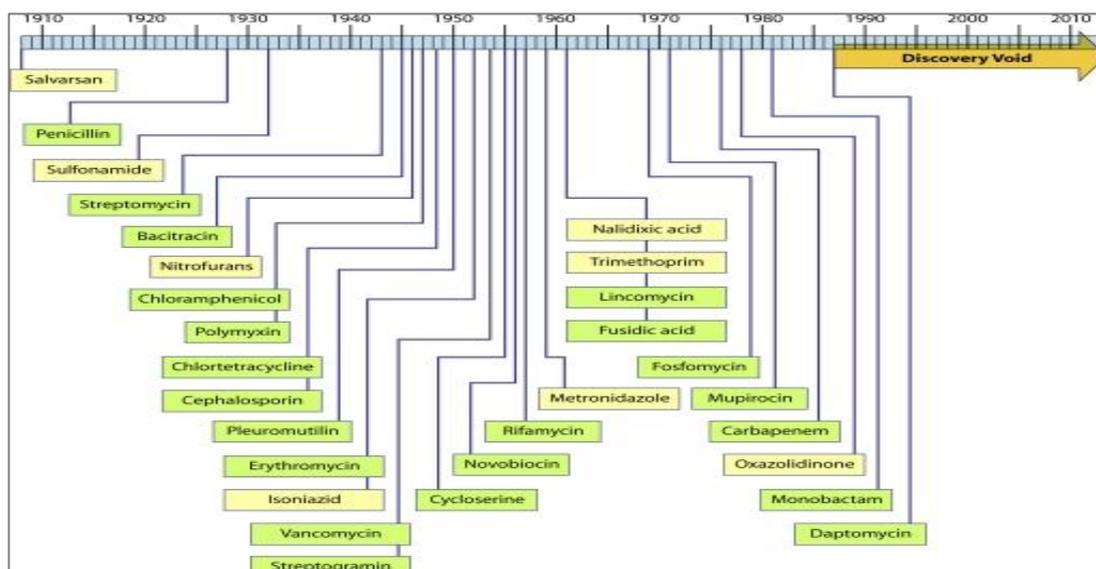


Figura 1: Ilustração do “discovery void”. As datas indicadas correspondem à descoberta inicial ou à patente de várias classes de drogas antibacterianas (adaptado de Silver, 2011)(18)

Estas cefalosporinas foram desenvolvidas em resposta ao aumento da prevalência de  $\beta$ -lactamases em certos organismos (por exemplo,  $\beta$ -lactamases do tipo SHV-1 e TEM-1, que hidrolisam a ampicilina, em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*) e a disseminação destas  $\beta$ -lactamases em novos hospedeiros (por exemplo, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*). No entanto, não foram só as cefalosporinas de terceira geração, que foram eficazes contra a maioria dos organismos produtores de  $\beta$ -lactamases, mas estas tinham a grande vantagem de apresentarem menos efeitos nefrotóxicos em comparação com os aminoglicosídeos e polimixinas (17).

Uma série de organismos Gram-negativo são responsáveis por infecções hospitalares, sendo o grupo mais identificado no geral, a família Enterobacteriaceae (19). Infelizmente, bactérias multirresistentes, tais como as da família Enterobacteriaceae produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBL) e carbapenemases estão a ser cada vez mais descritas em todo o Mundo (19). O primeiro relato de  $\beta$ -lactamases codificadas por plasmídeos, capazes de hidrolisar as cefalosporinas de espectro alargado foi publicado em 1983 (20).

As bactérias resistentes podem causar o aumento da morbidade e da mortalidade, particularmente entre os doentes com doenças significativas subjacentes ou que estejam imunocomprometidos (21).

As infecções hospitalares são um grande desafio para a segurança do doente. Quando são causadas por bactérias Gram-negativo, têm características que são

muito importantes, pois estes organismos são altamente eficientes na regulação ou aquisição de genes que codificam mecanismos de resistência ao antibiótico, especialmente em casos onde há evidência de uma pressão seletiva devido à utilização de um dado antibiótico. Além disso, as bactérias têm à sua disposição, uma infinidade de mecanismos de resistência, que podem ser vários contra o mesmo antibiótico ou por outro lado, um único mecanismo que afeta vários antibióticos (19).

Os mecanismos de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são vários: a produção de  $\beta$ -lactamases (o mecanismo mais comum e importante de resistência em bactérias Gram-negativo); a diminuição da expressão de porinas da membrana externa (OMPs); as bombas de efluxo, que permitem a diminuição do antibiótico no meio intracelular, e alterações no sítio ativo de ligação do antibiótico (PBP, *Penicillin Binding Protein*), que pode diminuir a afinidade para os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e, desta forma, aumentar a resistência (22).

A resistência a estes agentes antimicrobianos é um problema na comunidade, bem como em instalações de cuidados de saúde, mas nos hospitais, a transmissão de bactérias é uma situação amplificada devido à elevada suscetibilidade da população em causa. O uso contínuo dos agentes antimicrobianos aumenta a pressão seletiva favorecendo a emergência, multiplicação e a disseminação de estirpes resistentes. A utilização inapropriada de antibióticos, incluindo a sua prescrição excessiva, a administração de doses acima das ideais e a duração insuficiente do tratamento, são fatores que contribuem para a resistência antimicrobiana (21).

### 1.2 O conceito e o sistema de classificação de $\beta$ -lactamases

As  $\beta$ -lactamases são vulgarmente classificadas de acordo com dois sistemas gerais: o sistema de classificação molecular de Ambler e o sistema de classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (23-25). O sistema de Ambler divide as  $\beta$ -lactamases em quatro classes (A a D) (Tabela 1). A base deste esquema de classificação repousa sobre a homologia de proteínas (similaridade de aminoácidos) e não características fenotípicas. Nesta classificação as classes A,C e D de  $\beta$ -lactamases são  $\beta$ -lactamases de serina. Por outro lado, as enzimas da classe B são metalo-  $\beta$ -lactamases (17).

O sistema de classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros agrupa as  $\beta$ -lactamases de acordo com a similaridade funcional (substrato e perfil inibidor). Existem quatro grupos principais e múltiplos subgrupos neste sistema de classificação. Este sistema é de uma relevância muito mais imediata para o médico ou para o microbiologista num laboratório de diagnóstico porque considera inibidores de  $\beta$ -lactamases e substratos de  $\beta$ -lactamases que são clinicamente relevantes (17).

Tabela 1:  $\beta$ -lactamases que ameaçam o papel dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em bactérias Gram-negativo (adaptado de Bush, 2010)

<u><math>\beta</math>-lactamases</u>			<u><math>\beta</math>-lactâmicos aos quais é conferida resistência</u>	
Grupo Funcional <sup>a</sup>	Classe Molecular <sup>b</sup>	Nome comum	Primários <sup>c</sup>	Secundários <sup>d</sup>
1	C	Cefalosporinase	Penicilinas, cefalosporinas	Carbapenemos, monobactâmicos
2b	A	Penicilinase	Penicilinas, primeiras cefalosporinas	Combinações com inibidor de $\beta$ -lactamase
2be	A	$\beta$ -lactamase de espectro alargado	Penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, combinações com inibidor de $\beta$ -lactamase	Nenhum
2d	D	Cloxacilinase	Penicilinas, incluindo oxacilina e cloxacilina	Nenhum
2df	D	Carbapenemase	Carbapenemos e outros $\beta$ -lactâmicos	Nenhum
2f	A	Carbapenemase	Todos os $\beta$ -lactâmicos atuais	Nenhum
3	B	Metalo- $\beta$ -lactamase	Todos os $\beta$ -lactâmicos exceto os monobactâmicos	Nenhum

<sup>a</sup>classificação baseada em Bush, Jacoby, e Medeiros (23)e Bush e Jacoby(26). <sup>b</sup> Classificado de acordo com a sequência primária de aminoácidos(27-29). <sup>c</sup> $\beta$ -lactâmicos que são resistentes unicamente em função da produção de  $\beta$ -lactamases. <sup>d</sup> $\beta$ -lactâmicos que são resistentes em função da produção de  $\beta$ -lactamases, normalmente a níveis elevados, em combinação com modificações do efluxo ou de porina.

Não há consenso na definição precisa de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs). A definição comumente utilizada é que as ESBLs são  $\beta$ -lactamases capazes de conferir resistência bacteriana às penicilinas; à primeira, segunda, e terceira geração de cefalosporinas e aztreonam (mas não a cefamicinas ou carbapenemos) através da hidrólise destes antibióticos, e que são obstados pelos inibidores de  $\beta$ -lactamases, tais como o ácido clavulânico (23).

As ESBLs mais frequentemente encontradas pertencem às famílias CTX-M, SHV e TEM. Uma vez que os genes das ESBLs são transmissíveis, é importante que estas sejam testadas em outros organismos presentes no meio hospitalar, bem como em doentes hospitalizados durante um certo período de tempo onde as ESBLs são encontradas (30). A presença de ESBLs pode possibilitar a transmissão de plasmídeos entre diferentes espécies e principalmente a transmissão de estirpes produtoras de ESBL entre os doentes (31).

Assim, a sua deteção é necessária, e é um desafio na suposição de que é possível definir pontos de quebra ou interrupção (breakpoints), para cefalosporinas injetáveis e aztreonam, que discriminam com precisão os isolados produtores de ESBLs que podem ou não ser tratados com estas drogas (30).

### 1.3 Diversidade dos tipos de ESBLs

Em 1982, foi identificada a primeira ESBL durante um surto de infeções de *K. pneumoniae* na Alemanha (20). Desde então, mais de 200 variantes de ESBL têm sido identificadas, algumas das quais já se espalharam rapidamente pelo Mundo (14).

Além disso, muitas variantes de ESBLs inicialmente identificadas em *K. pneumoniae* têm sido subsequentemente transferidas para *E. coli*, sendo que as estirpes produtoras de ESBLs são resistentes a todas as drogas antibacterianas, beta-lactâmicas de espectro alargado, como as cefalosporinas, tornando os carbapenemos a principal opção de tratamento (14).

#### 1.3.1 TEM

As ESBLs do tipo TEM são derivadas de TEM-1 e TEM-2. TEM-1 – foi descrita pela primeira vez em 1965 numa *Escherichia coli* isolada a partir de um doente em Atenas na Grécia, chamado Termoneira (daí a designação TEM) (32).

TEM-1 é capaz de hidrolisar a ampicilina a uma taxa maior do que a carbenicilina, oxacilina, ou cefalotina, e tem atividade desprezível contra o largo espectro de cefalosporinas. TEM-2 tem o mesmo perfil hidrolítico que TEM-1, mas difere de TEM-1 por ter um promotor nativo mais ativo e pela diferença no ponto isoelétrico (33).

### 1.3.2 SHV

A sequenciação mostrou que SHV-2 diferia de SHV-1 pela substituição de glicina por serina na posição 238. Esta mutação serviu para a designação de SHV-2, tendo em conta as propriedades do espectro alargado desta  $\beta$ -lactamase (34).

Quinze anos após a descrição desta enzima, os organismos que continham SHV-2 foram encontrados em países dos diferentes continentes (34). As ESBLs do tipo SHV foram detetadas numa vasta gama de *Enterobacteriaceae* e surtos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., produtoras de SHV têm sido também descritas (35, 36).

### 1.3.3 CTX-M

As enzimas CTX-M refletem a potente atividade hidrolítica destas  $\beta$ -lactamases contra a cefotaxima. Normalmente os organismos produtores de  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M, apresentam CIMs elevados para cefotaxima ( $>64\mu\text{g/ml}$ ), e num intervalo aparentemente suscetível (2 a 8  $\mu\text{g/ml}$ ) para ceftazidima. Contudo, algumas ESBLs do tipo CTX-M podem hidrolisar a ceftazidima conferindo resistência às cefalosporinas de terceira geração (37-39).

É de notar também que o mesmo organismo pode conter ESBLs do tipo CTX-M e SHV ou ESBLs do tipo CTX-M e  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC, o que pode alterar o fenótipo de resistência ao antibiótico (40).

Durante os anos de 1990, as enzimas CTX-M tornaram-se o tipo mais comum de ESBLs na Argentina (41). Difundiram-se pela Europa e pela Ásia, contudo parecem ser menos comuns no norte da América (42).

A primeira ESBL CTX-M no Reino Unido, foi encontrada em 2000 num isolado de *K. oxytoca*, a partir de uma amostra de fezes de uma criança de seis anos de idade, na enfermaria de oncologia pediátrica no hospital Universitário St James em Leeds (43). Por outro lado, o primeiro surto foi causado por uma *Klebsiella pneumoniae*, produzindo uma nova enzima, a CTX-M-26, registado em Birmingham em 2001(44).

Estas descrições causaram uma preocupação relativamente às enzimas CTX-M, que se disseminaram então na América do Sul, onde se tentou sem sucesso em 2002, financiar um estudo de prevalência. Em meados de 2003,

esses planos não foram concretizados, devido ao facto de laboratórios terem começado a informar a Agência de Proteção à Saúde, de que estavam a encontrar numerosas *Escherichia coli* produtoras de ESBLs, as quais muitos dos laboratórios afirmavam tratarem-se de infeções do trato urinário em doentes. Investigações posteriores revelaram que muitas vezes estes doentes eram idosos, com problemas médicos subjacentes e tinham um histórico de hospitalização recente ou outro tipo de contato com ambientes de cuidados de saúde (45).

O controlo de bactérias resistentes a antibióticos é frequentemente conseguido pela melhoria das práticas do controlo de infeção nos hospitais e tem havido muitas descrições de Enterobacteriaceae produtoras de ESBLs que se propagam de doente para doente. Em 2003, E. Davies (The National Public Health Service for Wales (NPHS) Microbiologia, Cardiff) duvidava que uma política de controlo de infeção específica para ESBLs fosse justificada, favorecendo uma abordagem genérica para controlo das infeções cruzadas das bactérias Gram-negativo multirresistentes (45). Passou então a realçar a importância das enzimas CTX-M, devido à propagação de *E. coli* com enzimas CTX-M no hospital e na comunidade (45).

Foi descrita uma rápida e inquietante evolução da situação de *Escherichia coli* produtoras de  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M. A evidência sugere, assim, um novo elemento significativo de resistência a antibióticos que surge em *E. coli*, reduzindo a gama de opções de tratamento e exercendo um impacto clínico adverso (45).

### 1.3.4 OXA

As  $\beta$ -lactamases do tipo OXA são assim designadas porque hidrolisam oxacilina. São caracterizadas por taxas de hidrólise de cloxacilina e oxacilina muito superiores relativamente à benzilpenicilina (46).

As ESBLs do tipo OXA foram originalmente descobertas em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, a partir de um único hospital em Ancara, Turquia (17). Em França, uma nova  $\beta$ -lactamase derivada de OXA-10 (designada OXA-28) foi encontrada em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* (47). A sua evolução tem algumas semelhanças com a evolução de ESBLs do tipo SHV e TEM.

Infelizmente há poucos dados epidemiológicos, sobre a distribuição geográfica do tipo OXA (17).

### 1.3.5 PER

As ESBLs do tipo PER partilham apenas cerca de 25 a 27 % de homologia com as conhecidas ESBLs do tipo TEM e SHV (48). A  $\beta$ -lactamase PER-1 hidrolisa eficientemente penicilinas e cefalosporinas e é susceptível à inibição pelo ácido clavulânico (49). Foi pela primeira vez detetada em *Pseudomonas aeruginosa*, e apesar, dos organismos produtores de PER-1 terem sido predominantemente encontrados na Turquia, também ocorreram surtos de *Pseudomonas aeruginosa* em Itália, aparentemente sem qualquer relação de contacto com os casos da Turquia (50).

Até ao momento, a PER-2, que partilha 86% de homologia com a PER-1, apenas foi encontrada na América do Sul (51).

### 1.3.6 VEB e GES

Estes tipos de ESBLs não são simplesmente derivadas de outras  $\beta$ -lactamases já conhecidas através de mutações. Estas são notáveis pela sua diversidade geográfica. O gene que codifica VEB-1 verificou-se ser mediado por plasmídeo, estes plasmídeos também conferem resistência a antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos (17). O doente a partir do qual a  $\beta$ -lactamase foi originalmente descrita, era um bebé vietnamita hospitalizado em França.(52) Uma  $\beta$ -lactamase idêntica também foi encontrada em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, e *Pseudomonas aeruginosa*, na Tailândia (53-55). Outras enzimas VEB também foram detetadas no Kuwait e na China (56, 57).

As enzimas GES são outros exemplos de ESBLs que foram encontradas numa grande variedade de localizações geográficas (17). GES-1 foi encontrada na Europa em *K. pneumoniae* (58) e em *Pseudomonas aeruginosa* (59) e apesar se serem raras, as enzimas GES foram identificadas em todo o mundo, havendo relatos na Grécia, França, Portugal, África do Sul, Guiana Francesa, Brasil, Argentina, Coreia e no Japão (58, 60-65).

Entre Fevereiro de 1999 e 2001, trinta isolados clínicos de *K. pneumoniae* foram recolhidos a partir de diferentes doentes, distribuídos pelas várias enfermarias (assistência médica, serviço de cirurgia e em diferentes unidades de cuidados intensivos) no Hospital de Santa Maria, em Lisboa. Onde se verificou

uma epidemia de *K. pneumoniae* produtora da  $\beta$ -lactamase GES-1 nas diferentes enfermarias do hospital (60).

### 1.3.7 $\beta$ -lactamases AmpC codificadas por plasmídeos

Os genes ampC codificados por plasmídeos são conhecidos desde 1989. Foram encontrados em todo o mundo em isolados provenientes de ambientes de cuidados de saúde, bem como em locais sem qualquer relação com os cuidados de saúde, tendo sido mais facilmente detetados em Enterobacteriaceas em que não se esperava que produzissem uma  $\beta$ -lactamase AmpC (66).

Muitos bacilos Gram-negativos produzem uma AmpC codificada cromossomicamente que, quando é produzida em grande quantidade, pode causar resistência a penicilinas, aztreonam, cefamicinas e a cefalosporinas de espectro estreito e alargado (30).

As  $\beta$ -lactamases AmpC hidrolisam preferencialmente cefalosporinas de espectro estreito e alargado, e cefamicinas e resistem à inibição pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (30). Estas enzimas têm sido detetadas em alguns isolados de *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. *C. freundii*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis*, e *E. coli* e estão tipicamente associadas à resistência a múltiplas drogas. AS  $\beta$ -lactamases AmpC codificadas por plasmídeo mais frequentemente encontradas pertencem às famílias de CMY, FOX e de DHA (66).

A deteção fenotípica de AmpC em *E. coli* não indica se a enzima é cromossómica ou codificada por um plasmídeo, mas sabe-se que a falta de resistência a múltiplas drogas é sugestiva de uma AmpC cromossómica, enquanto a resistência a múltiplas drogas é consistente quer com a produção da enzima AmpC cromossómica, quer com AmpC mediada por plasmídeos. Assim, um teste molecular é necessário para o laboratório determinar se um isolado *E. coli* transporta uma AmpC mediada por um plasmídeo (30).

Embora as  $\beta$ -lactamases AmpC codificadas por plasmídeos sejam menos comuns do que as ESBLs, também foram encontradas em diversas áreas do mundo, sendo que entre elas, a  $\beta$ -lactamase CMY-2 é a que tem a mais ampla disseminação geográfica (66).

## 1.4 Carbapenemases

As carbapenemases são enzimas que variam na capacidade de hidrolisar carbapenemos e outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (30).

As carbapenemases representam a família mais versátil de  $\beta$ -lactamases, com uma largura de espectro inigualável a outras enzimas hidrolisantes de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Apesar de serem conhecidas como “carbapenemases”, muitas destas enzimas reconhecem quase todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos hidrolizáveis e são mais resistentes contra a inibição por todos os inibidores de  $\beta$ -lactamase viáveis comercialmente (67-69).

As carbapenemases pertencem a duas grandes famílias moleculares, distinguidas pelo mecanismo hidrolítico, devido à presença de zinco ou serina no centro ativo. A primeira carbapenemase descrita pertencia a um bacilo Gram-positivo. Ao contrário de outras  $\beta$ -lactamases conhecidas na altura, essas enzimas eram inibidas pelo EDTA, determinando-as assim como metaloenzimas. Trabalhos posteriores demonstraram que todas as metalocarbapenemases contêm pelo menos um átomo de zinco no centro ativo, o que facilita a hidrólise do anel bicíclico  $\beta$ -lactâmico. (70) Em meados e finais dos anos de 1980, outro conjunto de enzimas hidrolisantes de carbapenemos surgiu na família das Enterobactereaceas (71), mas o EDTA não inibia a sua atividade (72).

Estudos posteriores demonstraram que estas enzimas utilizavam a serina no seu centro ativo e eram inativadas pelos inibidores de  $\beta$ -lactamase, o ácido clavulânico e o tazobactam (72, 73).

Até ao início de 1990, todas as carbapenemases eram descritas como espécies específicas de  $\beta$ -lactamases codificadas cromossomicamente, cada uma com um conjunto de características bem definido. Contudo, a identificação de IMP-1 codificado por plasmídeo, uma metalo- $\beta$ -lactamase em *Pseudomonas aeruginosa* (74), ARI-1 (OXA-23), uma carbapenemase da classe D em *Acinetobacter baumannii* (75, 76) e KPC-1, uma carbapenemase da classe A em *Klebsiella pneumoniae* (77) alterou os padrões de disseminação de carbapenemases. O que antes era considerado ser um problema de disseminação clonal, tornou-se um problema global de dispersão entre espécies (71).

A sua deteção é uma questão de controlo de infeção crucial, porque as carbapenemases são frequentemente associados a uma extensa, por vezes total, resistência aos antibióticos e aos organismos mais resistentes, tais como estirpes

de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* spp. que adquiriram uma carbapenemase, podendo ser vetores responsáveis pela transmissão de carbapenemases a membros da família *Enterobacteriaceae*, na qual o mecanismo de resistência não é cromossômico. A principal preocupação incide sobre as carbapenemases transmissíveis e não com as cromossômicas. As enzimas transmissíveis podem ser adquiridas imprevisivelmente por agentes patogênicos importantes tais como *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e membros da família *Enterobacteriaceae*, enquanto as enzimas cromossômicas ocorrem de forma previsível em agentes patogênicos menos comuns, tais como *S. maltophilia*, *Aeromonas* spp., *Chryseobacterium* spp., entre outros (30).

As carbapenemases pertencem às classes moleculares A, B e D. As enzimas da classe A (grupo 2f Bush) são inibidas a vários graus pelo ácido clavulânico e geralmente hidrolisam penicilinas ou cefalosporinas de forma mais eficiente do que carbapenemos (46).

As carbapenemases da classe A incluem a KPC, IMI, e famílias de SME, NMC-A, e algumas enzimas GES. As enzimas da classe B (grupo 3 na classificação de Bush) são Metallo- $\beta$ - lactamases (MBLs) que tipicamente hidrolisam eficientemente carbapenemos, e por outro lado, não hidrolisam aztreonam e resistem a inibidores de  $\beta$ - lactamases atualmente disponíveis, mas são inibidas por agentes quelantes, como por exemplo o EDTA. As mais importantes abrangem as VIM e famílias de IMP e SPM-1, que têm sido detetadas em estirpes de *P. aeruginosa*, membros da família de *Enterobacteriaceae* e *A. Baumannii* (30).

A maioria das carbapenemases da classe D têm a sua atividade de hidrólise de carbapenemos fraca e são pouco inibidas pelo ácido clavulânico. Estas pertencem à família OXA e são muito frequentemente produzidas por *Acinetobacter* spp. Mas também têm sido descritas em algumas *P. aeruginosa*, *K.pneumoniae* e estirpes de *E.coli* (30).

Há muitas falhas na compreensão das carbapenemases, porque as questões referentes a estas, apenas recentemente, têm atraído uma atenção generalizada. Os testes de detecção de carbapenemases ainda estão a evoluir, dificultados pela heterogeneidade das enzimas e dos seus hospedeiros, que conferem diferentes níveis de suscetibilidade aos carbapenemos (30).

A excelência microbiológica é necessária mais do que nunca e é crucial que as ESBLs,  $\beta$ - lactamases AmpC e carbapenemases sejam detetadas com rapidez e rigor, pois se os laboratórios de microbiologia forem incapazes de proporcionar esse padrão de excelência, muitos doentes irão sofrer, irá haver disseminação de

agentes patogênicos resistentes e a “catástrofe” do descontrole da resistência aos antibióticos é inevitável (30).

### 1.5 Evolução da resistência antibacteriana

A primeira  $\beta$ -lactamase foi identificada num isolado *Escherichia coli* em 1940 (78) e a primeira  $\beta$ -lactamase codificada por plasmídeo em bactérias Gram-negativo, TEM-1, foi descrita em 1965 (32). Precisamente na mesma altura, outra  $\beta$ -lactamase codificada por plasmídeo, conhecida por SHV-1 (sulfhydryl variable), foi encontrada em *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* (79).

A história do desenvolvimento da classe dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, nos anos seguintes foi influenciada pela presença destas enzimas nestes isolados, e pelo esforço de se contrariar os seus efeitos negativos (78).

#### Evolução da resistência antibacteriana em *Escherichia coli*

A *E. coli* faz parte da flora normal dos intestinos nos humanos e nos animais. Contudo é a causa mais frequente de infeções do trato urinário adquiridas em comunidade e nos hospitais, incluindo infeções nos rins e infeções na corrente sanguínea. Está associada a infeções intra-abdominais como a peritonite e infeções dos tecidos moles e da pele, devido a vários microrganismos. É a causa da meningite em neonatais e uma das principais causas de infeções transmitidas por alimentos a nível mundial (14).

A resistência da *E. coli* desenvolve-se através de mutações, o que muitas vezes é o caso da resistência a fluoroquinolonas ou pela aquisição de elementos genéticos móveis, que tem sido o caso das penicilinas de espectro alargado (ex. ampicilina ou amoxicilina) e da resistência à terceira geração de cefalosporinas. A resistência à terceira geração de cefalosporinas é principalmente devido às enzimas  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs) (14).

As ESBLs são transmitidas entre bactérias e mesmo entre espécies bacterianas. Como as estirpes de *E. coli* que contêm ESBLs são geralmente também resistentes a várias outras drogas antibacterianas, os carbapenemos são normalmente o único tratamento disponível para várias infeções. Uma ameaça emergente e recente da resistência em *E. coli* reside nos carbapenemos, cujo

mecanismo é mediado por metalo- $\beta$ -lactamases, que conferem resistência a praticamente todas as drogas antibacterianas  $\beta$ -lactâmicas disponíveis (14).

Em Portugal, a resistência às quinolonas, aumentou entre 2001 e 2008, de 18% para 29%, sendo a resistência no ano de 2011, de 27%. Na Europa, as taxas de resistência às cefalosporinas de terceira geração de *Escherichia coli* são menores que as de *Klebsiella pneumoniae*, no entanto, também são crescentes (80).

### Evolução da resistência antibacteriana em *Klebsiella pneumoniae*

Tal como em *E. coli*, as bactérias *K. pneumoniae* são colonizadoras frequentes do intestino do ser humano assim como de outros seres vertebrados. As infeções com *K. pneumoniae* são particularmente comuns em hospitais nos indivíduos mais vulneráveis, tais como bebés prematuros e doentes com o sistema imunitário comprometido, diabetes ou perturbações relacionadas com o álcool e nos doentes que estão sob cuidados médicos avançados (14).

As infeções mais comuns são do tracto urinário e respiratório, e nos recém-nascidos, são as infeções da corrente sanguínea. A bactéria *K. pneumoniae* é frequentemente a responsável por infeções na corrente sanguínea. A taxa de mortalidade de *K. pneumoniae* através de pneumonias adquiridas no hospital, depende da gravidade da condição subjacente e pode ser superior a cinquenta por cento em doentes vulneráveis, mesmo quando estão sob tratamento antibacteriano adequado (14).

Tal como outras bactérias em ambientes de cuidados de saúde, a *K. pneumoniae* pode propagar-se rapidamente entre os doentes, isto ocorre frequentemente em unidades de cuidados de saúde e em cuidados neonatais. A disseminação de *K. pneumoniae* entre diferentes hospitais e até mesmo para além das fronteiras do país através da transferência de doentes infetados ou colonizados também tem sido documentada (14).

As carbapenemases *Klebsiella pneumoniae* (KPCs) foram originalmente identificadas nos Estados Unidos da América em 1996, desde então, estas versáteis  $\beta$ -lactamases têm-se disseminado internacionalmente entre bactérias Gram-negativas, especialmente *K. pneumoniae*, apesar da sua epidemiologia precisa ser diversa entre países e regiões. A mortalidade descrita entre os

doentes infetados com organismos positivos de KPC é elevada, possivelmente uma consequência das limitadas opções remanescentes de antibiótico (81).

Em alguns países existe mesmo endemicidade, como por exemplo em Israel, na Grécia e na Colômbia, enquanto noutros, continuam a haver casos pontuais, como na Austrália, Nova Zelândia e no Canadá. Alguns países são mais afetados por outras carbapenemases, como por exemplo, Espanha (VIM), Índia (NDM), França (OXA-48) e a maior parte do Médio Oriente (exceto Israel) juntamente com o Norte de África (OXA-48) (81).

À semelhança de *E. coli*, *K. pneumoniae* adquire resistência a múltiplas drogas antibacterianas principalmente através da transferência horizontal de elementos genéticos móveis, tais como transposões ou plasmídeos. No entanto, ao contrário da *E. coli*, *K. pneumoniae* transporta um gene de resistência (betalactamase localizada cromossomicamente) que torna as penicilinas com um largo espectro ineficazes, tais como a ampicilina e amoxicilina (14).

A resistência a outras drogas antibacterianas orais muito utilizadas e disponíveis, tais como, cotrimoxazol e fluoroquinolonas (ex. ciprofloxacina) surgiu e disseminou-se globalmente, por isso existem poucas opções, para o tratamento oral de infeções causadas por *Klebsiella* spp. Muitas variantes de ESBL, inicialmente identificadas em *K. pneumoniae* foram transferidas para *E. coli*, sendo que as produtoras de ESBL são resistentes a todas as drogas antibacterianas, beta-lactâmicas de espectro alargado, tornando os carbapenemos a principal opção de tratamento (14).

A *K. pneumoniae* é também a responsável por infeções causadas por bactérias resistentes a carbapenemos em todo o mundo, pois todos os genes mais importantes que podem conferir resistência ao carbapenemo (via carbapenemases) estão presentes em *K. pneumoniae*, tornando quase todas as opções de tratamento ineficazes. Clinicamente não existem tratamentos eficazes, para muitos doentes infetados por esta bactéria (14).

Em Portugal, *Klebsiella pneumoniae* apresenta uma crescente resistência às cefalosporinas de terceira geração, verificando-se um aumento de 28% para 36,2% entre os anos de 2009 e 2011. A taxa de *K. pneumoniae* multirresistente (não suscetível a pelo menos um de três agentes ou mais classes de antibióticos habitualmente usados no seu tratamento), verifica-se também crescente, sendo 6,5% no ano de 2007 e no ano de 2011, 20,7 % (Figura 2) (80).

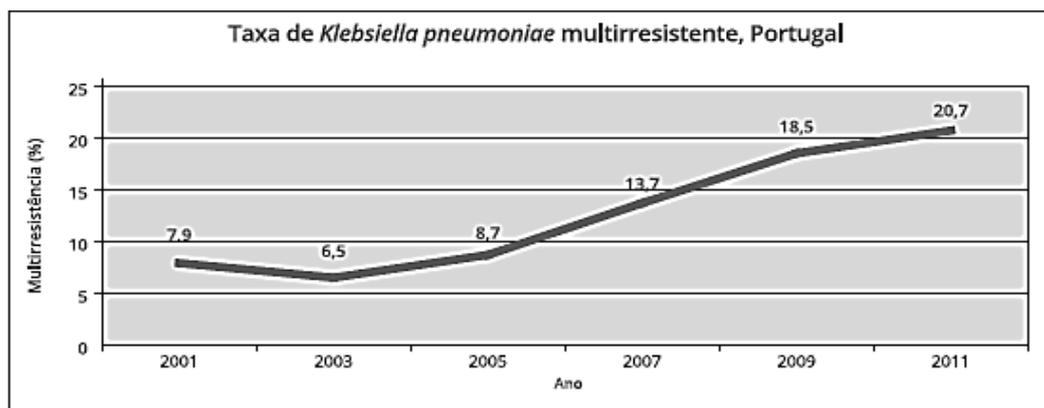


Figura 2: Taxa de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente em Portugal, desde 2006 a 2011 (adaptado de DGS, Controlo de infeção e resistência aos antimicrobianos em números-2013; fonte: ECDC, Antimicrobial resistance surveillance, 2011)

## 1.6 Implicações para a saúde pública

### 1.6.1 A resistência antimicrobiana e a saúde pública

A resistência antimicrobiana (RAM) não é um fenómeno recente, é um problema de saúde crítico nos dias de hoje. Durante várias décadas, em diversos níveis, as infeções comuns causadas por bactérias têm desenvolvido resistência a cada novo antibiótico e a resistência antimicrobiana tem evoluído, tornando-se uma ameaça à saúde Mundial. Com a escassez de novos antibióticos a chegar ao mercado, a necessidade de agir para evitar o desenvolvimento de uma crise global na área da saúde é cada vez mais urgente (82).

As infeções originadas por bactérias cada vez mais resistentes aos antibióticos, são um fator decisivo para um grande número de doenças, muitas vezes afetando de forma desproporcional os países em desenvolvimento. A organização Mundial de Saúde reconheceu há muito tempo a RAM como uma crescente ameaça à saúde global. Muitos doentes em todo o mundo sofrem os efeitos da resistência antimicrobiana, pois as infeções já não são suscetíveis aos medicamentos comuns utilizados no seu tratamento. Muitos dos avanços médicos dos últimos anos, tais como a quimioterapia para o tratamento do cancro e o transplante de órgãos, dependem da disponibilidade de medicamentos anti-infecciosos (82).

As consequências previsíveis da resistência antimicrobiana são o aumento da morbidade, o prolongamento das doenças, um maior risco de complicações e o aumento da mortalidade. Estimativas da Europa sobre os encargos económicos e da saúde resultantes de infeções resistentes indicam que o aumento da mortalidade causada por infeções bacterianas hospitalares resistentes ultrapassa as 25 000 mortes por ano (82).

Outra consequência da RAM em centros de saúde e na comunidade, associada a infeções, é a necessidade de mudar práticas de prescrição de medicamentos mais recentes e mais caros, alguns dos quais também estão associados a elevadas taxas de reações adversas (82).

Perante uma manifestação de resistência, as bactérias resistentes disseminam-se nos hospitais e na comunidade. Várias bactérias que podem inativar carbapenemos e que são resistentes à terceira geração de cefalosporinas, já são responsáveis por um número significativo de infeções associadas a cuidados de saúde e ao aparecimento de infeções na comunidade em todo o mundo (Figura 3) (83).



Figura 3: Distribuição Mundial de diferentes metalo-β-lactamases (adaptado de Cornaglia et al., 2011)(83)

### 1.6.2 O uso de antimicrobianos na produção animal

Uma parte substancial da utilização total de antibióticos surge fora do campo da medicina humana, e poderá ser a principal causa responsável pelo problema global da emergência da RAM. Os antimicrobianos utilizados na pecuária e na agricultura, muitas vezes envolvem em larga escala a sua utilização para a promover o crescimento e a profilaxia em massa (82).

Agentes patogênicos resistentes encontrados em produtos alimentares, podem causar infecções no ser humano, que podem ser difíceis de tratar. Infelizmente, as regulamentações para controlar a utilização de antibióticos na produção animal não são consistentes em todo o mundo. Os antibióticos são usados em maior quantidade nos animais do que no tratamento de doenças em seres humanos. Na produção animal, os antibióticos são usados extensivamente para prevenir doenças e promover o crescimento em muitos animais ao mesmo tempo, esta é a maior diferença entre o uso de antibióticos nos animais e no ser humano (82).

Tem sido frequentemente demonstrado que a utilização de agentes microbianos em animais para consumo favorece o desenvolvimento da resistência entre bactérias que depois pode ser transmitida para as pessoas e pode causar infecções e doenças (82).

A disseminação internacional de agentes patogênicos resistentes remete-nos para iniciativas globais urgentes para minimizar o risco de desenvolvimento e propagação da resistência bacteriana aos antimicrobianos nos animais destinados para consumo, assim como, no seio das comunidades e nos hospitais.(82)

Grupos de trabalho da WHO, FAO e da OIE têm revisado estas questões extensivamente e proposto opções para a ação a fim de serem executadas pelas autoridades nacionais e internacionais (84-87). No entanto desafios e lacunas importantes permanecem. São necessárias mais informações sobre a prevalência da RAM em bactérias de origem animal e o seu impacto na saúde humana, tais como, o conhecimento da quantidade de antibióticos usados para diferentes indicações e sobre as classes de antibióticos utilizados (82).

As legislações para a aprovação de medicamentos veterinários, e para controlar a sua utilização, precisam de ser reforçadas em muitos países. A capacidade de implementar intervenções é variada e o potencial impacto das intervenções específicas em diferentes contextos, é amplamente desconhecido (82).

Reconhecendo esta crise de saúde pública devido à RAM, vários países, agências internacionais e outras organizações em todo o mundo, tomaram medidas para combatê-la através de estratégias aplicadas em setores relevantes. Várias resoluções da Assembleia Mundial de Saúde têm alertado, para ações específicas relacionadas com a RAM (82). A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a sua estratégia global para conter a RAM em 2001(88).

Em 2011 no Dia Mundial da Saúde, convidou os países a aderirem a um pacote de políticas contendo seis pontos:

(1) Comprometer-se com um plano nacional financiado abrangente que seja responsável e envolva a sociedade civil, (2) reforçar a vigilância e a capacidade laboratorial, (3) assegurar o acesso ininterrupto aos medicamentos essenciais de qualidade garantida, (4) regular e promover a utilização racional de medicamentos na criação de animais e para garantir o cuidado adequado do doente, (5) melhorar a prevenção e o controlo de infeções, (6) fomentar a inovação, pesquisa e o desenvolvimento de novas ferramentas (89).

### 1.7 A mortalidade em Portugal, a resistência aos antimicrobianos e a higiene das mãos

Segundo o inquérito de prevalência de infeção hospitalar e de uso de antimicrobianos do ECDC 2011-2012, o consumo hospitalar de antimicrobianos em Portugal é indicado como sendo superior à média Europeia (80).

Sendo Portugal um país que apresenta uma elevada e crescente taxa de resistência bacteriana aos antimicrobianos, tal como é referido nos dados de vigilância epidemiológica da European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS)-Net, a taxa de infeção hospitalar em Portugal é superior à média europeia, prevendo-se o seu aumento, tendo por base os consecutivos inquéritos de prevalência de infeção hospitalar realizados em Portugal a partir de 1988 (90).

O mesmo inquérito, de prevalência de infeção hospitalar e de uso de antimicrobianos do ECDC 2011-2012, também indica que os profissionais designados para as tarefas de controlo de infeção e de assistência à prescrição antibiótica são insuficientes e em número inferior à média europeia (Figura 4) (80).

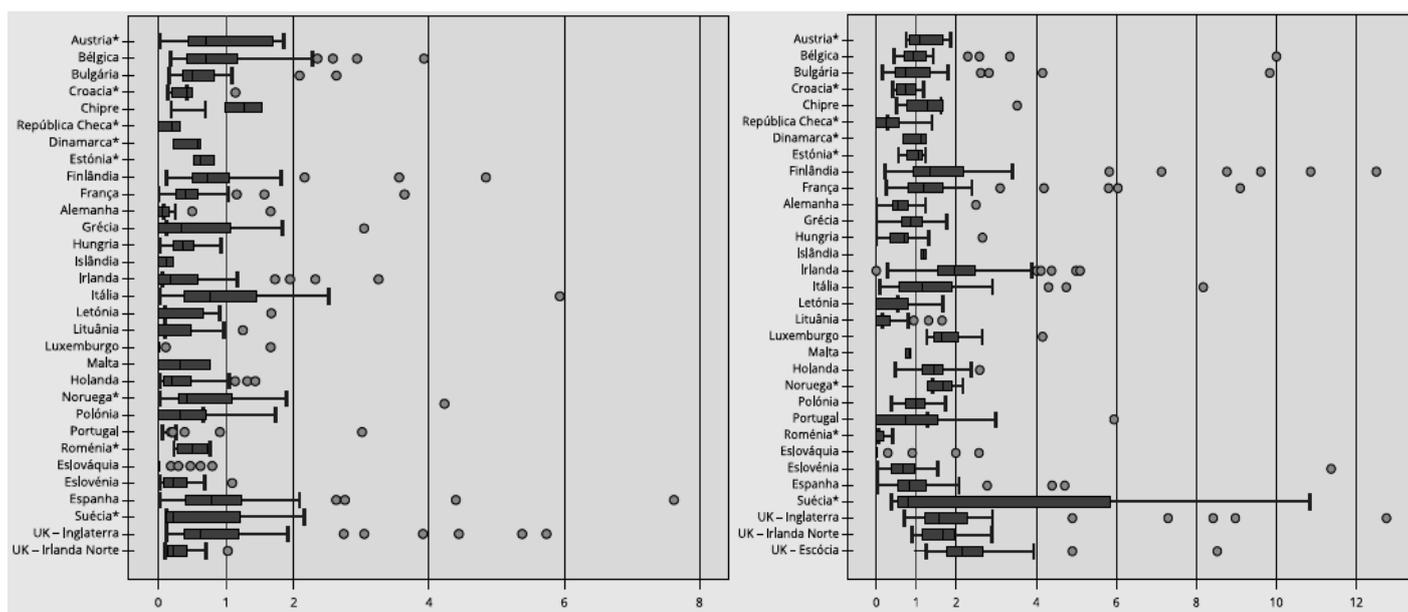


Figura 4: Nº de médicos (gráfico da esquerda) e de enfermeiros (gráfico da direita) de controlo de infeção a tempo inteiro por cada 250 camas em hospitais, por país (n=866 hospitais) (adaptado de DGS, Controlo de infeção e resistência aos antimicrobianos em números-2013; fonte: ECDC SURVEILLANCE REPORT- Point prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2011-2012)

Por outro lado, a Campanha Nacional de Higiene das Mãos (CNHM), “Medidas simples salvam vidas”, inserida na estratégia multimodal proposta pela *World Alliance for patient safety*, da Organização Mundial de Saúde (OMS), à qual Portugal aderiu oficialmente a 8 de Outubro de 2008, tinha por objetivo promover a prática da higiene das mãos de forma normalizada, sendo este fator, um contribuinte essencial para a diminuição das infeções associadas aos cuidados de saúde e para o controlo das resistências dos microrganismos aos antimicrobianos, ao incentivar a adesão dos profissionais de saúde à higiene das mãos (90).

Nesta campanha foi possível verificar, uma adesão crescente à correta prática de higiene das mãos, mas ainda insuficiente (campanhas 2008-2010; 2010-2011 e 2011-2012)(90, 91), no entanto é de notar que, entre os diferentes grupos profissionais, os médicos são os profissionais em que a taxa de adesão à correta prática de higiene das mãos é menor (80).

Tendo por base o relatório da DGS, “*Controlo da infeção e resistência aos antimicrobianos em números-2013*”, apesar de ser impossível separar o número

de óbitos, que ocorrem apenas devido à infeção em causa, daqueles que ocorrem devido à sua doença prévia e que depois evoluem para uma infeção, sem ser possível definir com certeza qual a verdadeira causa de morte, é ainda assim possível, com base nos dados da mortalidade hospitalar, obtidos através dos Grupos de Diagnóstico Homogéneos (GDH), verificar a relevância da mortalidade associada às infeções hospitalares (Tabela 2), dado que, num pequeno número de casos, a morte pode ser a consequência da infeção, ou por outro lado, poderá não ser a causa, mas apenas um fator coadjuvante para a morte (90).

Também no Relatório Global de Vigilância, lançado pela Organização Mundial de Saúde, neste presente ano, (contemplando estudos de vários países) no qual tiveram em conta alguns estudos de infeções de *E. coli* resistente às cefalosporinas da terceira geração, incluindo produtoras de ESBLs, foi possível verificar através de uma meta-análise, um significativo aumento (mais do dobro) da mortalidade, atribuída a essa bactéria. Assim como no caso das infeções originadas por *Klebsiella pneumoniae*, resistentes à terceira geração de cefalosporinas, em que também se verificou um significativo aumento da mortalidade dos doentes com infeções causadas por esta bactéria e resistentes às cefalosporinas (14).

Tabela 2: Percentagem de óbitos associados à infeção, dados referentes a Portugal Continental no período de 2007 a 2011 (adaptado de DGS, Controlo de infeção e resistência aos antimicrobianos em números-2013; Fonte: GDH- ACSS/DGS)

Portugal Continental			
	Óbitos associados ao CIRA*	Óbitos Total**	% Óbitos associados ao CIRA
2007	8633	42080	20,52
2008	9801	45161	21,70
2009	10376	45845	22,63
2010	11010	47067	23,39
2011	11357	46733	24,30

CIRA- Controlo de Infeções e de Resistência a Antimicrobianos

\*dados referentes aos diagnósticos principais (excluindo códigos v090-V099)

\*\*dados referentes a todas as doenças



## 2.Objetivos

Considera-se necessário e relevante implementar metodologias que respondam rapidamente e permitam alertar para a existência de determinantes génicas associadas a um elevado nível de resistência antimicrobiana. Se isto for viável em tempo clinicamente útil, torna-se útil e importante na escolha da antibioterapia sendo assim, possível tomar medidas de contenção para evitar a disseminação das bactérias para outros doentes, evitando um maior número de infeções e a morte de doentes hospitalizados.

Posto isto, e perante o impacto negativo que a crescente ameaça da resistência antimicrobiana sugere na saúde pública, o presente trabalho incide sobre os seguintes objetivos:

- A partir de culturas de isolados bacterianos, verificar as bactérias que “habitam” no hospital, dando especial atenção às Enterobactereaceas, visto serem uma família muito comum de organismos Gram-negativo, responsáveis por infeções adquiridas nos hospitais.
- No caso de suspeita de produção de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado e/ou carbapenemases (quando o resultado fenotípico de deteção é duvidoso ou inconclusivo), proceder à confirmação destes mecanismos de resistência por métodos moleculares a partir de metodologias que respondem rapidamente e permitem alertar para a existência de determinantes génicas associadas a um elevado nível de resistência.
- Apesar de não ser fácil distinguir se a morte de um determinado doente ocorreu devido a uma dada infeção adquirida no hospital ou devido à sua patologia prévia, apurar o número de mortes ocorridas entre os doentes hospitalizados e verificar se a presença de ESBLs poderá ter algum peso nesse número de mortes.



### 3. Material e Métodos

Os isolados bacterianos estudados foram recolhidos a partir de amostras de produtos biológicos de doentes do Centro Hospitalar do Porto (CHP), com origem em vários serviços, de Internamento, Consulta Externa ou Serviço de Urgência, colhidas entre Outubro de 2011 e Julho de 2014.

Após identificação fenotípica no Serviço de Microbiologia do CHP, os isolados suspeitos de produção de ESBL ou carbapenemases foram enviados à Unidade de Biologia Molecular para caracterização molecular. Por conseguinte precedeu-se à sua deteção molecular e caracterização de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado e carbapenemases.

Por outro lado, porque também são comuns no Centro Hospitalar do Porto e têm uma grande responsabilidade pelo aparecimento de ESBLs em *Enterobacteriaceae*, o estudo alargou-se também à família *Pseudomonadaceae*, sendo recolhidos 23 isolados de *Pseudomonas* spp.

#### 3.1 Deteção e caracterização de $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs)

A partir das placas de culturas bacterianas procedeu-se à deteção de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado, para isso numa primeira fase, extraiu-se o DNA bacteriano das amostras biológicas, através de um método manual simples.

De seguida, realizaram-se as reações de PCR (Polymerase Chain Reaction), que permitiram amplificar o DNA das amostras e por conseguinte analisar os fragmentos de DNA amplificados, através de uma eletroforese em gel de agarose.

##### 3.1.1 Extração de DNA Bacteriano

A extração de DNA consistiu num protocolo de cinco etapas. Em cada tubo de PCR foi adicionado 20  $\mu$ l de NaOH (0,05M + SDS 0,025%) e 3-4 colónias de bactérias. De seguida, procedeu-se à sua desnaturação durante 15 minutos a 95°C num termociclador. Adicionou-se 180  $\mu$ l do tampão TE 1x, centrifugou-se na

microcentrifuga durante 1 minuto a 3,0 rpm/g x 1000 e por fim, recolheu-se o sobrenadante.

### 3.1.2 Reações de PCR Multiplex

Procedeu-se à realização de múltiplos PCR Multiplex. 2 µl do DNA extraído de cada amostra biológica foi sujeito a um PCR Multiplex em 18 µl da mistura de reação contendo, 1x tampão PCR (100 mM Tris- Hcl, pH 8.3, 500mM kcl); uma concentração de 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM de deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs); a concentração de cada grupo específico de primers (tabela 3) e 0,05 U da enzima JumpStart Taq DNA Polymerase (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France).

A amplificação foi realizada da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C durante 2 minutos; 30 ciclos a 94°C durante 40 segundos, 60°C durante 40 segundos e 72°C durante 60 segundos; e uma etapa final de extensão final a 72°C durante 7 minutos. A análise dos fragmentos amplificados foi feita após uma corrida a 90 Volts em gel de agarose a 2%, em TBE 1x, corado com brometo de etídio.

Tabela 3: Grupo específico de primers para as reações de PCR Multiplex (92).

Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento amplificado	Concentração do Primer (µM)
MultiTEM FW	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	800 bp	0.2
MultiTEM RV	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
MultiSHV FW	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713 bp	0.2
MultiSHV RV	ATCCCGCAGATAAATCACCCAC		
MultiCTXM-1 FW	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	688 bp	0.2
MultiCTXM-1_2 RV	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
MultiCTXM-2 FW	CGTTAACGGCACGATGAC	404 bp	0.2
MultiCTXM-1_2 RV	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
MultiCTXM-9 FW	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561 bp	0.2
MultiCTXM-9 RV	TGATTCTCGCCGCTGAAG		

Y=T ou C ; R=A ou G; S= G ou C; D=A ou G ou T

(primers: Dallenne et al, 2010)

## 3.2 Detecção e caracterização de Carbapenemases

Na deteção de carbapenemases aplicou-se um teste bioquímico, o Blue-CARBA, para detetar diversos produtores de carbapenemases,(93) diretamente a partir de culturas bacterianas. Nos isolados que suscitaram algumas dúvidas, procedeu-se à sua deteção por PCR.

### 3.2.1 Teste Blue-CARBA

No teste Blue-CARBA, o azul de bromotimol foi selecionado como indicador, visto que inclui, uma gama de pH ótimo (6.0-7.6) para a maioria das  $\beta$ -lactamases (pH=6.8).

A solução teste consiste numa solução aquosa de azul de bromotimol a 0.04% (Merck Millipore, Germany) de pH=6.0, 0.1mmol/l  $ZnSO_4$  e 3mg/ml de imipenem (Tienam<sup>®</sup> 500,Merck Sharp & Dohme, França), com o pH final, pH=7.0. A solução negativa de controlo (solução de azul de bromotimol, pH=7.0) foi preparada para controlar a influência dos componentes ou produtos bacterianos no pH da solução (93).

Foi recolhida uma ansa de aproximadamente 5  $\mu$ l de uma cultura bacteriana pura, em meio de Mueller-Hinton (BioMérieux, França) e de seguida suspendeu-se diretamente essa quantidade de cultura bacteriana pura, em 100 $\mu$ l de ambas as soluções, a solução teste e a solução de controlo negativo em cada poço de uma placa de microtitulação e incubou-se a placa a 37°C durante 2h.

A presença de carbapenemases foi revelada quando se verificava alteração do PH, que se traduz numa alteração da cor das soluções, ou seja, quando a solução teste e a solução de controlo negativa eram respetivamente:

- i. Amarelo e azul
- ii. Amarelo e verde
- iii. Verde e azul

Quando não se verificava a presença de carbapenemases, ambas as soluções permaneciam com a cor azul ou verde.

## 3.2.2. Reações de PCR CARBA Multiplex

Nas reações de PCR CARBA Multiplex seguiu-se a mesma metodologia utilizada nas reações de PCR Multiplex para ESBL, sendo a amplificação realizada da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C durante 2 minutos; 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 57°C durante 90 segundos e 72°C durante 90 segundos; e uma etapa final de extensão final a 72°C durante 10 minutos. A análise dos fragmentos amplificados foi feita após uma corrida a 90 v em gel de agarose a 2%, em TBE 1x, corado com brometo de etídio.

Tabela 4: Grupo específico de primers para as reações de PCR CARBA Multiplex (94).

Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento amplificado	Concentração do Primer (µM)
<b>NDM FW</b>	ACTTGGCCTTGCTGTCCTT	603 bp	0.3
<b>NDM RV</b>	CATTAGCCGCTGCATTGAT		0.3
<b>VIM FW</b>	TGTCCGTGATGGTGATGAGT	437 bp	0.3
<b>VIM RV</b>	ATTCAGCCAGATCGGCATC		0.3
<b>IMP FW</b>	ACAYGGYTTRGTDGKCTTG	387 bp	0.3
<b>IMP RV</b>	GGTTTAAYAAARCAACCACC		0.3
<b>KPC FW</b>	TCGCCGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	353 bp	0.3
<b>KPC RV</b>	ACAGCTCCGCCACCGTCAT		0.3
<b>OXA48 FW</b>	ATGCGTGTATTAGCCTTATCG	265 bp	0.3
<b>OXA48 RV</b>	CATCCTTAACCACGCCCAAATC		0.3

Y=T ou C ; R=A ou G; S= G ou C; D=A ou G ou T

(Primers: Bogaerts et al, 2013)

## 4. Resultados

### 4.1 Isolados estudados

Dentro da família *Enterobacteriaceae*, os isolados estudados foram identificados no Serviço de Microbiologia e pertenciam a vários gêneros, tais como, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Proteus*. Sendo que a realização do estudo incidiu em 32 isolados de *Enterobacter cloacae complex* (31%), 26 isolados de *Escherichia coli* (25%), 44 isolados de *Klebsiella pneumoniae* (42%) e 2 isolados de *Proteus mirabilis* (2%), um total de 104 amostras de isolados bacterianos (Tabela 5), enviados à unidade de Biologia Molecular, por suspeita de serem bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado e/ou carbapenemases.

Tabela 5: Isolados estudados da família *Enterobacteriaceae*

<i>Enterobacteriaceae</i>				
<i>N</i>	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Total				
104	32	26	44	2

### 4.2 Prevalência de ESBLs CTX-M

Dos isolados suspeitos de produção de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (n=70), após as várias reações de PCR Multiplex, a presença de CTX-M-1 foi detetada em 30 isolados (43%), provenientes de vários serviços.

Dos trinta isolados produtores de CTX-M-1, a bactéria mais predominante foi *Klebsiella pneumoniae*, 83% (n=25) seguida de *Escherichia coli*, 17% (n=5) (Figura 5).

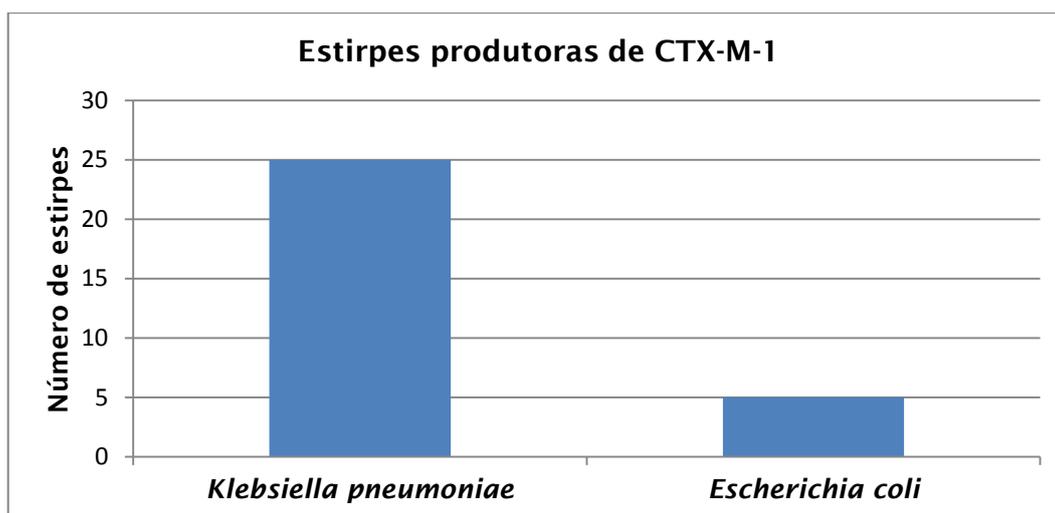


Figura 5: Distribuição das estirpes produtoras de CTX-M-1, caracterizadas no CHP.

Grande parte (33.3%) dos isolados foi proveniente do Serviço de Consulta Externa de Transplantes Renais, havendo uma distribuição dos restantes isolados por diferentes serviços, podendo dividir-se em Consulta Externa 43.3%; Internamento 36.7% e Serviço de Urgência 20% (Tabela 6).

Tabela 6: Distribuição dos isolados produtores de CTX-M-1 pelos diferentes Serviços do CHP

Serviço	Nº de isolados
CE* Transplantes Renais	10
Serviço de Urgência	5
CE* Medicina A	1
Internamento Fisiatria	2
Internamento Neurologia	1
Internamento Neurocirurgia	1
Internamento Nefrologia	3
Internamento Cardiologia	1
Internamento T.C.E	1
SCI Cuidados Intermédios (SU)**	1
CE* Pós-Transplante Hepático	2
Internamento Cirurgia 3	1
Internamento Urologia	1

\*CE, Consulta externa

\*\*SU, Serviço de Urgência

De todos os casos positivos de CTX-M-1 (n=30), 83.3% correspondem a bactérias isoladas a partir do produto Urina (n=25) e 10% a Sangue (n=3). Correspondendo os restantes a pus de abscesso (n=1) e líquido peritoneal (n=1) (Figura 6).

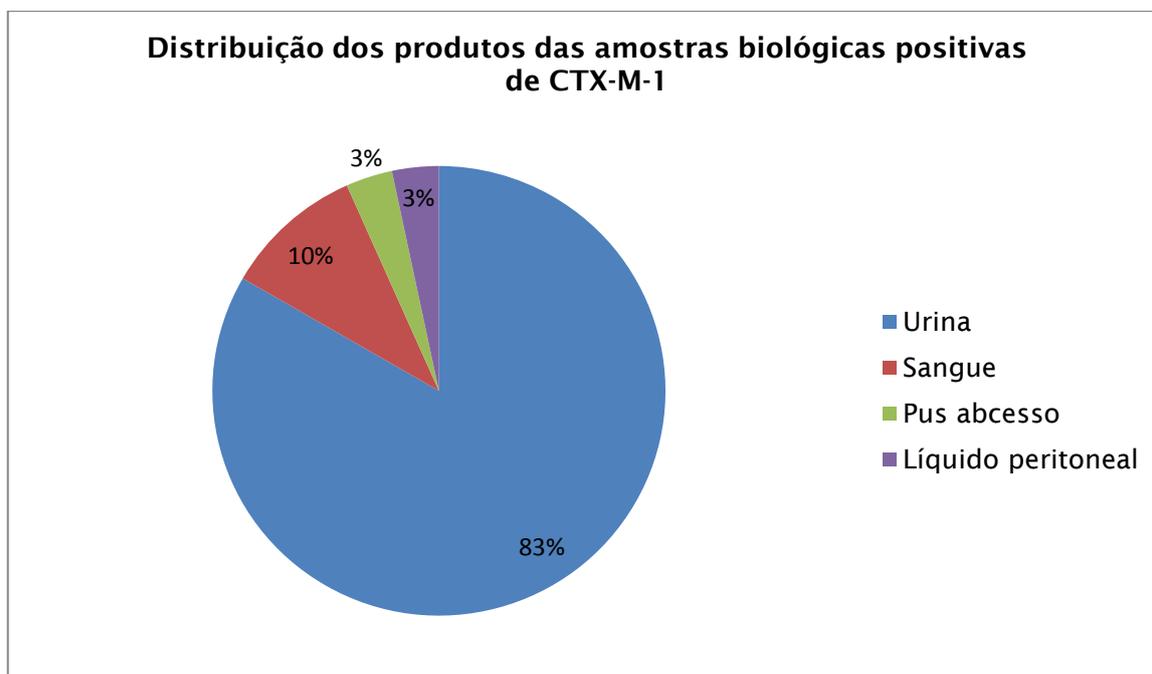


Figura 6: Distribuição dos produtos que serviram de amostra biológica para caracterizar os isolados produtores de CTX-M-1.

Entre os dez isolados provenientes do serviço de Consulta Externa de Transplantes Renais, todos eles foram isolados a partir de amostras de urina, em doentes sujeitos a transplante renal (90%) ou transplante Reno-pancreático (10%). Nos restantes doentes, em que os isolados provieram dos outros serviços, os diagnósticos eram variados, desde febre, paraplegia, pneumonia, dispneia, peritonite terciária, choque séptico por peritonite com abscesso, hemorragia subdural pós traumática, rastreio séptico entre outras patologias, sem claro realce em número com os serviços em questão, à exceção das patologias do trato urinário (n=6).

No que diz respeito às idades dos doentes, estas variavam entre os vinte e três e os noventa e cinco anos, sendo as faixas etárias, entre os 61-90, as idades onde se encontrou mais incidência de  $\beta$ -lactamases CTX-M-1 entre os doentes hospitalizados (Figura 7).

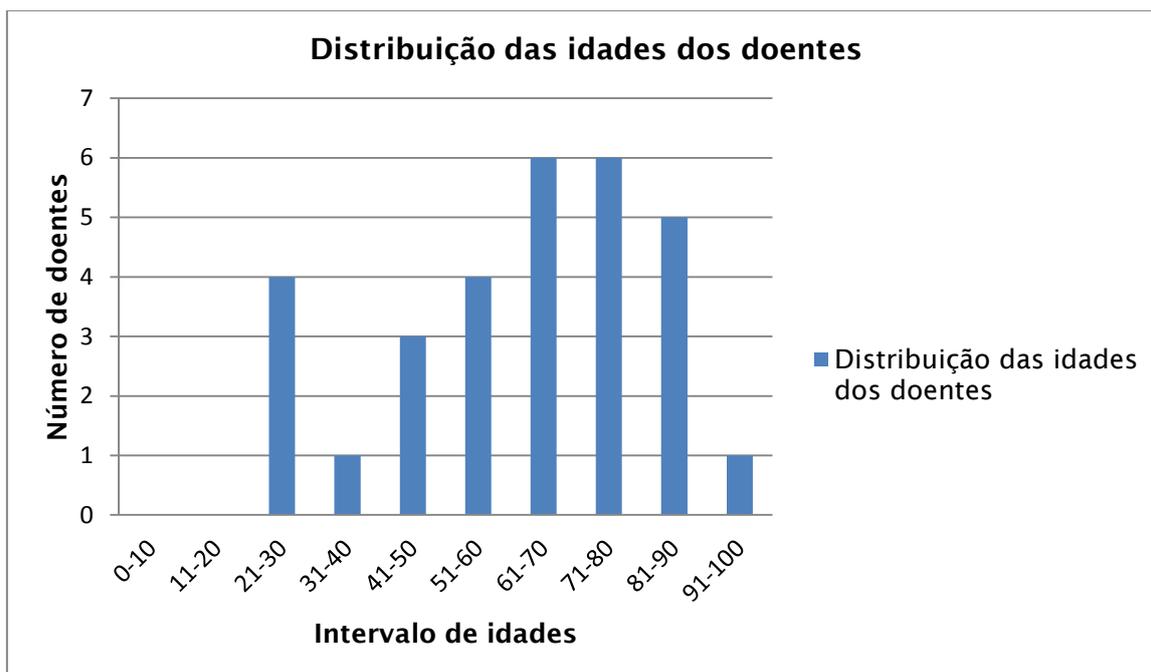


Figura 7: Distribuição das idades dos doentes, nos quais se encontraram bactérias produtoras de CTX-M-1.

#### 4.3 ESBLs TEM e SHV

A presença de ESBLs do tipo TEM foi também detetada nos isolados provenientes dos doentes hospitalizados no CHP. Do número total de isolados suspeitos de produção de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado ( $n=70$ ), foram identificadas vinte e uma do tipo TEM (30%), havendo uma predominância de *Klebsiellas pneumoniae*, 52% ( $n=11$ ) e as restantes estirpes identificadas produtoras de TEM eram *Escherichia coli*, 33% ( $n=7$ ); *Proteus mirabilis*, 10% ( $n=2$ ) e *Enterobacter cloacae*, 5% ( $n=1$ ) (Figura 8).

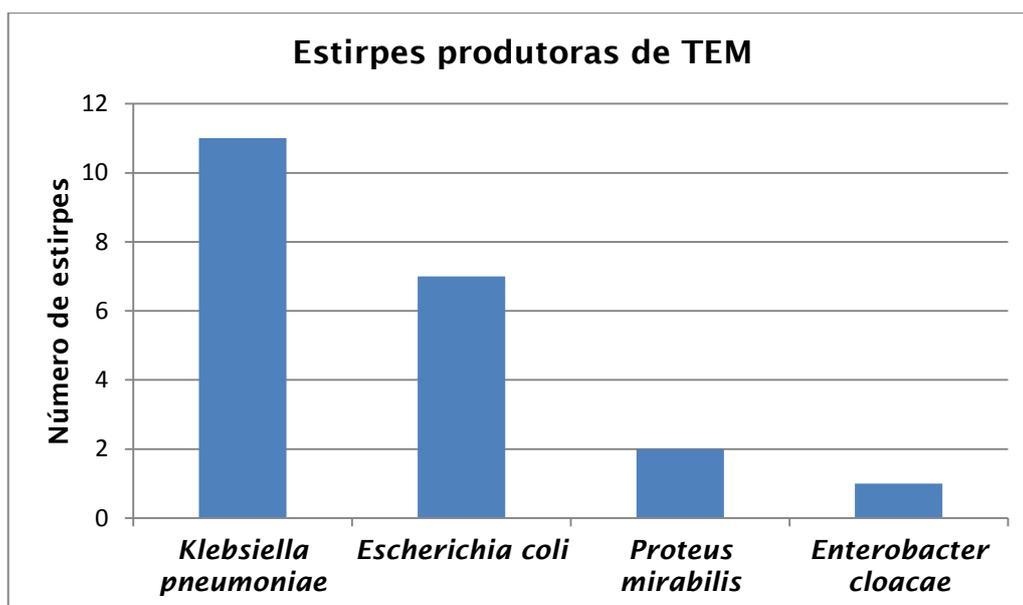


Figura 8: Distribuição das estirpes produtoras de TEM, caracterizadas no CHP.

Os isolados produtores de TEM provieram de diversos serviços, Internamento 62%; Consulta Externa, 19% e Serviço de Urgência 19%, sendo que, nenhum serviço se destacou (de forma prevalente e em número) em relação aos outros (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição dos isolados produtores de TEM pelos diferentes Serviços do CHP.

Serviço	Nº de isolados
Serviço de Urgência	3
Internamento Neurologia	3
CE* Transplantes Renais	3
Internamento Fisiatria	2
Internamento SCI pediátrico	2
Internamento Cirurgia Vascular	1
Internamento Cirurgia 1	1
Internamento Urologia	1
Internamento Ortopedia	1
Internamento Medicina C	1
CE* Medicina A	1
SU** Atendimento pediátrico referenciado	1
Internamento Neonatal, cuidados especiais	1

\*CE, Consulta Externa

\*\*SU, Serviço de urgência

Já no que diz respeito ao produto da amostra biológica do doente, a partir do qual foi possível verificar a presença destas  $\beta$ -lactamases de espectro alargado, foi possível identificar o produto “urina” como o mais comum entre as amostras positivas de TEM, sendo que, do total de isolados positivos de TEM (n=21), 76% correspondem a amostras de urina (n=16), 19% a secreções respiratórias (n=4) e apenas 5 % a uma amostra de sangue (n=1) (Figura 9).

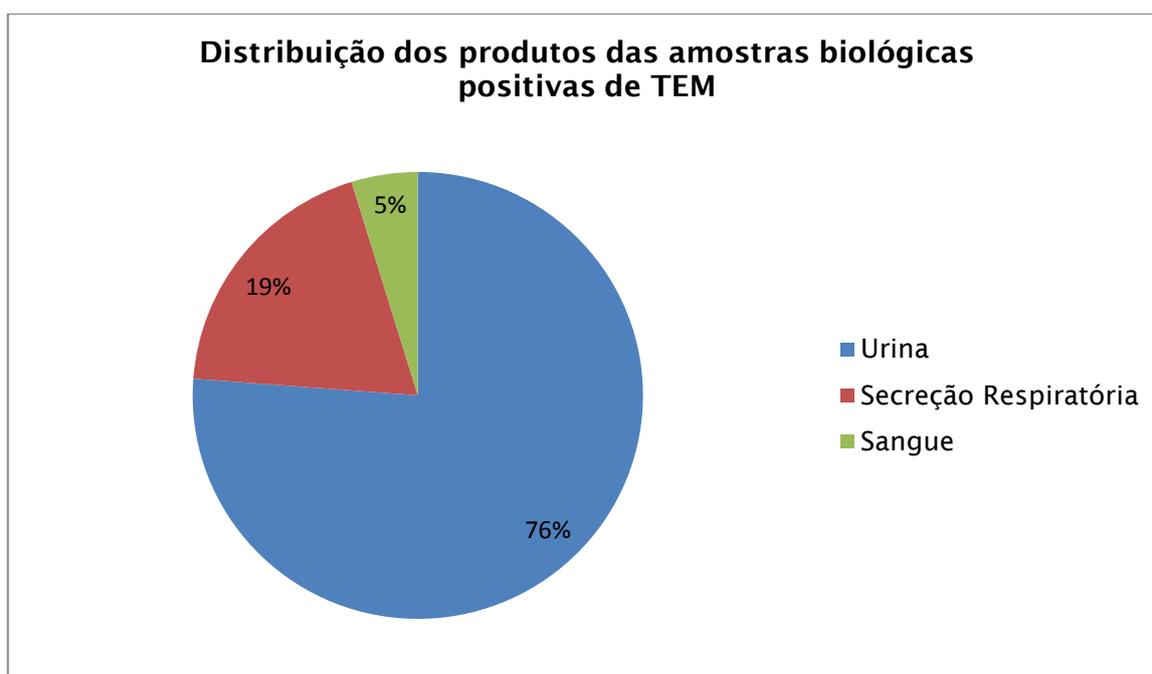


Figura 9: Distribuição dos produtos que serviram de amostra biológica para caracterizar os isolados produtores de TEM.

Quanto aos diagnósticos dos doentes, esses eram muito variados, diferindo consoante o serviço no qual o doente se encontrava hospitalizado. No entanto, apesar de muitos dos casos de TEM positivos ser apenas um por cada serviço (tabela 7), naqueles onde se encontrou mais do que um isolado, apenas existe o mesmo diagnóstico dos doentes hospitalizados no serviço de Consulta Externa de Transplantes Renais, tendo sido o doente sujeito a um Transplante Renal (n=3).

As idades dos doentes hospitalizados eram variadas, desde os seis dias de idade até aos noventa anos (anexo 2), no entanto a faixa etária onde houve mais prevalência de TEM (28.6%) foi entre os 81- 90 anos de idade, não se tendo verificado nenhuma bactéria produtora de TEM, isolada a partir de um dado produto biológico de doentes entre os 31- 40 anos de idade (Figura 10).

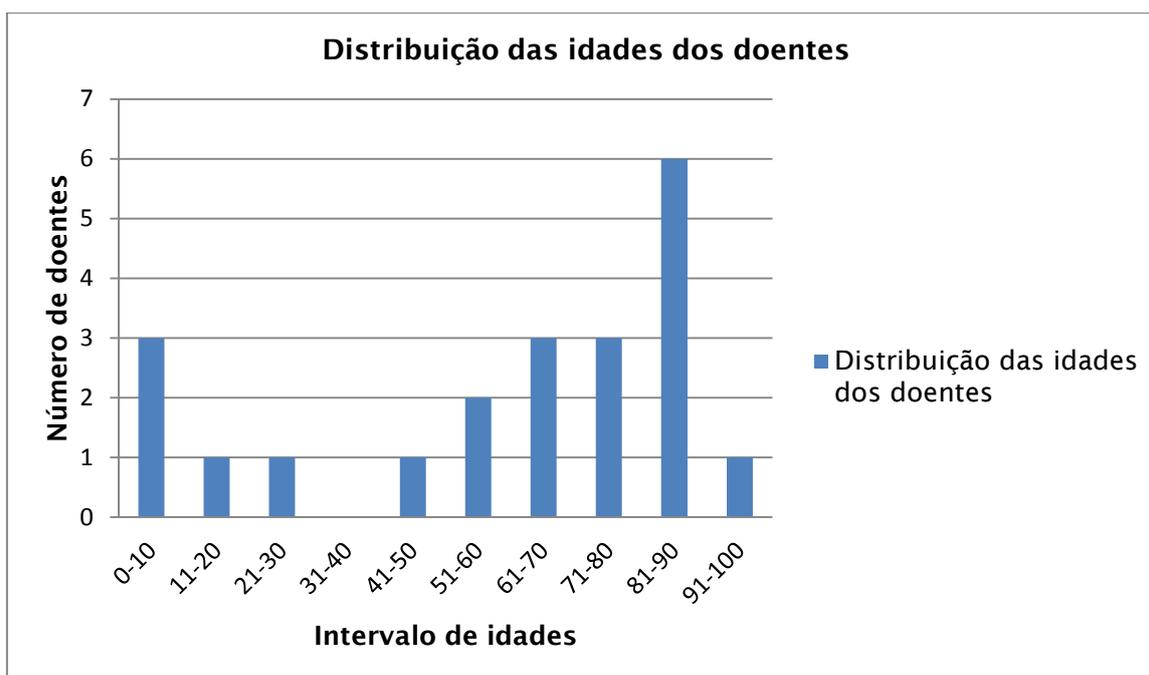


Figura 10: Distribuição das idades dos doentes, nos quais se encontraram bactérias produtoras de TEM.

Quanto a SHV foram as  $\beta$ -lactamases de espectro alargado encontradas em menor número nos isolados clínicos, apenas quinze isolados (21%), sendo a produção de SHV mais predominante em *Klebsiella pneumoniae*, 93% (n=14), registando-se apenas 7% (n=1) em *Escherichia coli* (Figura 11).

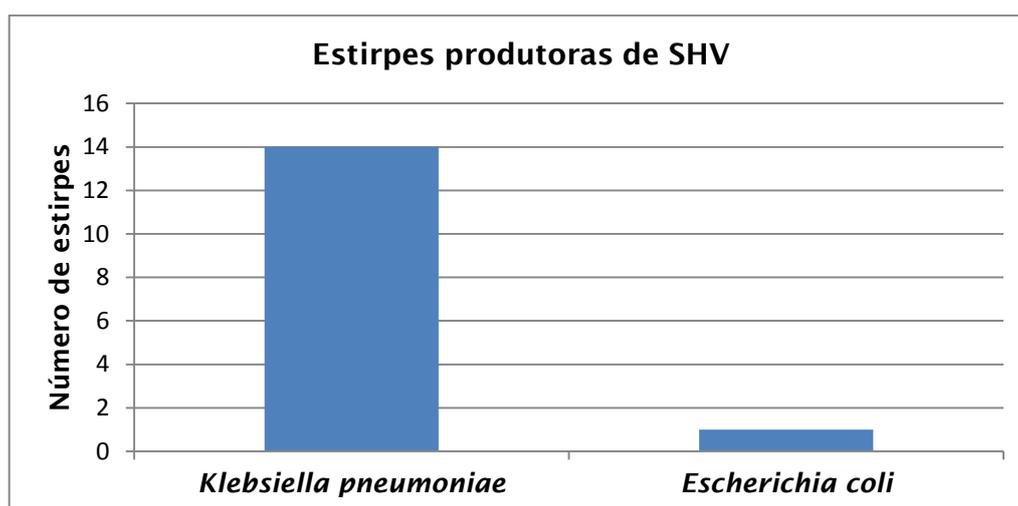


Figura 11: Distribuição das estirpes produtoras de SHV, caracterizadas no CHP.

Tal como CTX-M-1 e TEM, SHV também foi possível encontrar presente em diferentes serviços do CHP, Internamento 60%; Consulta Externa, 27% e Serviço de Urgência 13% (Tabela 8).

Tabela 8: Distribuição dos isolados produtores de SHV pelos diferentes Serviços do CHP.

Serviço	Nº de isolados
CE* Transplantes Renais	3
Serviço de Urgência	2
Internamento SCI- Unidade cuidados intensivos	2
Internamento Medicina A	1
Internamento Medicina B	1
Internamento Ortopedia	1
Internamento Fisiatria	2
Internamento SCI Pediátrico	1
Internamento Cirurgia	1
CE* Medicina A	1

\*CE, Consulta Externa

Tal como os isolados provenientes dos produtos das amostras biológicas, a partir das quais foi possível identificar CTX-M-1 e TEM, em SHV (n=15) o produto da amostra biológica mais predominante também foi a urina (n=11), 72% e os restantes produtos biológicos correspondem a sangue (n=2) e secreções respiratórias (n=2), em percentagens equivalentes, 14 % (Figura 12).

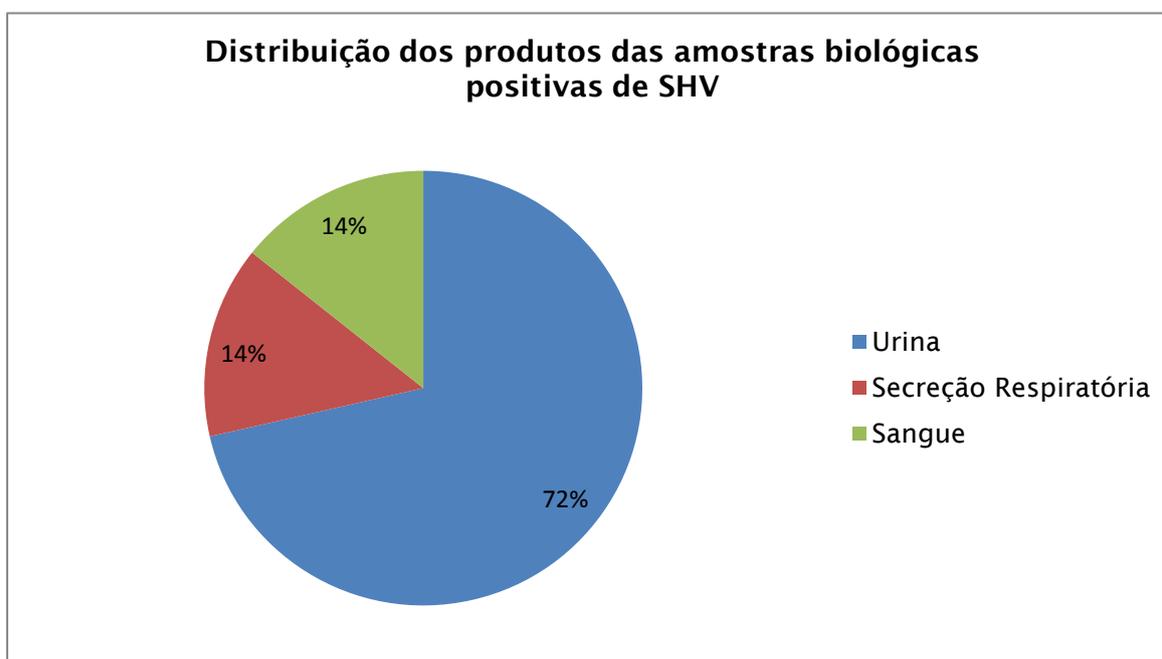


Figura 12: Distribuição dos produtos que serviram de amostra biológica para caracterizar os isolados produtores de SHV.

Em relação às idades dos doentes, neste caso e paralelamente ao sucedido nos casos positivos de TEM, foi possível identificar intervalos de idade nos quais não se verificou nenhum doente infetado com bactérias produtoras de SHV, mas enquanto em TEM só se verificou um único intervalo (31- 40), em SHV observaram-se dois intervalos de idades, 11- 20 e 31- 40, sendo dos 71-90 anos de idade, o intervalo que corresponde a um maior predomínio de SHV (Figura13).

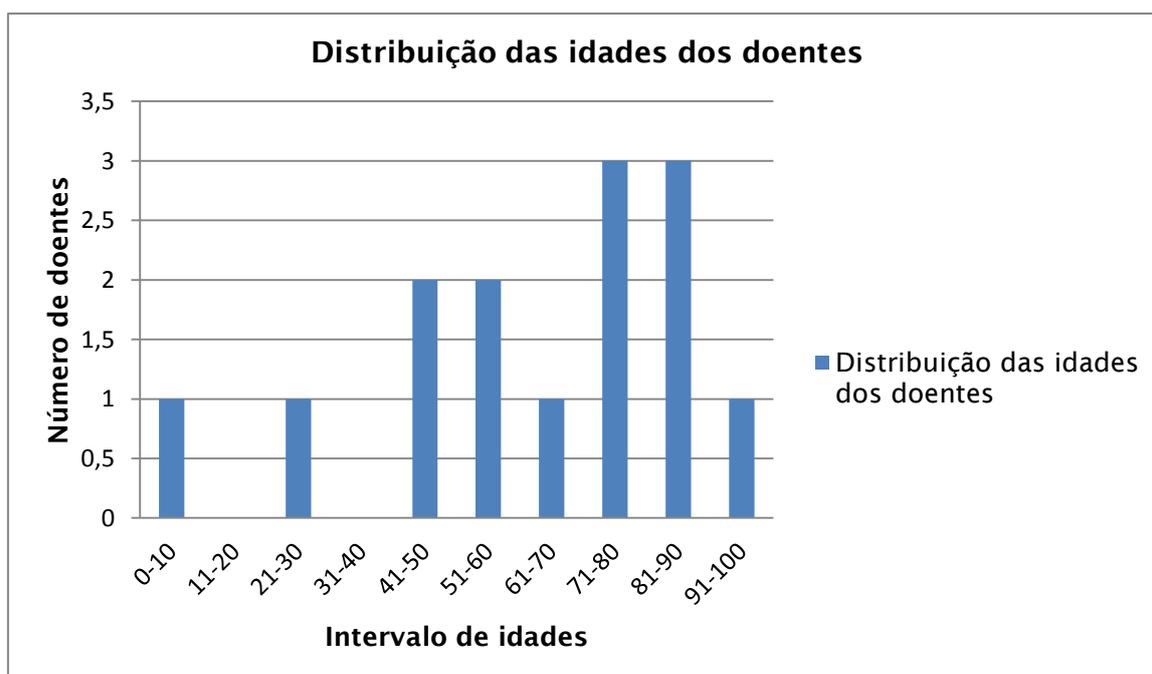


Figura 13: Distribuição das idades dos doentes, nos quais se encontraram bactérias produtoras de SHV.

#### 4.4.Carbapenemases

De todos os isolados que chegaram à Unidade de Biologia Molecular por suspeita de serem produtores de carbapenemases (n=74), procedeu-se à sua deteção com o teste Blue-Carba. O teste apresentou dúvidas em 36,5 % dos isolados, estes foram então confirmados por PCR, não se tendo confirmado nenhum caso como positivo.

De todos os casos positivos, n=9 (12%), seguiu-se igualmente, a sua confirmação por PCR. Verificando-se a presença de 6 carbapenemases do tipo VIM (66.7%) e 3 OXA-48 (33.3%).

Os nove isolados produtores de carbapenemases, pertenciam a duas famílias, Enterobactereaceae (n=7) e Pseudomonadaceae (n=2). Verificando-se a presença de várias estirpes, *Enterobacter cloacae complex* 44.4% (n=4), *Klebsiella pneumoniae* 33.3% (n=3), *Pseudomonas aeruginosa* 11.1% (n=1) e *Pseudomonas putida* 11.1% (n=1) (Figura 14).

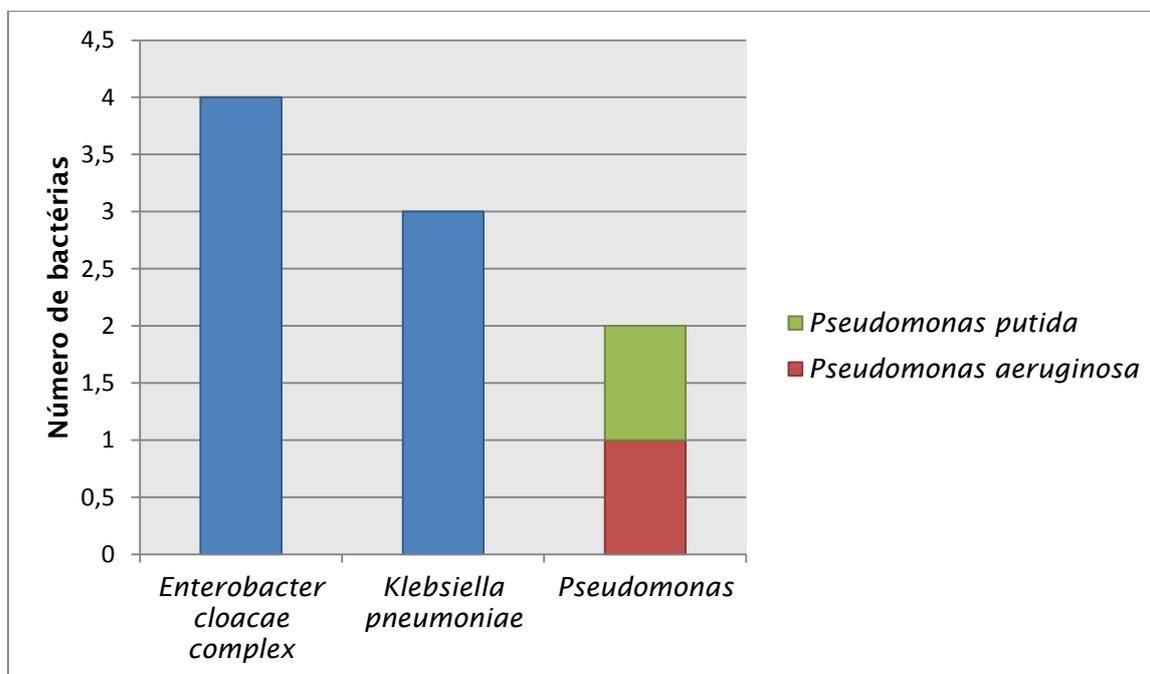


Figura 14: Isolados caracterizados no CHP, produtores de carbapenemases.

No que diz respeito aos serviços do Centro Hospitalar, onde foi possível detetar a presença de carbapenemases, estes também foram variados (Tabela 9). No entanto, 44.4 % (n=4) provieram do Serviço de Internamento, 33.3% (n=3) do Serviço de Urgência e 22.2% (n=2) da Consulta Externa.

Os doentes que estavam hospitalizados nos diferentes serviços tinham também diagnósticos distintos, com exceção dos doentes portadores do isolado 44 e 48 (anexo 4) que lhes tinha sido diagnosticado uma infeção do trato urinário (n=2).

Em contrapartida não foi possível detetar qualquer relação com o serviço em causa, uma vez que, um dos doentes estava hospitalizado no serviço de Urgência e o outro no Internamento Fisiatria.

Tabela 9: Distribuição dos isolados produtores de carbapenemases pelos diferentes Serviços do CHP.

Serviço	Nº de isolados
Serviço de Urgência	3
CE* Medicina A	1
Internamento Fisiatria	1
CE* Urologia	1
Internamento Cirurgia	1
Internamento SCI Pediátrico	1
Internamento Nefrologia	1

\*CE, Consulta Externa

No caso das carbapenemases, as amostras dos produtos biológicos já eram mais diversificadas (urina, líquido de drenagem, exsudado, sangue e bÍlis) comparativamente às  $\beta$ -lactamases. Apesar de tal facto, a urina continuou a ser o produto biológico mais predominante (n=5), 56%, surgindo os outros produtos biológicos, líquido de drenagem (n=1), exsudado (n=1), sangue (n=1) e bÍlis (n=1) em igual percentagem, 11% (Figura 15).

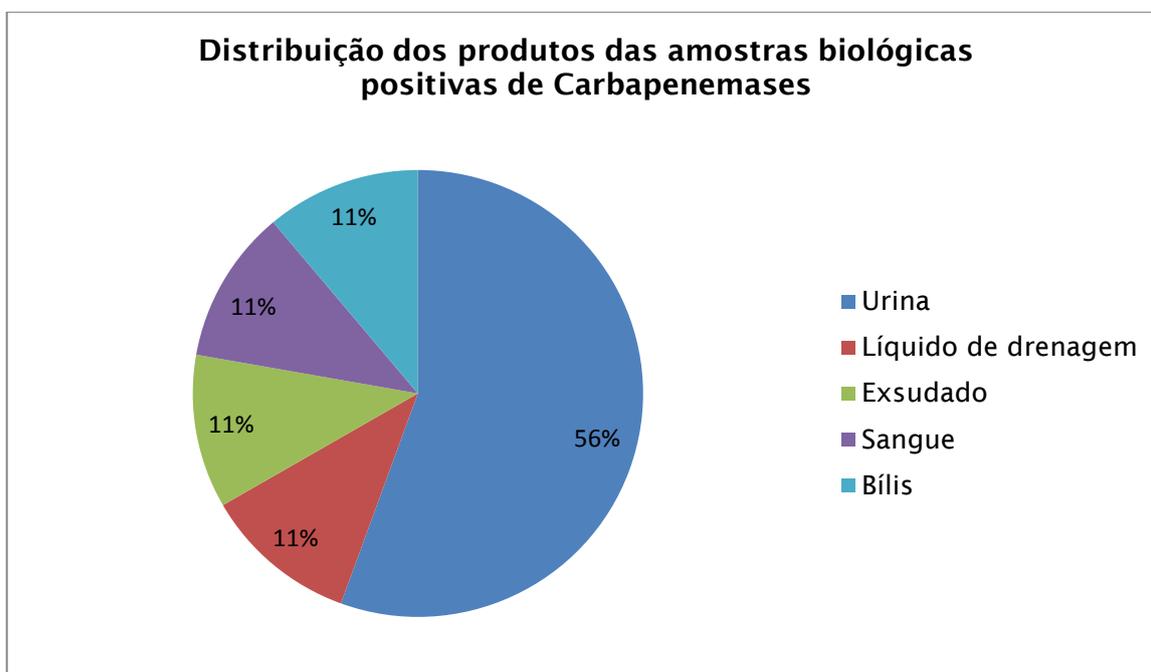


Figura 15: Distribuição dos produtos que serviram de amostra biológica para caracterizar os isolados produtores de carbapenemases.

Relativamente às idades dos doentes, infetados com bactérias produtoras de carbapenemases, existem quatro intervalos de idades nos quais não se detetou a presença de nenhuma carbapenemase, isto é, dos 11 aos 50 anos de idade não se observou nenhum doente, sendo que nos restantes intervalos de idade, surgem um ou dois doentes.

O intervalo 0-10, corresponde a um bebé de apenas cinco meses, cujo isolado bacteriano era uma *Pseudomona aeruginosa* (Anexo 4), verificando-se depois dois intervalos de idade (51-60 e 81-90) que correspondem também a um doente em cada intervalo, sendo que o maior predomínio de carbapenemases compreende os intervalos, 61-80 e 91-100 anos de idade (Figura 16).

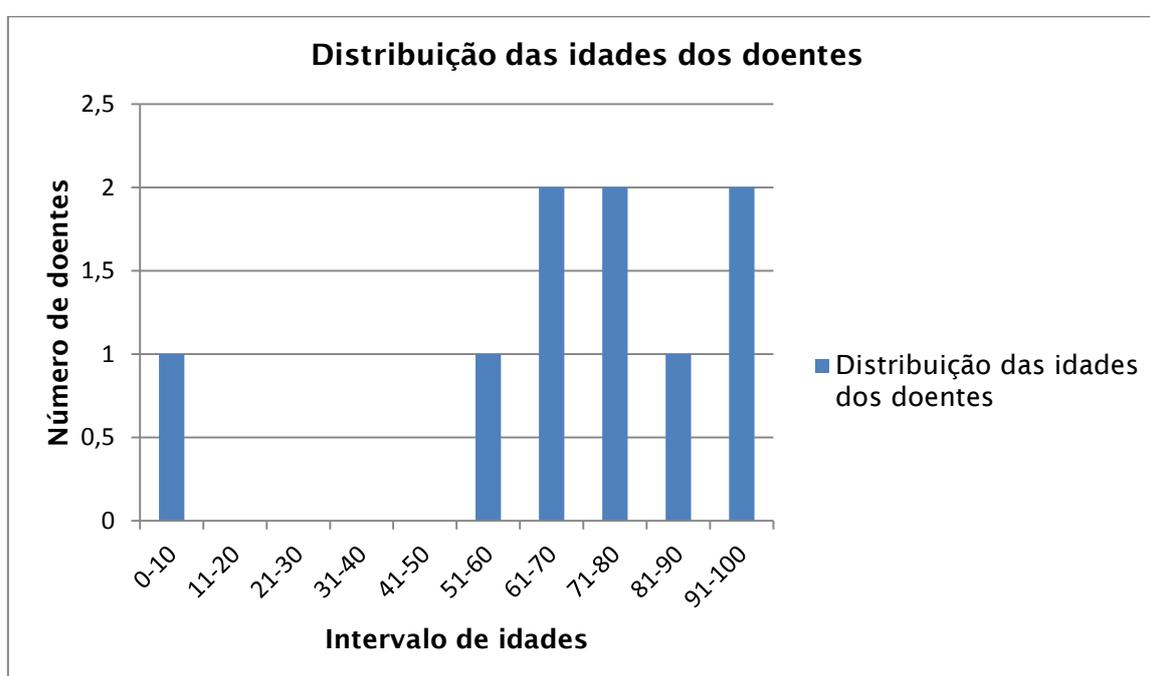


Figura 16: Distribuição das idades dos doentes, nos quais se encontraram bactérias produtoras de carbapenemases.

Tendo-se obtido resultados positivos de carbapenemases na família *Pseudomonadaceae*, e por serem também comuns no Centro Hospitalar do Porto, o estudo alargou-se também à família *Pseudomonadaceae*.

Foram então recolhidos 23 isolados de pseudomonas (Tabela 10), enviados pelo Serviço de Microbiologia à Unidade de Biologia Molecular por suspeita de serem isolados produtores de carbapenemases.

Tabela 10: Isolados estudados da família Pseudomonadaceae

*Pseudomonadaceae*

N total	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
23	20	2	1

As carbapenemases VIM detetadas eram maioritariamente produzidas por *Enterobacter cloacae complex* 66.6% (n=4) e as restantes pertenciam à estirpe *Pseudomona aeruginosa* 16.7% (n=1) e *Pseudomonas putida* 16.7% (n=1), todas provenientes de serviços distintos. Os isolados produtores de OXA-48 (n=3) foram todas detetadas em *Klebsiellas pneumoniae*, também provenientes de serviços diferentes (Figura 17).

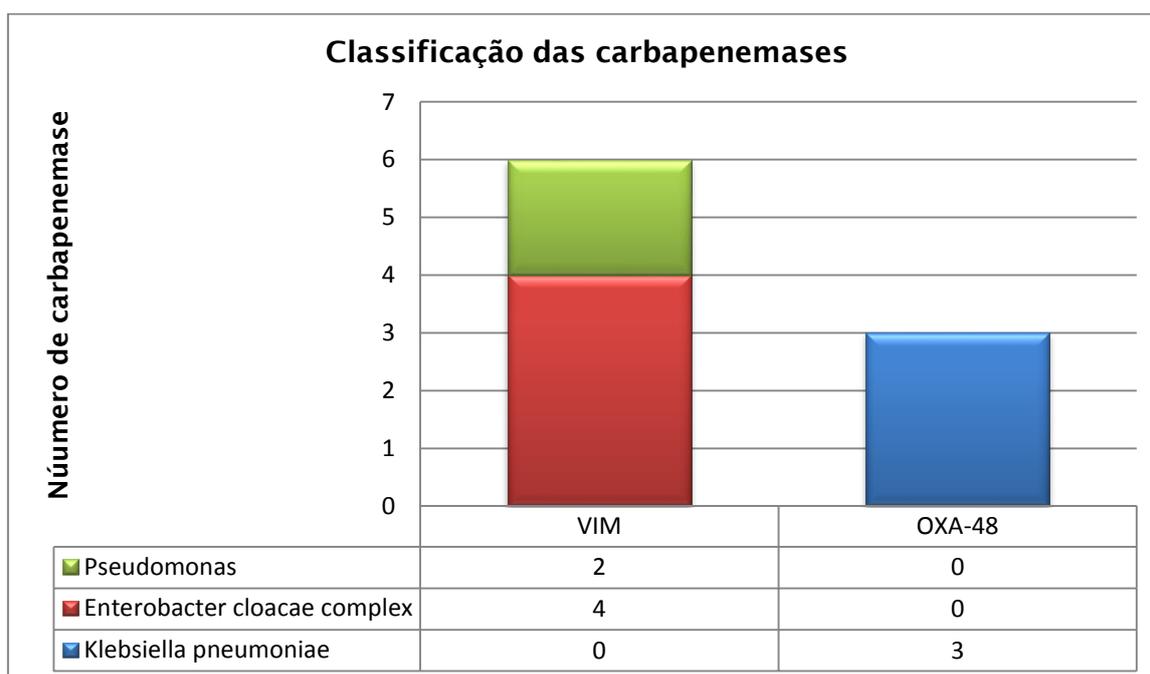


Figura 17: Caracterização das carbapenemases e respetivos isolados produtores, identificados no CHP.

Dos isolados produtores de carbapenemases (n=9), parte destes 33% (n=3), também produziam outro tipo de ESBLs, sendo que, os três eram *Klebsiellas pneumoniae* e produziam os três tipos de ESBLs (CTX-M-1, TEM e SHV) (Tabela 11).

Os três isolados provieram de serviços diferentes e apenas o isolado 44 e 48 tinham o diagnóstico em comum, uma infecção do trato urinário.

Tabela 11: Isolados produtores de Carbapenemases e ESBLs.

ID	Estirpe	Carbapenemases	CTX-M-1	TEM	SHV
42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	Positivo	Positivo	Positivo
44	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	Positivo	Positivo	Positivo
48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	Positivo	Positivo	Positivo

#### 4.5. Perfil de Suscetibilidade aos antibióticos

Aos isolados que foram estudados (104 isolados), foram feitos previamente testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, tendo em conta as diferentes famílias dos antibióticos, e portanto, todos os resultados baseiam-se nos dados disponibilizados.

Na família dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e derivados da penicilina, verificou-se que a ampicilina e a amoxicilina/ ácido clavulânico, eram os antibióticos que apresentavam um perfil de resistência em todos os isolados estudados (100% de resistência).

No que diz respeito às cefalosporinas, a cefuroxima e a cefotaxima, são dois antibióticos que apresentaram um perfil de resistência em todos os isolados, com exceção de apenas dois isolados no caso da cefuroxima, e quatro isolados relativamente à cefotaxima. Os isolados que apresentavam perfil de suscetibilidade à cefuroxima, correspondiam a uma *Pseudomona aeruginosa* produtora de uma carbapenemase VIM e uma *Klebsiella pneumoniae* produtora de SHV. A cefotaxima revelou um perfil idêntico à cefuroxima, mas neste caso, este antibiótico também se demonstrou sensível perante uma *Escherichia coli* produtora de TEM e uma *Klebsiella pneumoniae* produtora de SHV.

Nos antibióticos aminoglicosídeos, apesar de se terem efetuado testes com a amicacina, gentamicina e tobramicina, apenas a amicacina apresentou resultados a destacar, pois apresentou um perfil de sensibilidade na maior parte dos isolados, sendo que muitos deles eram produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado e carbapenemases. Gentamicina e tobramicina apresentaram resultados distintos, alguns isolados eram resistentes e outros sensíveis.

No grupo dos carbapenemos, destaca-se o ertapenemo e o meropenemo. O ertapenemo porque apresentou um perfil de resistência na maior parte dos isolados. De notar que, nos poucos isolados sensíveis ao ertapenemo, estes eram produtores de  $\beta$ -lactamases ou carbapenemases. O meropenemo é o antibiótico deste grupo ao qual a maior parte destes isolados apresentou um perfil de sensibilidade, não sendo ainda assim, superior ao perfil de sensibilidade verificado na amicacina.

O imipenemo, um outro carbapenemo testado, surge em maior destaque quando se confirma o resultado esperado perante uma bactéria suspeita de produzir carbapenemases. Ou seja, neste caso verifica-se que os isolados suspeitos de produzirem carbapenemases, apresentam resistência aos carbapenemos (incluindo o imipenemo). Por outro lado, e tendo em conta que, a terapêutica adaptada quando se suspeita de uma bactéria produtora de ESBLs são os carbapenemos, era de esperar que os isolados bacterianos produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado se apresentassem sensíveis aos carbapenemos. No entanto, verificou-se que alguns desses isolados suspeitos de produzirem ESBLs, apresentavam resistência ao ertapenemo.

Esta resistência ao ertapenemo poderá ser devida a outros mecanismos intrínsecos de resistência antimicrobiana, como por exemplo, a alteração da permeabilidade da membrana externa, permitindo assim que uma alteração na porina (proteína que estabelece ligação com o interior da célula), torne a bactéria resistente ao ertapenemo, assim como o aumento do efluxo, isto é, o bombeamento ativo de antimicrobianos para o meio extracelular, produzindo assim resistência a alguns antibióticos.

No caso da família *Pseudomonadaceae*, para além dos diferentes testes já referidos, surge ainda o aztreonam e a colistina. O aztreonam, apresentou um perfil intermediário em grande parte dos isolados (n=12), sendo que os restantes apresentavam um perfil de resistência (n=7), sem qualquer resultado de sensibilidade a este antibiótico. Contrariamente ao aztreonam, a colistina

apresentou-se sensível perante todos os isolados, com a exceção de apenas uma *Pseudomona aeruginosa*.

#### 4.6. A mortalidade e as ESBLs

Após a análise de todos os isolados estudados na Unidade de Biologia Molecular, foi possível verificar o número de óbitos entre os doentes, cujos isolados foram estudados e que revelaram a produção de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado, não esquecendo que por vezes, dois isolados distintos provinham de um mesmo doente.

Verificou-se assim, a morte de sete doentes hospitalizados com ESBLs do tipo CTX-M-1 (25%), cinco doentes com ESBLs do tipo TEM (18%) e quatro doentes com ESBLs do tipo SHV (14%), contudo não se verificou a morte de nenhum doente infetado com bactérias produtoras de carbapenemases.

No total de doentes, a partir dos quais foram isolados bactérias produtoras de ESBLs (n=55), verificou-se uma mortalidade de 29% (n=16). Por outro lado, nos doentes, em que os isolados bacterianos em questão não eram produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (igualmente n=55), verificou-se uma percentagem de mortes de 16.4% (n=8).

## 5. Discussão

Perante os resultados obtidos, destaca-se de imediato, a prevalência de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado do tipo CTX-M-1 (43%). Este foi o tipo de ESBL que se encontrou em maior número nos isolados obtidos de amostras biológicas de doentes hospitalizados, no Centro Hospitalar do Porto, seguindo-se a presença de ESBLs TEM e SHV (30% e 21% respetivamente). Por outro lado, ao verificar-se a presença de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado do tipo CTX-M, comprova-se a importância das enzimas CTX-M, realçada em 2003 por Davies (The National Public Health Service for Wales (NPHS) Microbiologia, Cardiff) (45).

No caso de CTX-M-1, verificou-se um predomínio deste tipo de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado no serviço de Consulta Externa de Transplantes Renais (33.3%), o que corresponde a dez casos positivos de CTX-M-1, um número elevado em comparação com os restantes serviços onde foi possível verificar também a presença deste tipo de ESBLs.

Os doentes hospitalizados neste serviço e infetados com bactérias produtoras de CTX-M-1, tinham sido sujeitos a Transplante Renal e as idades entre estes doentes eram muito diversificadas (entre os 23-66 anos de idade, anexo 1), não se podendo assim, estabelecer nenhuma relação direta entre a produção de ESBL do tipo CTX-M-1 com as idades destes doentes hospitalizados no CHP.

No entanto, tendo em conta os fatores que promovem a infeção entre os doentes hospitalizados, a diminuição da imunidade e a crescente variedade de procedimentos médicos e técnicas invasivas, poderão ter sido algumas das causas potenciais de infeção entre este grupo de doentes. Assim como, o facto das taxas de infeção serem maiores nos doentes com suscetibilidade acrescida, devido à idade avançada e a uma doença subjacente (2), tal como acontece com os doentes que são submetidos a transplantes, nomeadamente transplantes renais. Casos em que as infeções urinárias são muito frequentes, e por isso, os doentes estão sujeitos a uma grande pressão antibiótica, sendo previsível uma taxa de resistência superior nos isolados provenientes deste serviço.

Ainda assim, e tendo em conta os resultados obtidos, este estudo contém uma limitação, que neste caso não permite conclusões seguramente factíveis. Isto porque, os isolados que provieram do Serviço de Microbiologia do CHP, para a

Unidade de Biologia Molecular, com a finalidade de se proceder à detecção de ESBLs e carbapenemases, foram apenas isolados que suscitaram dúvidas na interpretação dos testes fenotípicos. Este facto, não permite assim, analisar seguramente a quantidade de isolados produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado existentes no hospital, e conseqüentemente comprovar relações existentes entre a produção de ESBLs e os serviços onde estas foram identificadas ou até mesmo outros serviços onde poderão existir.

Apesar desta limitação, este estudo permitiu verificar uma diferença entre os vários grupos de serviços (Serviço de Internamento, Consulta Externa e Serviço de Urgência), relativamente aos vários tipos de ESBLs encontrados no CHP, pois ESBLs do tipo TEM e SHV surgem no Serviço de Internamento com uma percentagem muito próxima (62% e 60% respetivamente) e muito superior a CTX-M-1 (36.7%). A Consulta Externa é o serviço, onde se observou uma maior percentagem de CTX-M-1 (43.3%), sendo este o segundo serviço onde se detetou uma maior incidência de TEM e SHV e por último, o Serviço de Urgência, foi aquele onde se verificou menor percentagem de incidência nos três tipos de ESBLs encontrados.

Esta diferença poderá ser interpretada, como algo explicativo do objetivo/função de cada grupo de serviço, pois por exemplo, o Serviço de Internamento contempla os doentes que ficam internados no hospital, ou seja, permanecem nas instalações durante algum tempo (entre dias, semanas e por vezes alguns meses) e este facto poderá ser um fator contribuinte para um predomínio de resistência por parte dos doentes hospitalizados neste serviço. Por outro lado, o Serviço de Urgência, sendo um serviço de estadia muito curta, em que os doentes ocorrem em caso apenas de urgência médica, é passível de entendimento que este seja o serviço onde surgem doentes com uma menor taxa de resistência.

Já no que diz respeito às carbapenemases, de todos os isolados suspeitos de serem produtores de carbapenemases (n=74), procedeu-se à sua detecção com o teste Blue-Carba. No entanto, este teste apresentou dúvidas em 36,5 % dos isolados, estes foram então confirmados por PCR, não se tendo confirmado nenhum caso como positivo. Porém de todos os casos que se apresentaram seguramente positivos perante este teste, n=9 (12%), após a sua confirmação por PCR, verificou-se a presença de 6 carbapenemases do tipo VIM (66.7%) e 3 OXA-48 (33.3%). As carbapenemases foram encontradas em maior percentagem no Serviço de Internamento 44.4% (n=4), tal como TEM e SHV, porém a distribuição das carbapenemases pelos restantes serviços, não segue o mesmo padrão de

TEM e SHV, pois neste caso, o Serviço de Urgência aparece como o segundo serviço, onde se verificou maior incidência (33.3%) e por fim, o Serviço de Consulta Externa 22.2% (n=2).

É de notar que, ao contrário do esperado, a quantidade de carbapenemases encontradas foi superior na família *Enterobacteriaceae* (n=7), 13.7% do que na família *Pseudomonadaceae* (n=2), 8.7%. Uma explicação para o sucedido é tal como já referido anteriormente, a limitação do presente estudo, pois nem todos os isolados de *Pseudomonas* foram enviados para a Unidade de Biologia Molecular.

Foi assim possível, verificar-se a presença de dois tipos de carbapenemases, VIM e OXA-48, referentes à classe B e D, respetivamente, segundo o sistema de classificação molecular de Ambler (17). Nas duas estirpes produtoras de carbapenemases do tipo VIM, observou-se um perfil de suscetibilidade aos antibióticos, semelhante entre os isolados de *Enterobacter cloacae complex*, mas diferente do perfil de suscetibilidade das *Pseudomonas*, sendo que, os isolados de *Enterobacter cloacae complex* apresentavam resistência a praticamente todos os antibióticos (com exceção de apenas dois antibióticos). Este facto confirma desta forma, que carbapenemases do tipo VIM (metalo- $\beta$ -lactamases) tipicamente hidrolisarem eficientemente carbapenemos e resistirem a inibidores de  $\beta$ -lactamases (30).

OXA-48, o outro tipo de carbapenemases descrito neste estudo, apenas foi identificado na espécie de *Klebsiella pneumoniae*, o que está de acordo com o descrito relativamente a *Enterobacteriaceae*s, que mais comumente produzem carbapenemases da família OXA (30). Em Portugal a deteção de OXA-48 está ainda muito limitada, sendo esta a primeira descrição desta enzima em *Klebsiella pneumoniae*. Recentemente foi descrita pela primeira vez em Portugal a presença de OXA-48, em *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae* a partir de um doente de 74 anos de idade. O doente tinha sido hospitalizado de urgência num hospital em Lisboa, com uma insuficiência cardíaca descompensada em Março de 2013 (95).

De extrema importância relativamente às carbapenemases, é ainda, o caso do bebé de cinco meses, a quem foi detetada uma *Pseudomonas aeruginosa* produtora de VIM. Sabe-se que a criança se encontrava internada no Serviço de Cuidados Intensivos Pediátrico desde o seu nascimento, o que sugere a aquisição da bactéria em questão no hospital.

Desta forma, a deteção inequívoca de carbapenemases em ambiente hospitalar assume particular relevância. Foi possível constatar que logo após se

ter iniciado a sua pesquisa se observaram resultados positivos, e apesar das carbapenemases terem sido encontradas em menor número que as ESBLs, constituem um problema sério e assustador, devido à possibilidade de disseminação destes mecanismos de resistência entre espécies bacterianas e mesmo destas bactérias entre os doentes.

Em pouco mais de um ano (entre 26/04/2013 e 22/05/2014, anexo 4), foram detetadas carbapenemases em Enterobactereaceas, sem qualquer ligação aparente entre si, sugerindo que as Enterobactereaceas produtoras de carbapenemases estão mais disseminadas do que seria esperado. Se este temido mecanismo de resistência não for controlado, pode levar ao surgimento de isolados multirresistentes com perfis de suscetibilidade como os que se verificaram nos isolados produtores de VIM, comprometendo assim o tratamento dos doentes, resultando eventualmente num maior número de mortes.

Relativamente às diferentes classes de antibióticos, estas apresentaram algumas diferenças. Na classe dos antibióticos penicilínicos, todos os isolados se revelaram resistentes à ampicilina e amoxicilina/ácido clavulânico, o mesmo se verificou para as cefalosporinas, destacando-se algumas exceções de isolados susceptíveis (isolados 22, 148, 156 e 157), sendo que, os isolados que foram exceção a esta resistência por parte da cefuroxima e cefotaxima, eram produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado e ou/carbapenemases (Anexo 1-4).

Alguns isolados mantiveram-se sensíveis à ceftazidima, assim como, na classe dos carbapenemos, ao ertapenemo e imipenemo. No entanto, o meropenemo foi o antibiótico que apresentou um maior número de isolados sensíveis, mas ainda assim, não superou o número de isolados que permaneceu sensível à amicacina, o antibiótico que perante os isolados bacterianos estudados, se apresentou mais suscetível. No que diz respeito à terapêutica dos doentes, 38.7% estavam sob antibioterapia. Contudo, não se verificou que a incidência destes mecanismos de resistência (ESBL e carbapenemases) fosse maior nos doentes sujeitos a antibioterapia, isto porque, apenas 37.5% destes doentes apresentaram mecanismos de resistência.

Por fim, e indo de encontro ao último objetivo deste estudo, no período decorrido entre a deteção e caracterização de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado e carbapenemases, bem como a hospitalização dos doentes infetados com bactérias que possuem estes mecanismos de resistência, conseguiu-se apurar o número de óbitos ocorridos. No entanto, nada nos garante, que a morte destes

doentes hospitalizados tenha sido somente consequência deste mecanismo de resistência. Pois ao doente em causa, estava sempre associada uma patologia prévia, que sendo esta mais grave ou não, poderá ter sido a verdadeira causa de morte, ou por outro lado, uma associação da patologia prévia com o mecanismo de resistência associado ou mesmo com a falência terapêutica.

Para que essa confirmação fosse viável (não esquecendo as limitações sempre inerentes), era necessário um estudo mais aprofundado com algum seguimento clínico do doente, assim como o acesso aos processos relativos às mortes por infecções hospitalares registados na Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses.

Contudo, verificou-se que, a percentagem de mortes a partir dos isolados produtores de ESBLs (29%) é superior àqueles que não produziam qualquer tipo de ESBLs (16.4%). Observando estes resultados, poderá suspeitar-se de que sejam um indício para algum peso das ESBLs nas mortes verificadas. No entanto, tendo em conta que, muitos dos doentes já se encontravam em idade avançada e que tinham sempre uma patologia associada, estes resultados não permitem afirmar que as ESBLs foram um fator determinante para a morte.

Igualmente relevante foram as idades dos doentes hospitalizados que faleceram, pelo facto de, estarem compreendidas entre os 50 e os 90 anos de idade. Sendo que, nos doentes em que a idade já era avançada, este poderá ser um fator que contribuiu peremptoriamente para a morte.

É de notar ainda, que estas percentagens não incluem aqueles doentes que estiveram hospitalizados no CHP, que porventura tenham adquirido uma infeção hospitalar e que entretanto tiveram alta médica, podendo ter falecido em casa ou mesmo em lares, não nos permitindo assim, ter acesso ao seu registo de óbito.

Assim e apesar das limitações inerentes, o presente estudo permitiu implementar com sucesso, uma metodologia capaz de esclarecer a presença de um mecanismo de resistência (produção de ESBLs), por métodos moleculares, encontrando-se atualmente em vigor na Unidade de Biologia Molecular e Serviço de Microbiologia do Centro Hospitalar do Porto.



## 6. Conclusão

Para além das conhecidas aplicações forenses da microbiologia - a identificação de impressões digitais (*Acinetobacter calcoaceticus*), a identificação de marcas dentárias e do suspeito (*Streptococcus salivarius*), o afogamento, (diatomáceas), meningite pós-traumática (*Streptococcus pneumoniae*) e Bioterrorismo (1) - a identificação do microrganismo, agente de infeção dos doentes hospitalizados é igualmente relevante, pois só assim, conhecendo as bactérias que habitam o nosso meio hospitalar, é possível tomar medidas de prevenção e precaução de forma a evitar a disseminação desses agentes patogénicos e consequentemente evitar a morte.

Este estudo viabilizou a implementação de uma metodologia, que permitiu verificar com êxito a presença de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado por métodos moleculares. Um mecanismo de resistência antimicrobiana detetado nas bactérias Gram-negativo, procedentes de amostras biológicas dos doentes hospitalizados no Centro hospitalar do Porto.

Foi igualmente factível, detetar a presença de carbapenemases, um mecanismo receado e preocupante a nível hospitalar. Pois a sua possibilidade de disseminação é algo assustador, o que pode implicar sérios problemas no tratamento dos doentes, principalmente se surgirem isolados bacterianos multi-resistentes, com perfis de resistência aos carbapenemos, a opção terapêutica adequada a estes casos. Perante uma situação destas, os profissionais de saúde deparam-se sem alternativa terapêutica adequada, e desta forma, a saúde dos doentes fica comprometida, originando um maior número de mortes.

Contudo, não se verifica, nem se pode afirmar uma relação de causa-efeito, entre a presença de ESBLs e a morte dos doentes. Esta poderá ser devida a outros fatores, ou da conjugação de todos eles (idade, patologia prévia, imunidade fragilizada, procedimentos técnicos invasivos e presença de ESBLs).

O grupo de Serviços em que ocorre uma prevalência de ESBLs, também pode ser algo de especial atenção e importância, pois consoante o serviço em que o doente está internado, ou até mesmo, em casos em que há apenas uma pequena passagem pelo serviço, pode ser relevante aquando da procura destes mecanismos de resistência. Há infeções em que a sua ocorrência é mais comum

num dado serviço hospitalar, e por isso, é de prever uma maior frequência de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado e/ou carbapenemases.

Desta forma, o presente estudo demonstrou-se viável e possibilitou com sucesso a deteção e caracterização destes mecanismos de resistência (ESBL e carbapenemases), mas especialmente e não menos importante, retrata um problema crítico em ambientes hospitalares que necessita de atenção e principalmente de ser controlado.

## 7. Perspetivas futuras

No âmbito deste problema, a resistência de bactérias a uma série de antibióticos e a preocupação que este tema sugere no controlo das infeções no meio hospitalar, é importante estarmos à alerta, e por isso, pensar em caminhos futuros.

Seria interessante e de forma a poder continuar o presente estudo, ter acesso aos processos relativos às mortes por infeções hospitalares registados na Delegação do Norte do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses. Só assim, seria possível obter dados mais concisos e conseqüentemente verificar alguma relação entre os casos estudados no hospital e aqueles que são registados no Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses. Esta seria uma hipótese de caminho futuro relativamente a este tema de especial relevância para a saúde pública.

Por outro lado, e tendo em conta que, quando os isolados bacterianos são enviados para a Unidade de Biologia Molecular do CHP, a fim de esclarecer um mecanismo de resistência, é porque surgem dúvidas na interpretação dos testes fenotípicos que detetam as ESBL. Desta forma, a implementação de um teste molecular tornou-se necessária para esclarecer inequivocamente esses casos, tal como foi possível verificar no presente estudo.

Assim, uma possibilidade a este nível seria, a deteção molecular dos genes ampC. Os dados de prevalência são escassos devido à falta de testes, contudo parecem ser menos comuns do que as ESBLs. As  $\beta$ -lactamases AmpC codificadas por plasmídeo mais frequentemente encontradas pertencem às famílias de CMY, FOX e de DHA (66) e a deteção molecular destes genes poderá ser então, um outro rumo a seguir, de forma a esclarecer mecanismos de resistência.

Os laboratórios deveriam ser capazes de detetar  $\beta$ -lactamases AmpC, porque têm sido associadas a uma falsa suscetibilidade a cefalosporinas (96). E como os testes fenotípicos não diferenciam entre  $\beta$ -lactamases AmpC cromossómicas ou mediadas por plasmídeo, para que estas últimas sejam detetadas com maior precisão, deveriam ser detetadas com o teste de multiplex PCR AmpC de Pérez-Pérez e Hanson (97).

No entanto, a ciência evolui, há sempre estudos a decorrer no sentido de melhorar o presente, e neste sentido a deteção de resistência por MALDI-TOF

(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Time-Of-Flight), seria outra sugestão possível para o futuro.

Estudos recentes indicam a possibilidade de usar sistemas de espectrometria de massa, mais especificamente, sistemas MALDI-TOF, para identificar determinados mecanismos de resistência, contendo várias vantagens. A primeira vantagem reside no facto, do custo económico de cada determinação ser inferior ao custo das técnicas moleculares clássicas da deteção dos genes de resistência. Em segundo lugar, comparando com os métodos de rotina atualmente utilizados, a deteção de resistência por MALDI-TOF permite obter resultados de uma forma mais rápida. E por último, a possibilidade de permitir a deteção de enzimas que não foram caracterizadas previamente, nas quais não existe qualquer informação sobre os genes que as codificam. Por estas razões, acredita-se que esta poderá ser uma metodologia muito útil que se poderá implementar nos laboratórios de microbiologia clínica (98).

A metodologia proposta tem um grande impacto na deteção precoce de Enterobactereaceas produtoras de ESBLs de hemoculturas positivas, sendo um método rápido e eficiente, e permitindo precocemente, a administração de uma terapêutica apropriada, (99) pois uma antibioterapia adequada é de extrema importância na diminuição da mortalidade dos doentes com sépsis (100, 101).

A sublimidade Microbiológica é necessária mais do que nunca e é fundamental que ESBLs,  $\beta$ -lactamases AmpC e carbapenemases sejam detetadas com rapidez e precisão (30).

## 8. Bibliografia

1. Cunha M, Ferreira P, Malheiro I, Porto B, Abreu C, Medeiros R, et al. Pós-Graduação em Ciências Médico-Legais. *Biologia Forense* 2008.
2. World Health Organization. *Epidemiology of nosocomial infections. Prevention of hospital-acquired infections: A practical guide.* 122002.
3. Mayon-White RT, Ducei G, Kereselidze T, Tikomirov E. An international survey of the prevalence of hospital-acquired infection. *The Journal of hospital infection.* 1988;11 Suppl A:43-8.
4. Emmerson AM, Enstone JE, Griffin M, Kelsey MC, Smyth ET. The Second National Prevalence Survey of infection in hospitals--overview of the results. *The Journal of hospital infection.* 1996;32(3):175-90.
5. Gastmeier P, Kampf G, Wischnewski N, Hauer T, Schulgen G, Schumacher M, et al. Prevalence of nosocomial infections in representative German hospitals. *The Journal of hospital infection.* 1998;38(1):37-49.
6. Danchaivijitr S, Tangtrakool T, Chokloikaew S. The Second Thai National Prevalence Study on Nosocomial Infections 1992. *Journal of the Medical Association of Thailand* 1995;78 Suppl 2:S67-72.
7. Kim JM, Park ES, Jeong JS, Kim KM, Kim JM, Oh HS, et al. Multicenter surveillance study for nosocomial infections in major hospitals in Korea. Nosocomial Infection Surveillance Committee of the Korean Society for Nosocomial Infection Control. *American journal of infection control.* 2000;28(6):454-8.
8. Raymond J, Aujard Y. Nosocomial infections in pediatric patients: a European, multicenter prospective study. European Study Group. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America.* 2000;21(4):260-3.
9. Pittet D, DMS, Harbarth S, Ruet C, Francioli P, Sudre P, Pétignat C, et al. Prevalence and Risk Factors for Nosocomial Infections in Four University Hospitals in Switzerland *Infection Control and Hospital Epidemiology.* 1999;20(1):37-42.
10. Gikas A, Pediaditis I, Roubelaki M, Troulakis G, Romanos J, Tselentis Y, et al. Repeated multi-centre prevalence surveys of hospital-acquired infection in Greek hospitals. *Journal of Hospital Infection.* 1999;41(1):11-8.
11. Scheel O, Stormark M. National prevalence survey on hospital infections in Norway. *The Journal of hospital infection.* 1999;41(4):331-5.
12. Valinteliene R, Jurkuvenas V, Jepsen OB. Prevalence of hospital-acquired infection in a Lithuanian hospital. *The Journal of hospital infection.* 1996;34(4):321-9.
13. Orrett FA, Brooks PJ, Richardson EG. Nosocomial infections in a rural regional hospital in a developing country: infection rates by site, service, cost, and infection control practices. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America.* 1998;19(2):136-40.
14. World Health Organization. *Antimicrobial Resistance: Global Report on surveillance* 2014.
15. Bush K. Bench-to-bedside review: The role of  $\beta$ -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Bush critical care.* 2010;14:224.
16. World Health Organization. *Resistance to antibacterial drugs. Antimicrobial Resistance: Global Report on surveillance* 2014. p. 1.
17. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews.* 2005;18(4):657-86.
18. Silver LL. Challenges of antibacterial discovery. *Clinical microbiology reviews.* 2011;24(1):71-109.

19. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *The New England journal of medicine*. 2010;362(19):1804-13.
20. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983;11(6):315-7.
21. World Health Organization. Antimicrobial use and antimicrobial resistance. Prevention of hospital-acquired infections: A practical guide. 122002.
22. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews*. 2010;23(1):160-201.
23. Bush K, G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. A functional classification for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995;39:1211-33.
24. Rasmussen BA, and K. Bush. Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997;41:223-32.
25. Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A  $\beta$ -lactamases. *The Biochemical journal*. 1991;276 ( Pt 1):269-70.
26. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(3):969-76.
27. Ambler RP. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1980;289(1036):321-31.
28. Jaurin B, Grundstrom T. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of  $\beta$ -lactamases of the penicillinase type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(8):4897-901.
29. Huovinen P, Huovinen S, Jacoby GA. Sequence of PSE-2  $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1988;32(1):134-6.
30. Thomson KS. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(4):1019-25.
31. Varela C, Oliver A, Coque TM, Baquero F, Canton R. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in group-1  $\beta$ -lactamase-producing isolates. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2001;7(5):278-82.
32. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*. 1965;208(5007):239-41.
33. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1991;35(9):1697-704.
34. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003;47(11):3554-60.
35. Huang ZM, Mao PH, Chen Y, Wu L, Wu J. Study on the molecular epidemiology of SHV type  $\beta$ -lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi*. 2004;25(5):425-7.
36. Poirel L, Lebessi E, Castro M, Fevre C, Foustoukou M, Nordmann P. Nosocomial outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(6):2277-9.
37. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related  $\beta$ -lactamase CTX-M-3. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2002;50(6):1031-4.

38. Sturenburg E, Kuhn A, Mack D, Laufs R. A novel extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-23 with a P167T substitution in the active-site omega loop associated with ceftazidime resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2004;54(2):406-9.
39. Baraniak A, Fiett J, Hryniewicz W, Nordmann P, Gniadkowski M. Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) in Poland. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2002;50(3):393-6.
40. Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Jin YT, Wu JJ. Dissemination of CTX-M-3 and CMY-2  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in southern Taiwan. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(12):4320-5.
41. Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(2):602-4.
42. Miro E, Navarro F, Mirelis B, Sabate M, Rivera A, Coll P, et al. Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamases at a University Hospital in Barcelona, Spain, over a 3-year period. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(12):3991-4.
43. Alobwede I, M'Zali FH, Livermore DM, Heritage J, Todd N, Hawkey PM. CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase arrives in the UK. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003;51(2):470-1.
44. Brenwald NP, Jevons G, Andrews JM, Xiong JH, Hawkey PM, Wise R. An outbreak of a CTX-M-type  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: the importance of using cefpodoxime to detect extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003;51(1):195-6.
45. Livermore DM, Hawkey PM. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005;56(3):451-4.
46. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(6):1211-33.
47. Poirel L, Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(2):447-53.
48. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994;38(1):104-14.
49. Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, Danziger LH, Karam G, Quinn JP. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2003;289(7):885-8.
50. Luzzaro F, Mantengoli E, Perilli M, Lombardi G, Orlandi V, Orsatti A, et al. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(5):1865-70.
51. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E, et al. Characterization of  $\beta$ -lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A  $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996;40(3):616-20.
52. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999;43(3):573-81.
53. Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat C, Fennewald M, et al. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(1):175-82.
54. Naas T, Poirel L, Karim A, Nordmann P. Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters*. 1999;176(2):411-9.

55. Tribuddharat C, Fennewald M. Integron-mediated rifampin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999;43(4):960-2.
56. Jiang X, Ni Y, Jiang Y, Yuan F, Han L, Li M, et al. Outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3  $\beta$ -lactamase in China. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(2):826-31.
57. Poirel L, Rotimi VO, Mokaddas EM, Karim A, Nordmann P. VEB-1-like extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, Kuwait. *Emerging infectious diseases*. 2001;7(3):468-70.
58. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(3):622-32.
59. Dubois V, Poirel L, Marie C, Arpin C, Nordmann P, Quentin C. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla(GES-1) and a fused product of aac3-lb/aac6'-lb' gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(3):638-45.
60. Duarte A, Boavida F, Grosso F, Correia M, Lito LM, Cristino JM, et al. Outbreak of GES-1  $\beta$ -Lactamase-Producing Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a University Hospital in Lisbon, Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003;47(4):1481-2.
61. Poirel L, Brinas L, Fortineau N, Nordmann P. Integron-encoded GES-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(8):3593-7.
62. Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, Gales AC, Jones RN. Emergence of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(6):2344-5.
63. Pasteran F, Faccone D, Petroni A, Rapoport M, Galas M, Vazquez M, et al. Novel variant (bla(VIM-11)) of the metallo- $\beta$ -lactamase bla(VIM) family in a GES-1 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(1):474-5.
64. Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, Park YJ, Lee K, Bae IK, et al. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005;56(4):698-702.
65. Wachino J, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T, et al. Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class a  $\beta$ -lactamase, GES-3, in a neonatal intensive care unit in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(6):1960-7.
66. Jacoby GA. AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(1):161-82, Table of Contents.
67. Livermore DM, Woodford N. The  $\beta$ -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in microbiology*. 2006;14(9):413-20.
68. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2002;8(6):321-31.
69. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2006;57(3):373-83.
70. Frere JM, Galleni M, Bush K, Dideberg O. Is it necessary to change the classification of  $\beta$ -lactamases? *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005;55(6):1051-3.
71. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clinical microbiology reviews*. 2007;20(3):440-58, table of contents.

72. Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C, et al. Characterization of IMI-1  $\beta$ -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996;40(9):2080-6.
73. Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a  $\beta$ -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1990;34(5):755-8.
74. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1991;35(1):147-51.
75. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG. ARI 1:  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents*. 1993;2(2):81-7.
76. Scaife W, Young HK, Paton RH, Amyes SG. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1995;36(3):585-6.
77. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(4):1151-61.
78. Turner PJ. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;41 Suppl 4:S273-5.
79. Pitton JS. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Ergebnisse der Physiologie Reviews of Physiology, Volume 65. Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie*. 65: Springer Berlin Heidelberg; 1972. p. 15-93.
80. European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011*.
81. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious Diseases*. 2013;13(9):785-96.
82. World Health Organization. *The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action*. 2012.
83. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? *The Lancet Infectious Diseases*. 2011;11(5):381-93.
84. World Health Organization. *WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food: Report of a WHO Consultation with the participation of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the Office International des Epizooties*. 2000 5-9 June.
85. World Health Organization. *Second Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Management options*-15-18 March 2004, Oslo, Norway. 2004.
86. World Health Organization. *Joint FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials. Report of a meeting held in FAO, Rome, Italy, 26-30 November 2007* 2007.
87. World Health Organization. *Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment*- Geneva, December 1-5, 2003 2004.
88. Geneva World Health Organization. *WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance*. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.22001.
89. Geneva World Health Organization. *World Health Day 2011: Policy briefs*. 2011.
90. Direção-Geral da Saúde. *Portugal- controlo da infeção e resistências aos antimicrobianos em números*-2013 2013.
91. Direção Geral da Saúde Departamento da Qualidade na Saúde. *Relatorio: Campanha Nacional de Higiene das Mãos* 2010-2011.

92. Dallenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(3):490-5.
93. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(12):4281-3.
94. Bogaerts P, Rezende de Castro R, de Mendonca R, Huang TD, Denis O, Glupczynski Y. Validation of carbapenemase and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase multiplex endpoint PCR assays according to ISO 15189. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(7):1576-82.
95. Manageiro V, Ferreira E, Pinto M, Canica M. First Description of OXA-48 Carbapenemase Harbored by *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* from a Single Patient in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(12):7613-4.
96. Pai H, Kang CI, Byeon JH, Lee KD, Park WB, Kim HB, et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(10):3720-8.
97. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(6):2153-62.
98. Zboromyrska Y, Ferrer-Navarro M, Marco F, Vila J. Detection of antibacterial resistance by MALDI-TOF mass spectrometry. *Revista espanola de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia*. 2014;27(2):87-92.
99. Oviano M, Fernandez B, Fernandez A, Barba MJ, Mourino C, Bou G. Rapid detection of enterobacteriaceae producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014.
100. Seifert H. The clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;48 Suppl 4:S238-45.
101. Micek ST, Welch EC, Khan J, Pervez M, Doherty JA, Reichley RM, et al. Empiric combination antibiotic therapy is associated with improved outcome against sepsis due to Gram-negative bacteria: a retrospective analysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(5):1742-8.

Anexo(s)

Anexo 1: Estirpes produtoras de CTXM-1, caracterizadas no CHP.

ID	Estirpe	Data	Serviço	Idade*	Produto	Diagnóstico
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14/02/2012	Urgência Geral/HSA	72	Urina	Dispneia, pneumonia
6	<i>Escherichia coli</i>	13/02/2012	CE Transplantes Renais(NEFRO)/HSA	66	Urina	Transplante renal
15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28/11/2012	CE Pos-transplante hepático/HSA	63	Urina	Transplante hepático
36	<i>Escherichia coli</i>	04/05/2013	Urgência Geral/ SO	83	Sangue	Febre
39	<i>Escherichia coli</i>	06/04/2013	Urgência Geral/ SO	83	Sangue	Febre e prostração
42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21/07/2013	Medicina A	90	Urina	Rastreo séptico
44	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26/07/2013	Internamento Fisiatria /HSA	65	Urina	Infeção do trato urinário
48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12/09/2013	Serviço de Urgência	95	Urina	Infeção trato urinário
49	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23/09/2013	Internamento Neurologia/HSA	85	Urina	Infeção do trato urinário
51	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12/10/2013	Internamento Neurocirurgia/HSA	62	Urina	Retenção Urinaria com Algalições frequentes; ITU Recente com <i>E. coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>
54	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13/10/2013	SCI_Cuidados Intermédios	71	Urina	Hemorragia sub-dural pós traumática

Anexo 1: Estirpes produtoras de CTXM-1, caracterizadas no CHP.

55	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24/10/2013	Cirurgia 3	71	Liquido peritoneal	Peritonite terciária
56	<i>Escherichia coli</i>	28/10/2013	Internamento fisioterapia ASIA A	80	Urina	Paraplegia
60	<i>Escherichia coli</i>	14/11/2013	Urologia	72	Pus de abscesso	Choque séptico por peritonite com abscesso
63	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11/05/2013	CE Transplantes Renais(NEFRO)/HSA	39	Urina	Transplante Reno- pancreático
71	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	27/01/2014	CE Transplantes Renais	30	Urina	Transplante Renal
82	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25/01/2014	Internamento Nefrologia/HSA	23	Urina	Tansplante Renal
85	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11/02/2014	CE Transplantes Renais(NEFRO)/HSA	62	Urina	Transplante Renal
86	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10/02/2014	Ce Transplantes Renais(NEFRO)/ HSA	49	Urina	Transplante Renal
115	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	03/07/2014	Internamento T.C.E	79	Urina	HSD agudo interhemisférico
119	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25/02/2014	Urgência Geral	60	Sangue	Transplante renal + sintoma febril (antecedente recente de ITU e rabdomiólise grave)
121	<i>Klebsiella</i>	18/03/2014	CE Transplantes renais	23	Urina	Tranplante Renal

Anexo 1: Estirpes produtoras de CTXM-1, caracterizadas no CHP.

	<i>pneumoniae</i>					
127	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25/03/2014	CE Transplantes renais	54	Urina	Transplante Renal
132	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	09/04/2014	Internamento Cardiologia/HSA	88	Urina	Infeção do trato urinário (suspeita)
136	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10/03/2014	CE Transplantes Renais(NEFRO)/HSA	54	Urina	Transplante Renal
137	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10/03/2014	CE Transplantes Renais(NEFRO)/HSA	54	Urina	Transplante Renal
139	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28/04/2014	Internamento Nefrologia/HSA	42	Urina	Febre. Drenagem abundante por dreno abdominal
143	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28/04/2014	Internamento Nefrologia/HSA	42	Urina	Transplante Renal
149	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	02/05/2014	CE pós- transplante hepático/HSA	64	Urina	Transplante Hepático
163	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17/06/2014	CE Transplantes Renais(NEFRO)/HSA	23	Urina	Transplante Renal

ID, Identificação do isolado

CE, Consulta externa

ITU, infeção do trato urinário

SO, Serviço de observações

\*Idade do doente à data de colheita

Anexo 2: Estirpes produtoras de TEM, caracterizadas no CHP.

ID	Estirpe	Data	Serviço	Idade	Produto	Diagnóstico
23	<i>Escherichia coli</i>	06/02/2013	Internamento Cirurgia vascular	64	Urina	IRC em HD: Febre
28	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	05/03/2013	Internamento Urologia	50	Urina	Transplante Renal
31	<i>Proteus mirabilis</i>	15/04/2013	Internamento Ortopedia	76	Urina	Controlo Pós revisão PTJ com vômitos e disúria
32	<i>Proteus mirabilis</i>	15/04/2013	Internamento Medicina C	88	Secreção respiratória	Sepsis
35	<i>Escherichia coli</i>	30/04/2013	Atendimento pediátrico referenciado	13	Urina	Infeção do trato urinário
40	<i>Escherichia coli</i>	06/08/2013	Urgência Geral/SO	84	Urina	Hematúria de cheiro ativo, febre, dor abdominal generalizada
42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21/07/2013	Medicina A	90	Urina	Rastreio Séptico
44	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26/07/2013	Internamento Fisiatria /HSA	65	Urina	Infeção do trato urinário
45	<i>Escherichia coli</i>	28/7/2013	Internamento Neonatal cuidados especiais/MJD	6 D	Sangue	Prematuro
48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12/09/2013	Serviço Urgência	95	Urina de algália	Infeção do trato urinário

Anexo 2: Estirpes produtoras de TEM, caracterizadas no CHP.

81	<i>Escherichia coli</i>	07/02/2014	Internamento Fisiatria	58	Secreção respiratória	Infeção respiratória
114	<i>Ent. Cloacae</i>	03/04/2014	Internamento Neurologia	90	Urina	Provável infecção do trato urinário
124	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24/03/2014	Internamento SCI Pediátrico	2M	Secreção respiratória	Infeção respiratória
133	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10/03/2014	CE Transplantes Renais(NEFRO)/HSA	54	Urina	Transplante Renal
135	<i>Escherichia coli</i>	19/04/2014	Urgência Geral/SO	72	Urina	Infeção do trato urinário
140	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16/04/2014	Internamento Neurologia /HSA	90	Urina	Febre e SIRS; ITU prévia por E.coli MS
141	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16/04/2014	Internamento Neurologia /HSA	90	Urina	Febre e SIRS; ITU prévia por E.coli MS
156	<i>Escherichia coli</i>	22/06/2014	Internamento Pediatria/ HSA	1M	Urina	Febre sem lactente de um mês com dilatação PC
163	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17/06/2014	CE Transplantes Renais(NEFRO)/HSA	23	Urina	Transplante Renal
176	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23/07/2014	Internamento Cirurgia 1/HSA	78	Secreção respiratória	2º dia pós-operatório de reconstrução de trânsito intestinal; insuficiência respiratoria hipoxêmica + roncosp auscultatórios

Anexo 2: Estirpes produtoras de TEM, caracterizadas no CHP.

---

177	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24/07/2014	CE Transplantes Renais(NEFRO)/HSA	62	Urina	Transplante Renal
-----	------------------------------	------------	-----------------------------------	----	-------	-------------------

---

ID, Identificação do isolado

CE, Consulta externa

ITU, infeção do trato urinário

SO, Serviço de observações

MJD, Maternidade Júlio Dinis

\*Idade do doente à data de colheita

Anexo 3: Estirpes produtoras de SHV, caracterizadas no CHP.

ID	Estirpe	Data	Serviço	Idade	Produto	Diagnóstico
11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5/10/2012	Internamento Fisiatria	55	Urina	Febre nosocomial em doente internado por AVC
17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	01/01/2013	Internamento SCI- Unidade Cuidados Intensivos/HSA	49	Sangue	Sepsis severa
18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	04/01/2013	Internamento Medicina A/HSA	76	Urina	Infeção respiratória; febre
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19/01/2013	Internamento Medicina B/HSA	86	Urina	PAC + ITU nosocomial
22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	06/02/2013	CE Transplantes Renais(NEFRO)/HSA	46	Urina	Transplante renal
24	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	07/02/2013	Urgência Geral/ SO	76	Urina	Febre
42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21/07/2013	Medicina A	90	Urina	Rastreio Séptico
43	<i>Escherichia coli</i>	25/07/2013	Internamento Ortopedia/HSA	90	Sangue	Dispneia; Infeção Respiratória Nosocomial; Febre
44	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26/07/2013	Internamento Fisiatria	65	Urina	Infeção do Trato Urinário
48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12/09/2013	Serviço de Urgência	95	Urina de algália	Infeção do Trato Urinário
124	<i>Klebsiella</i>	24/03/2014	Internamento SCI	2M	Secreção	Infeção respiratória

Anexo 3: Estirpes produtoras de SHV, caracterizadas no CHP.

<i>pneumoniae</i>			Pediátrico		respiratória	
<b>133</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10/03/2014	CE Transplantes Renais(NEFRO)/HSA	54	Urina	Transplante Renal
<b>157</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26/06/2014	Internamento SCI-Unidade Cuidados intensivos /HSA	60	Urina	Infeção respiratória
<b>163</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17/06/2014	CE Transplantes Renais(NEFRO)/HSA	23	Urina	Transplante Renal
<b>176</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23/07/2014	Internamento Cirurgia 1/HSA	78	Secreção respiratória	2º dia pós-operatório de reconstrução de trânsito intestinal; insuficiência respiratória hipoxémica + roncosp auscultatórios

ID, Identificação do isolado

CE, Consulta externa

ITU, infeção do trato urinário

SO, Serviço de observações

\*Idade do doente à data de colheita

Anexo 4: Estirpes produtoras de Carbapenemases, caracterizadas no CHP.

ID	Estirpe	Data	Serviço	Idade	Produto	Diagnóstico
34	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	26/04/2013	Serviço de Urgência	93	Urina	Desorientação
42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21/07/2013	Medicina A	90	Urina	Rastreo Séptico
44	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26/07/2013	Internamento Fisiatria	65	Urina	Infeção do Trato Urinário
48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12/09/2013	Serviço de Urgência	95	Urina de algália	Infeção do Trato Urinário
84	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	11/02/2014	CE Urologia/HSA	54	Urina	Litíase Renal
111	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	20/12/2013	Internamento Cirurgia 3/HSA	73	bílis	Tumor de klatskin tipo IV; Febre
131	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	4/03/2014	Urgência Geral/SO	72	Sangue	Colangite (Febre e hepatite após colangiografia)
148	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	16/12/2013	Internamento SCI Pediátrico/HSA	5M	Exsudado	Orifício PEG com exsudado
153	<i>Pseudomona putida</i>	22/05/2014	Internamento Nefrologia/HSA	62	Líquido de drenagem	Ferida cirúrgica em transplante Renal

#### Anexo 4: Estirpes produtoras de Carbapenemases, caracterizadas no CHP.

ID, Identificação do isolado

CE, Consulta externa

ITU, infecção do trato urinário

SO, Serviço de observações

\*Idade do doente à data de colheita