



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia  
2008

**Daniela Filipa  
Martins Gonçalves**

**$\beta$ -lactamases de espectro alargado em  
*Enterobacteriaceae* da flora fecal de idosos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Helena Maria Neto Ferreira de Sousa, Professora Auxiliar do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e co-orientação científica da Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dissertação de **Mestrado de Microbiologia**  
Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Orientador

**Professora Doutora Helena Maria Neto Ferreira de Sousa**  
Professora Auxiliar do Serviço de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da  
Universidade do Porto

Co-Orientador

**Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida**  
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **o júri**

**Prof. Doutor António Carlos Matias Correia**

Professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof<sup>a</sup>. Doutora Helena Maria Neto Ferreira de Sousa**

Professora auxiliar do Serviço de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

**Prof<sup>a</sup>. Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida**

Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof<sup>a</sup>. Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso**

Professora auxiliar do Serviço de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

## **agradecimentos**

A minha gratidão à Professora Doutora Helena Neto Ferreira de Sousa, orientadora deste trabalho, por me ter recebido no Serviço de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pelo modo empenhado e estimulante com que acompanhou todas as fases do trabalho, a constante disponibilidade, o estímulo, os conhecimentos transmitidos, orientação científica, sugestões e críticas que permitiram enriquecer imensamente a minha formação académica. As palavras de conforto nos momentos mais difíceis jamais serão esquecidas.

À Professora Doutora Adelaide Almeida, co-orientadora deste trabalho da Universidade de Aveiro, agradeço toda a disponibilidade, ajuda, orientações, materiais, bem como ter permitido a colaboração com a Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Ao Serviço de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por ter disponibilizado materiais e equipamentos necessários à realização deste trabalho.

Um sincero agradecimento a todos os lares de idosos que colaboraram com o estudo e gentilmente autorizaram a recolha das amostras. Aos seus directores, equipas médicas, de enfermagem e auxiliares, e aos residentes, o meu obrigada.

À Cristina Pinto da Costa e Nuno Oliveira, técnicos do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, obrigada pela ajuda, disponibilidade, apoio e presença amiga.

À Joana Rocha e Ana Sofia Pedrosa, as primeiras colegas do início desta caminhada. À Manuela Reguengos e Marina Barros, pela ajuda, incentivo e companhia nas longas horas de trabalho.

À Glorinha e aos meus amigos, pelas palavras de amizade que deram conforto e força.

Ao amor incondicional e apoio dos meus pais e irmã, à inesgotável paciência que tiveram comigo.

***A todos muito Obrigada.***

**palavras-chave**

Beta-lactamases de espectro alargado, disseminação da resistência aos antibióticos, lares de idosos, comunidade, colonização fecal, prestação de cuidados de saúde, controlo de infecção.

**resumo**

A actual situação do envelhecimento das populações e a proliferação de unidades de cuidados de geriatria é uma realidade em expansão. Estas unidades constituem nichos particulares da comunidade no que respeita à disseminação de resistência aos antibióticos podendo considerar-se como reservatórios de estirpes resistentes aos antibióticos. Esta é uma realidade que tem vindo a merecer a atenção da comunidade científica internacional mas ainda pouco divulgada no nosso País.

O presente estudo teve como objectivo a detecção de *Enterobacteriaceae* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (BLEA) colonizadoras do tracto intestinal de residentes em lares de idosos da zona norte do País.

Nas 184 amostras de fezes, provenientes de residentes autónomos e dependentes de seis lares de idosos da zona norte do País, detectaram-se 58 isolados de *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA, das espécies *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* e dos géneros *Klebsiella spp* e *Enterobacter spp*.

Nos lares de idosos com mais residentes dependentes registou-se maior número de isolados produtores de BLEA, comparativamente aos lares com maior número de residentes autónomos. A incidência de estirpes produtoras de BLEA detectada em cada lar de idosos, parece depender de características dos residentes em termos de dependência funcional e história de internamento em unidades hospitalares, bem como do tratamento antimicrobiano a que estão sujeitos.

Nos isolados produtores de BLEA detectados no estudo verificou-se um predomínio de  $\beta$ -lactamases, com pontos isoeléctricos (pI) característicos de 5,4 e superior a 8,0, estando o fenótipo de BLEA associado principalmente a  $\beta$ -lactamases de pI superior a 8,0. Os genes de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos podem ser transferidos por processos de transferência horizontal, através de elementos genéticos móveis, como por exemplo plasmídeos conjugativos, como foi possível demonstrar através de conjugação.

O estudo permitiu verificar que os lares de idosos representam um nicho particular da comunidade que poderá funcionar como reservatório de estirpes e genes de

resistência aos antibióticos, particularmente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. A colonização intestinal de residentes de lares de idosos por *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA é uma realidade com papel preponderante na disseminação destas estirpes bacterianas.

Os lares de idosos assumem-se como unidades de prestação de cuidados de saúde da comunidade, devido às necessidades de prestação de cuidados de saúde aos residentes, particularmente os mais debilitados. É um ambiente relevante na disseminação da resistência a antibióticos, podendo considerar-se importante na introdução de estirpes resistentes aos antibióticos no ambiente hospitalar. O estudo alerta para a necessidade de medidas de controlo de infecção adequadas na prestação de cuidados de saúde aos residentes de lares de idosos.

**keywords**

Extended-Spectrum Beta-Lactamase, nursing homes, antimicrobial resistance dissemination, faecal colonization, healthcare, infection control

**abstract**

The current situation of population aging and the proliferation of Geriatric care facilities is a reality in expansion. Those institutions might be considered as antimicrobial resistant strains reservoirs, playing an important role in antimicrobial resistance dissemination. This reality has been addressed internationally, but in our country this reality was deserved little divulgation.

The aim of our study was the detection of *Enterobacteriaceae* producing Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) colonizing the intestinal tract of nursing home residents in the Northern area of our Country.

In the 184 samples of faeces from independent and dependent residents of six nursing homes in the north of Portugal, 58 isolates of *Enterobacteriaceae* producing ESBL were detected, the species of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Klebsiella spp* and *Enterobacter spp*.

Nursing homes with more dependent residents showed more isolates producing ESBL, compared to nursing homes with the highest number of autonomous residents. The incidence of ESBL producing strains detected in each nursing home seems to depend on characteristics of residents in terms of functional dependence and history of hospitalization, and the instituted antimicrobial treatment.

Among ESBL producers isolated the study there was a predominance of  $\beta$ -lactamases, with characteristic isoelectric points of 5.4 and above 8.0. Genes for resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics can be transferred horizontally transferred through mobile genetic elements, such as conjugative plasmids, as demonstrated by conjugation.

The study has shown that the nursing homes represent a particular niche of the community that could serve as a reservoir of resistant strains and antibiotic resistance genes, particularly to the  $\beta$ -lactam antibiotics. The intestinal colonization of residents of nursing homes by ESBL producing *Enterobacteriaceae* is a reality with leading role in the spread of these

bacterial strains.

The nursing homes assume themselves as health care units of the community, because the needs of health care delivery to residents, particularly the weakened ones. This might be considered a namely in the introduction of antimicrobial resistant strains to the hospitals. The study points out the need of adequate infection control measures in the health care of nursing home residents.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>XII</b>
<b>SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	<b>XIII</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1 – <i>Enterobacteriaceae</i>	15
2 – Antibióticos $\beta$ -lactâmicos	16
3 – Mecanismos de Resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos	17
3.1 - Resistência mediada por $\beta$ -lactamases	17
3.1.1 - Classificação das $\beta$ -lactamases	18
3.2 - Disseminação da Resistência aos antibióticos	21
4 – $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado	21
4.1 - $\beta$ -lactamases do tipo TEM	23
4.2 - $\beta$ -lactamases do tipo SHV	24
4.3 - $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M	24
4.4 - $\beta$ -lactamases do tipo OXA	26
4.5 - Outros tipos de BLEA	27
5 – Outros tipos de $\beta$ -lactamases	27
5.1 - $\beta$ -lactamases resistentes aos inibidores	27
5.2 - $\beta$ -lactamases não BLEA	28
6 – Epidemiologia das <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de BLEA	29
7 – $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado: Hospital, Comunidade e Lares de Idosos	32
7.1 - Colonização do Tracto Intestinal	32
7.2 - Ambiente Hospitalar e Comunidade	33
7.3 - Lares de Idosos	34
7.4 - Factores de Risco	36
7.5 - Medidas de Controlo	37
7.6 - Tratamento	38
8 – Origem das BLEA: Hospital ou Comunidade?	39
9 – Detecção de espécies produtoras de BLEA	43
<b>OBJECTIVO</b>	<b>45</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>47</b>
1 – Amostras Biológicas	48
1.1 - Colheita, Transporte e Acondicionamento das Amostras	48
2 – Processamento das Amostras Biológicas	48
2.1 - Preparação das soluções de antibiótico	49
2.2 - Estirpe Controlo	50
2.3 - Identificação das Espécies Bacterianas	50
2.4 - Conservação das Espécies Bacterianas	50
3 – Avaliação da Susceptibilidade aos Agentes Antimicrobianos	51
3.1 - Determinação da susceptibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em agar	51
3.2 - Antibióticos utilizados	51
4 – Detecção de BLEA	52
5 – Detecção de Outros Mecanismos de resistência: metalo- $\beta$ -lactamases	53
6 – Caracterização Bioquímica das $\beta$ -lactamases	53
6.1 - Preparação do Extracto Bruto	53
6.2 - Avaliação Prévia do Extracto Bruto	54
6.3 - Determinação do Ponto Isoeléctrico das $\beta$ -lactamases	54

7 – Transferência de genes de resistência por Conjugação Bacteriana	55
7.1 - Selecção das espécies dadoras	55
7.2 - Controlo do ensaio	55
7.3 - Conjugação bacteriana	56
7.4 - Selecção dos transconjugantes e confirmação de presença da BLEA	56
<b>RESULTADOS</b>	<b>57</b>
1 – Caracterização dos lares de Idosos	59
2 – Contagem de UFC/mL nos meios de cultura de MacConkey e MacConkey selectivo com antibiótico $\beta$ -lactâmico	60
2.1 - Lar FFUP1	62
2.2 - Lar FFUP2	62
2.3 - Lar FFUP3	63
2.4 - Lar FFUP4	65
2.5 - Lar FFUP5	66
2.6 - Lar FFUP6	68
3 – Determinação da Susceptibilidade aos Agentes Antimicrobianos e Detecção de BLEA	69
3.1 - Susceptibilidade aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos e detecção de BLEA	70
3.1.1 - Lar FFUP1	76
3.2.2 - Lar FFUP2	77
3.3.3 - Lar FFUP3	77
3.1.4 - Lar FFUP4	78
3.1.5 - Lar FFUP5	78
3.1.6 - Lar FFUP6	79
3.2 - Confirmação da presença de BLEA	80
3.2 - Ponto Isoeléctrico dos isolados produtores de BLEA	82
4 – Resistência aos antibióticos não $\beta$ -lactâmicos	83
5 – Transferência de genes de resistência a antibióticos $\beta$ -lactâmicos	84
6 – Outros mecanismos de Resistência: metalo- $\beta$ -lactamases	87
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>89</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>100</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>102</b>
<b>MANUSCRITO DE ARTIGO CIENTÍFICO – LETTER</b>	<b>104</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>109</b>
<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura química dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. I - penicilinas; II - cefalosporinas; III - monobactâmicos; IV - carbapenemos; A - anel  $\beta$ -lactâmico (Sousa, 2006). 16
- Figura 2 - Parede celular de Gram negativo (Livermore *and* Woodford, 2006). 17
- Figura 3 - Representação da propagação dos genes de resistência aos antibióticos entre estirpes bacterianas diferentes (Levey *and* Marshall, 2004) 21
- Figura 4 - Exemplo de disseminação de estirpes produtoras de BLEA entre o ambiente hospitalar e comunidade (adaptado de <http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC438/decker/AntibioticRes/AntibioticResistance.html>). 40
- Figura 5 - Aspecto macroscópico do crescimento bacteriano em meio de MacConkey com antibiótico  $\beta$ -lactâmico de selecção. I - colónias fermentadoras da lactose em meio de MacConkey com cefotaxima (2 $\mu$ g/mL) proveniente do sobrenadante do caldo BHI; II - colónias fermentadoras da lactose em meio de MacConkey com ceftazidima (2 $\mu$ g/mL) proveniente do sobrenadante do caldo BHI; III - colónias fermentadoras da lactose em meio de MacConkey aztreonamo (2 $\mu$ g/mL) proveniente do sobrenadante do caldo BHI; IV - colónias fermentadoras da lactose em meio de MacConkey cefotaxima (2 $\mu$ g/mL) proveniente do sedimento do caldo BHI; V - colónias fermentadoras da lactose em meio de MacConkey ceftazidima (2 $\mu$ g/mL) proveniente do sedimento do caldo BHI; VI - colónias fermentadoras da lactose em meio de MacConkey aztreonamo (2 $\mu$ g/mL) proveniente do sedimento do caldo BHI. 61
- Figura 6 - Exemplos de testes de susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos pelo método de difusão em agar de produtores de BLEA isolados neste estudo. I - isolado FFUP517ctxsed1 (pI 5,4 + 7,4 + >8,0); II - isolado FFUP508atmsed1 (pI >8,0). 70
- Figura 7 - Teste de susceptibilidade do isolado FFUP105cazS1, *Citrobacter freundii* produtor de BLEA. I - colónias fermentadoras em meio de MacConkey com cefotaxima (2 $\mu$ g/mL); II - Sinergismo entre a associação amoxicilina e ácido clavulânico com ceftazidima, cefotaxima e aztreonamo. 76
- Figura 8 - Confirmação da BLEA pela adição de ácido clavulânico. I - Meio de cultura MacConkey selectivo com aztreonamo (2 $\mu$ g/mL); II - Teste de susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos com resistência ao aztreonamo e sensibilidade à cefotaxima, ceftazidima e cefepime; III - Confirmação da presença de BLEA com adição de ácido clavulânico ao disco de aztreonamo. 81
- Figura 9 - Exemplo de focagem isoeléctrica de isolados produtores de BLEA do lar FFUP5. 1 - padrão com  $\beta$ -lactamases do tipo TEM (5,4), SHV (7,6) e MIR-1 (8,4); 2 - isolado FFUP540atmS1; 3 - isolado FFUP542cazS1; 4 - isolado FFUP534atmS1; 5 - isolado FFUP537atmsed1; 6 - isolado FFUP538atmS1; 7 - isolado FFUP541cazsed1; 8 - isolado FFUP531impS3. 83
- Figura 10 - Detecção de metalo- $\beta$ -lactamase. I - Redução do halo de inibição do imipenemo no teste de susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos; II - Detecção de metalo- $\beta$ -lactamase inibida pelo EDTA (0,5M). IPM/EDTA - disco de imipenemo com 10 $\mu$ L de EDTA (0,5M); B - disco branco sem antibiótico e EDTA; B/EDTA - disco branco com EDTA(0,5M). 88

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Sistema de classificação de Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros	20
Tabela 2 - Amostras de fezes provenientes dos lares de idosos e respectivo número de isolados produtores de BLEA detectados	58
Tabela 3 - Resultado da contagem de UFC/mL nas amostras do lar FFUP1	62
Tabela 4 - Resultado da contagem de UFC/mL nas amostras do lar FFUP2	63
Tabela 5 - Resultado da contagem de UFC/mL nas amostras do lar FFUP3	64
Tabela 6 - Resultado da contagem de UFC/mL nas amostras do lar FFUP4	65
Tabela 7 - Resultado da contagem de UFC/mL nas amostras do lar FFUP5	66
Tabela 8 - Resultado da contagem de UFC/mL nas amostras do lar FFUP6	68
Tabela 9 - Fenótipo de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos dos isolados representativos produtores de BLEA dos seis lares de idosos estudados	72
Tabela 10 - Resultados da confirmação da presença de BLEA por adição de ácido clavulânico aos discos de oximino- $\beta$ -lactâmicos	81
Tabela 11 - Perfil dos pl's dos isolados produtores de BLEA detectados no estudo	82
Tabela 12 - Resultados da susceptibilidade dos isolados produtores de BLEA aos antibióticos não $\beta$ -lactâmicos	83
Tabela 13 - Transferência da BLEA e contagem de UFC de transconjugantes no ensaio de conjugação	84
Tabela 14 - Resultados do teste de susceptibilidade aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos e não $\beta$ -lactâmicos de isolados representativos do estudo e transconjugantes	86

## SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Grau Centígrado
µg	Micrograma
µL	Microlitro
AMC	Amoxicilina e Ácido Clavulânico
AML	Amoxicilina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonamo
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLEA	β-Lactamase de Espectro Alargado
C	Cloranfenicol
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTX	Cefotaxima
CXM	Cefuroxima
DDST	<i>Double Disc Synergy Test</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
F	Nitrofurantoína
FEP	Cefepime
FOX	Cefoxitina
H	Hora
IMP	Imipenemo
IRT	β-lactamase resistente aos Inibidores
ITU	Infecção do Tracto Urinário
M	Molar
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
NA	Ácido Nalidíxico
NET	Netilmicina
PBP	<i>Penicillin Binding Proteins</i>
pH	Inverso do logaritmo decimal da actividade de ião hidrogénio
pl	Ponto Isoeléctrico
Rpm	Rotação por minuto
S	Estreptomicina
TE	Tetraciclina
TSB	<i>Tryptic Soy Both</i>
UFC	Unidade Formadora de Colónia
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>

## **INTRODUÇÃO**

---

A produção de β-lactamases de espectro alargado (BLEA) em *Enterobacteriaceae*, problema emergente de saúde pública em todo o Mundo, representa um grande desafio para os profissionais de saúde, epidemiologistas e equipas de controlo de infecção (Ben-Ami *et al*, 2006; Pfaller *et al*, 2006; Harris *et al*, 2007; Fang *et al*, 2008; Moor *et al*, 2008). Esta é uma questão relevante nos ambientes de prestação de cuidados de saúde com internamento, devido às características dos pacientes, procedimentos médicos e técnicas invasivas de diagnóstico e terapêutica e à pressão selectiva com antibióticos β-lactâmicos (Owens *and* Rice, 2006).

Na comunidade, os lares de idosos, constituem importantes reservatórios de estirpes bacterianas produtoras de BLEA, como consequência das características inerentes aos residentes e prestadores de cuidados e contribui para o aparecimento e disseminação destas estirpes a outros ambientes (Bonomo, 2000; Mendelson *et al*, 2005).

## **1 – *Enterobacteriaceae***

A família *Enterobacteriaceae* compreende um grupo heterogéneo de bacilos de Gram negativo como os géneros *Escherichia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Morganella spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Serratia spp.*, *Providencia spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Yersinia spp.* entre outros (Murray *et al*, 2003).

As espécies desta família caracterizam-se por uma parede celular do tipo Gram negativo, não formadoras de esporos, imóveis ou móveis e anaeróbias facultativas. A fermentação da glucose, redução dos nitratos a nitritos e citocromo c oxidase negativo são as principais características comuns às espécies desta família bacteriana (Murray *et al*, 2003).

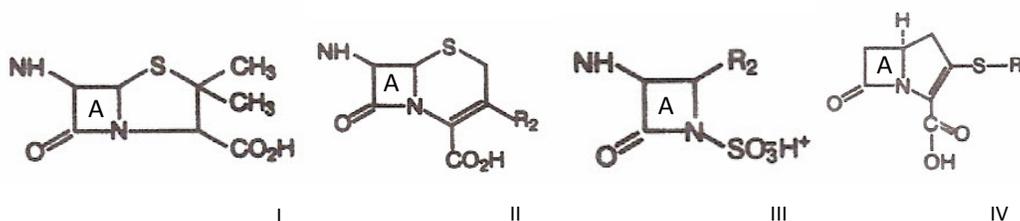
Encontram-se amplamente distribuídas na natureza e/ou colonizadoras, por exemplo do tracto intestinal do homem e animais. São importantes agentes patogénicos, possuem diversos factores de virulência, frequentemente implicados em processos infecciosos em ambiente hospitalar e na comunidade, como infecções do tracto urinário (ITU), pneumonias e infecções intra-abdominais (Murray *et al*, 2003; Rodríguez-Baño *et al*, 2006; Paterson, 2006).

A resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos emergente, particularmente a produção de BLEA, em espécies da família das *Enterobacteriaceae* tem sido alvo de uma constante e preocupante atenção (Paterson, 2006; Denton, 2007).

## 2 – Antibióticos $\beta$ -lactâmicos

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos constituem o grupo de agentes antimicrobianos mais importante com utilização terapêutica generalizada, na clínica hospitalar e ambulatório, devido à sua acção antimicrobiana, fraca toxicidade e características farmacocinéticas (Mascaretti, 2003; Sousa, 2006; Baquero *et al*, 2008).

Este grupo de antibióticos, com acção antipariental, agrupa quatro classes, nomeadamente: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos (Mascaretti, 2003; Sousa, 2006; Baquero *et al*, 2008). Estruturalmente, caracterizam-se pela estrutura cíclica denominada anel  $\beta$ -lactâmico, comum a todas as classes (figura 1), composto por três átomos de carbono e um de azoto com radicais substituintes. As diferenças nas classes deste grupo de antibióticos residem na constituição dos radicais substituintes do anel  $\beta$ -lactâmico (Mascaretti, 2003; Samaha-Kfoury *and* Araj, 2003; Sousa, 2006; Baquero *et al*, 2008).



**Figura 1** - Estrutura química dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. I - penicilinas; II - cefalosporinas; III - monobactâmicos; IV - carbapenemos; A - anel  $\beta$ -lactâmico (Sousa, 2006).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos actuam na fase final da biossíntese do peptidoglicano, constituinte essencial à sobrevivência da bactéria, pela inibição das enzimas responsáveis pela transpeptidação do peptidoglicano, as *Penicillin Binding Proteins* (PBP) (Mascaretti, 2003; Sousa, 2006; Baquero *et al*, 2008).

### 3 – Mecanismos de Resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos

A introdução de antibióticos na prática clínica permitiu o controlo efectivo de várias doenças infecciosas. No entanto, rapidamente diversas bactérias patogénicas se tornaram resistentes a esses agentes antimicrobianos (Sousa, 2006; Baquero *et al*, 2008; Hawkey, 2008).

Os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos compreendem: alteração do local de acção do antibiótico; hidrólise enzimática por acção das  $\beta$ -lactamases (figura 2); impermeabilização da membrana externa nos bacilos de Gram negativo e bombas de efluxo (Donskey, 2006; Sousa, 2006; Baquero *et al*, 2008).

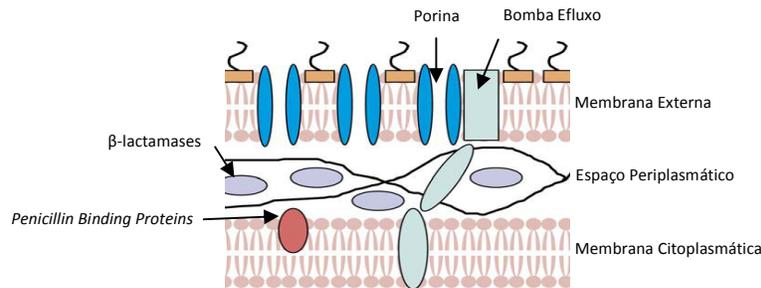


Figura 2 - Parede celular de Gram negativo (Livermore *and* Woodford, 2006).

#### 3.1 - Resistência mediada por $\beta$ -lactamases

A utilização indiscriminada dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos no tratamento das doenças infecciosas, em clínica hospitalar e na comunidade, contribuiu para a pressão selectiva levando ao aparecimento de bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases, particularmente em bacilos de Gram negativo (Sousa, 2006; Baquero *et al*, 2008). Da pluralidade de mecanismos de resistência antimicrobiana descritos, a produção de  $\beta$ -lactamases constitui o principal mecanismo de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, em bacilos de Gram negativo (Samaha-Kfoury *and* Araj, 2003; Bonnet, 2004; Jacoby *and* Munoz-Price, 2005; Sousa, 2006; Baquero *et al*, 2008; Pitout *and* Laupland, 2008).

O anel  $\beta$ -lactâmico presente nos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é indispensável à actividade antibacteriana, mas susceptível de ser hidrolisado irreversivelmente por hidrolases bacterianas, as  $\beta$ -lactamases, na ligação amida do anel, tornando-o inactivo (Mascaretti, 2003; Bonnet, 2004; Jacoby *and* Munoz-Price, 2005; Sousa, 2006; Baquero *et al*, 2008; Pitout *and* Laupland, 2008).

As  $\beta$ -lactamases, enzimas de origem cromossómica ou plasmídica, podem ser encontradas no espaço periplasmático da parede celular das bactérias de Gram negativo, enquanto nas bactérias com parede celular Gram positivo são produzidas e excretadas para o meio exterior (Samaha-Kfoury *and* Araj, 2003; Jacoby *and* Munoz-Price, 2005; Sousa, 2006).

Estas enzimas bacterianas apresentam afinidades diferentes para as distintas classes dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, sendo classificadas segundo a sua especificidade em penicilinasas, cefalosporinasas e carbapenemasas (Sousa, 2006; Perez *et al*, 2007). As  $\beta$ -lactamases são um grupo heterogéneo de enzimas, produzidas por diferentes espécies bacterianas, contudo uma espécie bacteriana específica pode produzir vários tipos de  $\beta$ -lactamases diferentes (Bradford, 2001; Sousa, 2006; Baquero *et al*, 2008).

O desenvolvimento de novos compostos químicos  $\beta$ -lactâmicos, estáveis à acção das hidrolases bacterianas, contribuiu para o aparecimento de novas variantes por mutação da estrutura clássica da referida enzima, como consequência da pressão exercida pelos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. A introdução dos antibióticos de amplo espectro de acção, os oximino- $\beta$ -lactâmicos, na terapêutica clínica para tratamento de infecções por *Enterobacteriaceae*, induziu a alteração das  $\beta$ -lactamases clássicas com o aparecimento e disseminação de novas  $\beta$ -lactamases, entre elas as BLEA (Bradford, 2001; Samaha-Kfoury *and* Araj, 2003; Sousa, 2006; Baquero *et al*, 2008).

### **3.1.1 - Classificação das $\beta$ -lactamases**

A descrição de inúmeros tipos de  $\beta$ -lactamases condicionou a necessidade da sua classificação, nem sempre de forma homogénea (Sousa, 2006). As primeiras classificações surgiram em 1970 por Jack e Richmond, consideraram o tipo de substrato e comportamento frente aos inibidores das  $\beta$ -lactamases. A classificação

molecular de Ambler e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros são as mais frequentemente utilizadas (Bush *et al*, 1995; Jacoby *and* Munoz-Price, 2005; Paterson *and* Bonomo, 2005; Sousa, 2006; Baquero *et al*, 2008).

Na classificação de Ambler (1980), as  $\beta$ -lactamases encontram-se agrupadas com base na estrutura primária da sequência de aminoácidos, em quatro classes moleculares: A, B, C e D. As  $\beta$ -lactamases da classe A e C, as mais comuns, e as da classe D são as serino- $\beta$ -lactamases, devido à presença de um grupo serina no centro activo da enzima. As  $\beta$ -lactamases da classe C e D incluem, respectivamente, as  $\beta$ -lactamases cromossómicas e as oxacilinas. Por sua vez, as da classe B englobam as metalo- $\beta$ -lactamases dependentes do zinco (Bush *et al*, 1995; Bradford, 2001; Fluit, 2001; Bonnet, 2004; Bradford *et al*, 2005; Jacoby *and* Munoz-Price, 2005; Paterson *and* Bonomo, 2005; Sousa, 2006; Baquero *et al*, 2008).

Bush-Jacoby-Medeiros (1995) classificam-nas atendendo à relação com o perfil de substratos e resposta aos inibidores das  $\beta$ -lactamases e inclui os novos tipos de  $\beta$ -lactamases. Este sistema de classificação caracteriza-se por quatro grupos principais de  $\beta$ -lactamases e vários subgrupos (Bush *et al*, 1995; Bradford, 2001; Fluit, 2001; Bonnet, 2004; Bradford *et al*, 2005; Jacoby *and* Munoz-Price, 2005; Paterson *and* Bonomo, 2005; Sousa, 2006; Baquero *et al*, 2008). A tabela I sistematiza as classificações de Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros.

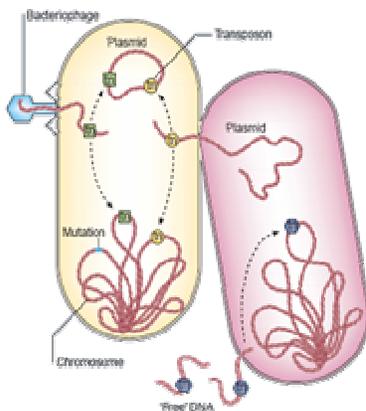
**Tabela 1** - Sistema de classificação de Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros

Bush-Jacoby-Medeiros	Subgrupo	Ambler	Inibição		Características
			Ácido Clavulânico	EDTA	
<b>Grupo 1</b> Cefalosporinas	—	C	-	-	Cefalosporinas cromossómicas não inibidas pelo ácido clavulânico
	2a	A	+	-	Penicilinas clássicas das bactérias de Gram-positivo
	2b	A	+	-	β-lactamase TEM-1, TEM-2, SHV-1 e β-lactamases cromossómicas de <i>Klebsiella spp.</i>
	2be	A	+	-	Enzimas capazes de hidrolisar as penicilinas e as cefalosporinas clássicas, bem como a cefotaxima, ceftazidima e aztreonam Inibidas pelo ácido clavulânico Compreende as BLEA plasmídicas
<b>Grupo 2</b> Penicilinas	2c	A	+	-	Carbencilinas
	2d	D	±	-	Oxacilinas que inactivam a cloxacilina
	2e	A	+	-	Cefalosporinas cromossómicas, inibidas por baixas concentrações de ácido clavulânico, e as cefalosporinas plasmídicas que hidrolisam a cefotaxima, com fraca acção hidrolítica face à penicilina Sensíveis ao ácido clavulânico
	2f	A	+	-	Carbapenemas (excepto as metaloenzimas)
	3a	B	-	+	Enzimas que hidrolisam as penicilinas Hidrolisam rapidamente o imipenem e as cefalosporinas
<b>Grupo 3</b> Metallo-β-lactamases	3b	B	-	+	Enzimas das espécies do género <i>Aeromonas spp.</i> , consideradas as verdadeiras carbapenemas Elevada capacidade para hidrolisar os carbapenemos
	3c	B	-	+	Metallo-β-lactamase em <i>Legionella gormanii</i> Elevada capacidade para hidrolisar as cefalosporinas e a ampicilina
<b>Grupo 4</b>	—		-	?	Penicilinas resistentes ao ácido clavulânico Escassa informação molecular

(adaptado de Bush *et al*, 1995; Sousa, 2006; Perez *et al*, 2007)

### 3.2 - Disseminação da Resistência aos antibióticos

A disseminação de determinantes de resistência aos antibióticos pode ocorrer directamente através da distribuição de espécies bacterianas resistentes, para diferentes ambientes ou, indirectamente, pela propagação horizontal dos genes de resistência (Levy and Marshall, 2004; Jacoby and Munoz-Price, 2005).



Os genes de resistência aos antibióticos podem ser transferidos para outras espécies e géneros bacterianos diferentes por processos de transferência horizontal de genes, através de elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposões e integrões, e através de bacteriófagos (figura 3) (Bonomo, 2000; Levy and Marshall, 2004; Jacoby and Munoz-Price, 2005; Owens and Rice, 2006).

**Figura 3** - Representação da propagação dos genes de resistência aos antibióticos entre estirpes bacterianas diferentes (Levey and Marshall, 2004)

### 4 – $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado

As BLEA descritas pela primeira vez em 1983 em bacilos de Gram negativo da família *Enterobacteriaceae* representam o mecanismo de resistência aos oximino- $\beta$ -lactâmicos mais significativo (Jacoby and Munoz-Price, 2005; Pitout *et al*, 2005; Sousa, 2006; Arpin *et al*, 2007; Baquero *et al*, 2008).

As BLEA, segundo a classificação molecular de Ambler, pertencem à classe A e D, correspondentes ao subgrupo 2be, segundo o sistema de classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros. As BLEA da classe A são inibidas pelos inibidores clássicos das  $\beta$ -lactamases como o ácido clavulânico, enquanto as da classe D são inibidas pela cloxacilina (tabela I) (Bradford, 2001; Bonnet, 2004; Bradford *et al*, 2005; Paterson and

Bonomo, 2005; Pitout *et al*, 2005; Perez *et al*, 2007). Na actualidade *experts* na área das BLEA sugeriram um novo esquema de classificação incluindo outras β-lactamases não classicamente reconhecidas como BLEA, passando a referir as que foram alvo do nosso estudo como BLEA da classe A restritas às de classe funcional 2be e classe molecular A, enzimas inibidas pela acção do ácido clavulânico com actividade em oximino-β-lactâmicos (Giske *et al*, 2008).

Este grupo heterogéneo de enzimas bacterianas de amplo espectro apresenta capacidade de conferir resistência aos antibióticos β-lactâmicos, nomeadamente às penicilinas, oximino-cefalosporinas e monobactâmicos, tornando-os inactivos. No entanto, incapazes de hidrolisar as cefamicinas e os carbapenemos, são inibidas pelos inibidores clássicos das β-lactamases, como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, particularidade utilizada na detecção laboratorial (Bradford, 2001; Stürenburg *and* Mack, 2003; Bradford *et al*, 2005; Paterson *and* Bonomo, 2005; Rodriguez-Baño *et al*, 2006; Pitout *et al*, 2005; Perez *et al*, 2007; Naas *et al*, 2008; Pitout *and* Laupland, 2008).

*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, espécies da família das *Enterobacteriaceae* são as principais produtoras de BLEA. No entanto, podem ser identificadas noutras espécies desta família, como em *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, no género *Enterobacter spp.* e *Salmonella spp.* e em espécies da família das *Pseudomonadaceae*, como *Pseudomonas aeruginosa* (Pitout *et al*, 2005; Pfaller *et al*, 2006; Peña *and* Pujol, 2007; Peña *et al*, 2008; Pitout *and* Laupland, 2008).

As BLEA são codificadas em genes localizados em plasmídeos responsáveis pela capacidade de transferência da resistência entre as mesmas e diferentes espécies bacterianas. Estes elementos genéticos móveis são os principais responsáveis pelo aparecimento de episódios de resistência, bem como permitem a rápida disseminação das espécies produtoras de BLEA entre unidades de prestação de cuidados de saúde como o hospital e instituições de saúde na comunidade, por exemplo os lares de idosos (Samaha-Kfoury *and* Araj, 2003; Stürenburg *and* Mack, 2003; Oteo *et al*, 2006, Fang *et al*, 2008).

A utilização indiscriminada dos antibióticos β-lactâmicos, particularmente os oximino-β-lactâmicos induz a contínua e dinâmica mutação das β-lactamases (Samaha-Kfoury

and Araj, 2003; Paterson and Bonomo, 2005). As BLEA derivam das  $\beta$ -lactamases clássicas: TEM (TEM-1, TEM-2) e SHV-1, pela substituição de aminoácidos no centro activo das  $\beta$ -lactamases. As principais famílias das BLEA incluem as TEM, SHV e CTX-M, este último tipo de enzima em grande expansão em todo o Mundo (Bradford, 2001; Samaha-Kfoury and Araj, 2003; Stürenburg and Mack, 2003; Paterson and Bonomo, 2005; Oteo *et al*, 2006; Arpin *et al*, 2007; McMullan *et al*, 2007).

A desmedida evolução das BLEA ao longo dos últimos anos, resulta no aparecimento de mais de 200 enzimas distintas classificadas em diferentes grupos, as quais se encontram caracterizadas no website <http://www.lahey.org/studies/webt.htm> (Bradford, 2001; Arpin *et al*, 2007; Pitout and Laupland, 2008; Hawkey, 2008).

#### 4.1 - $\beta$ -lactamases do tipo TEM

A  $\beta$ -lactamase TEM-1 descrita pela primeira vez em 1966 num isolado de *Escherichia coli* representa o principal mecanismo de resistência à ampicilina, cerca de 90% em bacilos de Gram negativo, especificamente em *Escherichia coli*. Esta  $\beta$ -lactamase de espectro de acção restrito, frequentemente encontrada, confere resistência às penicilinas e cefalosporinas de primeira geração mas não apresenta actividade frente às oximino-cefalosporinas (Bradford, 2001; Samaha-Kfoury and Araj, 2003; Stürenburg and Mack, 2003; Ali Shah *et al*, 2004; Paterson and Bonomo, 2005; Hawkey, 2008).

As  $\beta$ -lactamases da família TEM aparecem com maior frequência em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, mas pode ser encontrada noutros géneros de *Enterobacteriaceae*, como *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* e *Salmonella spp.* e em espécies não *Enterobacteriaceae*, como a TEM-42 em *Pseudomonas aeruginosa* (Samaha-Kfoury and Araj, 2003; Ali Shah *et al*, 2004). Estas  $\beta$ -lactamases, mediadas por plasmídeos, disseminam-se rapidamente entre diferentes espécies de *Enterobacteriaceae*. A disseminação deste tipo de  $\beta$ -lactamase a outras espécies não *Enterobacteriaceae*, tal como *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* já foi descrito (Stürenburg and Mack, 2003; Hawkey, 2008).

As  $\beta$ -lactamases TEM-1 e TEM-2 apresentam perfil de hidrólise aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semelhante, porém a TEM-2 aparece com menor frequência (Bradford, 2001; Ali Shah *et al*, 2004; Paterson *and* Bonomo, 2005). A  $\beta$ -lactamase TEM-2 deriva da substituição de um aminoácido na TEM-1. Mais de 100 variantes das  $\beta$ -lactamases TEM já foram descritas, cujos pl variam de 5.2 a 6.5 (Paterson *and* Bonomo, 2005; Bradford, 2001). A TEM-3, isolada em 1989 em *Klebsiella pneumoniae* proveniente de uma unidade de cuidados intensivos, representa a primeira  $\beta$ -lactamase com fenótipo característico de BLEA (Pfaller *et al*, 2006).

#### 4.2 - $\beta$ -lactamases do tipo SHV

A  $\beta$ -lactamase SHV-1, descrita pela primeira vez em 1983, é frequente em espécies de *Klebsiella pneumoniae*, responsáveis por 20% da resistência mediada por plasmídeos à ampicilina. Porém, pode aparecer noutras espécies de bacilos de Gram negativo como em *Escherichia coli*, *Citrobacter diversus* e *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando normalmente uma localização cromossômica em *Klebsiella pneumoniae* (Bradford, 2001; Samaha-Kfoury *and* Araj, 2003; Ali Shah *et al*, 2004; Paterson *and* Bonomo, 2005; Naas *et al*, 2008).

Contrariamente às  $\beta$ -lactamases do tipo TEM, as SHV apresentam poucas variantes, mas a maioria destas variantes são BLEA. A  $\beta$ -lactamase SHV-10 parece derivar da SHV-5, apresenta um fenótipo do tipo resistente aos inibidores das  $\beta$ -lactamases (Bradford, 2001; Ali Shah *et al*, 2004).

#### 4.3 - $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M

Descritas em 1990 no Sul da América e Europa, as  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M, têm vindo a aumentar nos últimos anos em todo o Mundo (Paterson *and* Bonomo, 2005; Cantón *and* Roque, 2006; Lewis *et al*, 2007; Livermore *et al*, 2007; McMullan *et al*, 2007; Fang *et al*, 2008; Naas *et al*, 2008).

Esta família heterogénea de  $\beta$ -lactamases compreende mais de 60 tipos diferentes agrupados em cinco grupos filogenéticos, de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos, 94% entre os membros de cada grupo. O grupo I inclui as CTX-M-1, -3, -10 a -12, -15, -22, -23, -28, -29, -30, -32, -33, -36, -54; grupo II abrange as CTX-M-2, -4 a -7, -20, -31 e Toho-1; grupo III inclui as CTX-M-8; grupo IV as CTX-M-9, -13, -14, -16 a -19, -21, -24, -27, -46, -47, -48, -49, -50 e Toho-2; grupo V contém as CTX-M-25, -26, -39 e -41 (Bonnet, 2004; Pitout *et al*, 2004; Cantón *and* Roque, 2006; Cantón *et al*, 2007; Mendonça *et al*, 2007; Fang *et al*, 2008; Pitout *and* Laupland, 2008).

Estas enzimas bacterianas, mediadas por plasmídeos, apresentam elevada actividade hidrolítica frente à cefotaxima comparativamente à ceftazidima, facilmente inibidas pelos inibidores clássicos das  $\beta$ -lactamases, o ácido clavulânico (Bradford, 2001; Ali Shah *et al*, 2004; Pitout *et al*, 2005; Paterson *and* Bonomo, 2005; Livermore *et al*, 2007; Perez *et al*, 2007). A actividade hidrolítica das enzimas CTX-M é eficaz frente ao cefepime (Paterson *and* Bonomo, 2005). Foi sugerido que o resíduo de serina na posição 237 presente na estrutura enzimática de todas as  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M é fundamental na actividade de espectro alargado deste tipo de  $\beta$ -lactamases (Bradford, 2001). No entanto, existem algumas excepções, como a  $\beta$ -lactamase CTX-M-15, actualmente a mais prevalente em disseminação no Mundo, e a CTX-M-19, que hidrolisam melhor a ceftazidima (Stürenberg *et al*, 2003; Pitout *et al*, 2005; Ben-Ami *et al*, 2006; Livermore *et al*, 2007; Fang *et al*, 2008; Pitout *and* Laupland, 2008).

Estas enzimas têm sido associadas à espécie *Kluyvera ascorbata* encontrada no meio ambiente, devido à transmissão horizontal e subsequente mutação das  $\beta$ -lactamases cromossómicas, o que pode explicar a existência das enzimas CTX-M na comunidade e no meio ambiente (Bradford, 2001; Bonnet, 2004; Pitout *et al*, 2005; Cantón *and* Roque, 2006; Denton, 2007; Cantón *et al*, 2007; Perez *et al*, 2007; Hawkey, 2008; Pitout *and* Laupland, 2008).

Este tipo de  $\beta$ -lactamases pode ser encontrada nas espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, as maiores produtoras, mas também em *Salmonella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii* e *Serratia marcescens* (Bradford, 2001; Ali Shah *et al*, 2004; Livermore *et al*, 2007; Perez *et al*, 2007). As BLEA do tipo CTX-M podem ser codificadas em genes contidos em plasmídios conjugativos, o que permite transferência de uma

espécie bacteriana para outra e entre espécies e géneros diferentes (Bonnet, 2004; Cantón *and* Roque, 2006; Hawkey, 2008).

A recente emergência das CTX-M verifica-se em *Escherichia coli* que juntamente com os factores de virulência inerentes à espécie e consumo indiscriminado de antibióticos, fazem com que seja um importante agente patogénico em unidades de prestação de cuidados de saúde como o hospital e na comunidade, os lares de idosos (Oteo *et al*, 2006; Rodríguez-Baño *et al*, 2006; Lewis *et al*, 2007; Livermore *et al*, 2007; Mendonça *et al*, 2007; Fang *et al*, 2008; Warren *et al*, 2008).

#### 4.4 - $\beta$ -lactamases do tipo OXA

As BLEA da família das OXA, diferem das  $\beta$ -lactamases clássicas TEM e SHV, pertencem à classe D e grupo funcional 2d do sistema de classificação de Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros, respectivamente (Bradford, 2001; Naas *et al*, 2008). Este tipo de enzimas, frequentes em *Pseudomonas aeruginosa* e raras em *Enterobacteriaceae*, conferem resistência à ampicilina e cefalotina (Bradford, 2001; Fang *et al*, 2008; Naas *et al*, 2008). Caracteristicamente apresentam actividade hidrolítica frente à oxacilina e cloxacilina, mas são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico com excepção da  $\beta$ -lactamase OXA-18 (Bradford, 2001).

De forma geral, a  $\beta$ -lactamase do tipo OXA apresenta elevada resistência à ceftazidima, contudo o tipo OXA-17 é excepção, visto conferir maior resistência à cefotaxima e ceftriaxona, comparativamente à ceftazidima (Bradford, 2001; Naas *et al*, 2008).

As  $\beta$ -lactamases do tipo OXA parecem corresponder a mutações de  $\beta$ -lactamases nativas cromossómicas de algumas espécies, que já apresentam um espectro de acção relativamente alargado, contrariamente às BLEA derivadas do tipo TEM e SHV, codificadas em plasmídeos ou outros elementos genéticos (Pitout *et al*, 2005; Poole, 2004).

## 4.5 - Outros tipos de BLEA

Actualmente, conhecem-se, outras famílias de BLEA com menor incidência, como por exemplo as famílias PER, VEB, TLA, SFO, BES e GES. A  $\beta$ -lactamase do tipo PER-1, detectada pela primeira vez em 1993 em *Pseudomonas aeruginosa*, pode ser encontrada também em *Salmonella spp.* e *Acinetobacter baumannii*, condicionando resistência superior à ceftazidima em relação à cefotaxima. A PER-1 plasmídica foi detectada em isolados de infecções nosocomiais (Bradford, 2001; Jacoby and Munoz-Price, 2005; Naas *et al*, 2008). A enzima VEB-1, similar à anterior, isolada em *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e a TLA-1 em *Escherichia coli*. Estas enzimas PER, VEB e TLA, apresentam alguma homologia, conferem resistência às oximino-cefalosporinas, especialmente à ceftazidima e ao aztreonamo (Bradford, 2001; Naas *et al*, 2008). A SFO-1, encontrada em *Serratia fonticola* está fortemente relacionada com as  $\beta$ -lactamases das classes A, sem capacidade de hidrolisar as cefamicinas e inibida pela acção dos inibidores das  $\beta$ -lactamases (Bradford, 2001). A  $\beta$ -lactamase BES encontrada em *Serratia marcescens* num hospital confere elevada resistência ao aztreonamo e cefotaxima comparativamente à ceftazidima. A GES-1 é outro tipo de BLEA, que não está relacionada com as  $\beta$ -lactamases mediada por plasmídeos, apresenta cerca de 36% de homologia com as carbenicilinasas de *Proteus mirabilis* (Bradford, 2001; Naas *et al*, 2008).

## 5 – Outros tipos de $\beta$ -lactamases

### 5.1 - $\beta$ -lactamases resistentes aos inibidores

As  $\beta$ -lactamases resistentes aos inibidores não são BLEA, mas derivam de mutações nas  $\beta$ -lactamases clássicas do tipo TEM e SHV (Bradford, 2001; Jacoby and Munoz-Price, 2005). Estas  $\beta$ -lactamases caracterizam-se pela resistência aos inibidores como o ácido clavulânico e sulbactam, podem ser encontradas em espécies de bacilos de Gram

negativo como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* e *Citrobacter freundii* (Bradford, 2001).

## 5.2 - β-lactamases não BLEA

As BLEA devem ser distinguidas de outros tipos de β-lactamases, das β-lactamases do tipo AmpC e carbapenemases (Jacoby *and* Munoz-Price, 2005; Pitout *and* Laupland, 2008). As β-lactamases do tipo AmpC, normalmente com localização cromossômica, conferem resistência aos antibióticos β-lactâmicos a bacilos de Gram negativo das espécies *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa*. As cefalosporinas do tipo AmpC têm a capacidade de inactivar as cefalosporinas incluindo a cefoxitina e ceftazidima, com excepção do cefepime. Caracterizam-se pela resistência à ampicilina, amoxicilina, susceptibilidade aos carbapenemos e inibição pelos inibidores das β-lactamases como o ácido clavulânico e sulbactam e (Bonomo, 2000; Jacoby *and* Munoz-Price, 2005; Denton, 2007; Doi *and* Paterson, 2007). A utilização do cefepime, cefalosporina de quarta geração, no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, em *Enterobacter spp.* e *Citrobacter freundii*, revela-se útil para diferenciar a β-lactamase presente, β-lactamase AmpC nativa e/ou BLEA (Pitout *et al*, 2003; Jacoby *and* Munoz-Price, 2005; Doi *and* Paterson, 2007; Pitout *and* Laupland, 2008).

As carbapenemases, constituem um grupo variado de β-lactamases em que algumas são metaloenzimas que apresentam um átomo de zinco no centro activo da enzima, têm um espectro de acção mais alargado incluindo os carbapenemos e oximino-β-lactâmicos (Jacoby *and* Munoz-Price, 2005; Paterson, 2006; Queenan *and* Bush, 2007). Estas metaloenzimas, contrariamente às BLEA não são inibidas pelo ácido clavulânico, mas pela acção do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), outras enzimas do tipo KPC podem ser inibidas pelo ácido clavulânico (Jacoby *and* Munoz-Price, 2005; Queenan *et al*, 2007).

## 6 – Epidemiologia das *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA

A introdução das cefalosporinas de terceira geração em 1980, como terapêutica de eleição para diminuir a incidência de infecções por bacilos de Gram negativo da família das *Enterobacteriaceae* produtores de  $\beta$ -lactamases, importantes agentes patogénicos oportunistas, coadjuvou no aparecimento das BLEA (Paterson *and* Bonomo, 2005; Livermore *et al*, 2006; Paterson, 2006; Pfaller *et al*, 2006; Rodríguez-Baño *et al*, 2006).

Desde o aparecimento das primeiras espécies bacterianas produtoras de BLEA, em 1983 na Alemanha e em 1985 em França, em *Klebsiella spp.*, têm-se verificado o aumento destas enzimas em várias espécies da família *Enterobacteriaceae* em todo o Mundo (Cantón *et al*, 2006; Cantón *et al*, 2007; López-Cerero *et al*, 2007; Perez *et al*, 2007). A primeira espécie identificada como produtora de BLEA, variante SHV-2, apresentava um fenótipo de resistência à cefotaxima e ceftazidima, com capacidade de transferência da resistência a outras espécies por conjugação. Identicamente, o fenótipo de resistência às oximino-cefalosporinas na segunda espécie, identificada em 1985, apresenta capacidade de transferência da  $\beta$ -lactamase. A  $\beta$ -lactamase variante TEM-2 foi denominada CTX-M-1 e mais tarde TEM-3. Nos anos posteriores, surgiram surtos epidémicos por bacilos de Gram negativo produtores de BLEA, em diferentes regiões como Sul e Norte da América e África. A análise molecular permitiu identificar novas variantes enzimáticas destas  $\beta$ -lactamases (Valverde *et al*, 2004; Cantón *et al*, 2006; Cantón *et al*, 2007).

Uma estirpe produtora de BLEA foi detectada em 1997 na Irlanda, responsável pela ITU numa idosa sem antecedentes recentes de hospitalização, mas submetida a tratamento múltiplo com antibióticos. No mesmo período em França, num estudo sobre a etiologia das ITU, detectaram a presença de cinco estirpes produtoras de BLEA. Duas das estirpes produtoras de BLEA provenientes de indivíduos sem história recente de hospitalização (igual ou inferior a seis meses). A partir da informação e resultados destes estudos, levantou-se a hipótese da aquisição de estirpes produtoras de BLEA da comunidade, e outros estudos surgiram com o objectivo de verificar a incidência de BLEA neste nicho particular (Pitout *et al*, 2005; López-Cerero, 2007).

Em 1989 as BLEA do tipo TEM e SHV estavam amplamente distribuídas por todo o Mundo. A maioria dos surtos epidémicos, em ambiente hospitalar, surgiu por BLEA das duas famílias de  $\beta$ -lactamases clássicas, TEM e SHV, com elevada prevalência em *Klebsiella pneumoniae* comparativamente à *Escherichia coli*. Actualmente, existem mais de 160 BLEA do tipo TEM e 100 BLEA do tipo SHV. As BLEA do tipo CTX-M, compreende mais de 65 variantes, são actualmente as mais prevalentes em relação aos outros tipos de BLEA particularmente em *Escherichia coli*, seguindo-se outras espécies de *Enterobacteriaceae* como *Klebsiella pneumoniae* (Ali Shah *et al*, 2004; Poole, 2004; Jacoby and Munoz-Price, 2005; Pitout *et al*, 2005; Cantón *et al*, 2006; Oteo *et al*, 2006; Cantón *et al*, 2007; Livermore *et al*, 2007; Pitout *et al*, 2007; Fang *et al*, 2008). Ocupam uma posição de destaque na incidência e disseminação na Europa e noutros continentes a nível hospitalar e na comunidade (Bonnet, 2004; Colodner, 2005; Cantón and Roque, 2006; Livermore *et al*, 2006; Oteo *et al*, 2006; Cantón *et al*, 2007; Denton, 2007; Lewis *et al*, 2007; Perez *et al*, 2007; Pitout *et al*, 2007; Rodriguez-Baño and Ngugro, 2008; Coque *et al*, 2008).

Os primeiros estudos de infecções por bacilos de Gram negativo produtores de BLEA do tipo CTX-M foram realizados em ambiente hospitalar, mas rapidamente foram detectadas na comunidade. Nos últimos anos, tem-se focado atenção no aumento das BLEA do tipo CTX-M na comunidade, particularmente em *Escherichia coli*, como demonstrado em estudos realizados no Canadá, Inglaterra, Itália, Grécia e Espanha (Oteo *et al*, 2006; Cantón and Roque, 2006; Lewis *et al*, 2007). A epidemiologia deste tipo de família de  $\beta$ -lactamase é diferente da dos tipos TEM e SHV. As  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M, em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, não se encontram apenas limitadas a infecções nosocomiais, mas apresentam potencial de disseminação a outros ambientes além do hospital, como por exemplo na comunidade e meio ambiente (Cantón and Roque, 2006; Oteo *et al*, 2006; Lewis *et al*, 2007; Fang *et al*, 2008; Pitout and Laupland, 2008; Rodriguez-Baño and Ngugro, 2008).

A associação das CTX-M com elementos genéticos móveis, explica a facilidade de as estirpes bacterianas que as albergam, disseminarem os genes que codificam as enzimas para outras espécies ou géneros e a ambientes, particularmente a capacidade de disseminação para o ambiente hospitalar e/ou comunidade (Valverde *et al*, 2004;

Cantón *and* Roque, 2006; Oteo *et al*, 2006; Cantón *et al*, 2007; Fang *et al*, 2008; Pitout *and* Laupland, 2008; Rodriguez-Baño *and* Ngugro, 2008).

A identificação de estirpes produtoras de BLEA do tipo CTX-M na comunidade, principalmente relacionadas com ITU, surgiu após o ano de 2000 (Doi *et al*, 2007; Perez *et al*, 2007). Em lares de idosos, a primeira  $\beta$ -lactamase tipo CTX-M, em *Escherichia coli*, foi detectada em França (Kassis-Chikhani *et al*, 2004). A  $\beta$ -lactamase tipo CTX-M-15, descrita pela primeira vez na Índia em 2001, é actualmente a mais prevalente em todo o Mundo (Coque *et al*, 2008; Fang *et al*, 2008; Rodriguez-Baño *and* Ngugro, 2008). Em Portugal, Espanha, Inglaterra, França, Itália, Áustria, Tunísia, Sul da Coreia e Canadá, registou-se a disseminação de um clone de *Escherichia coli* produtora de CTX-M-15 na comunidade e conseqüente disseminação ao meio hospitalar e lares de idosos (Perez *et al*, 2007; Coque *et al*, 2008; Machado *et al*, 2007; Pedrosa *et al*, 2007; Coque *et al*, 2008). Epidemiologicamente, a incidência actual de bactérias produtoras de BLEA apresenta variações geográficas e temporais (Bonnet, 2004; Cantón *and* Roque, 2006; Pfaller *et al*, 2006; Cantón *et al*, 2007; Doi *et al*, 2007; Coque *et al*, 2008). Portugal é um dos países da Europa com maior incidência de estirpes produtoras de BLEA (Machado *et al*, 2007).

As espécies produtoras de BLEA do tipo CTX-M normalmente expressam resistência associada a outros antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos, como aos aminoglicosídeos, tetraciclina e quinolonas (Bonnet, 2004; Cantón *and* Roque, 2006; Rodriguez-Baño *et al*, 2006; Paterson, 2006; Medonça *et al*, 2007; Coque *et al*, 2008).

A maioria das espécies produtoras de BLEA provém de indivíduos hospitalizados ou residentes em outras unidades de prestação de cuidados de saúde (Mesa *et al*, 2006; Oteo *et al*, 2006; Doi *et al*, 2007). No entanto, na indústria agrícola e pecuária, bem como na aquacultura, a utilização excessiva de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, nomeadamente cefalosporinas de terceira geração e de outros grupos como as quinolonas, aminoglicosídeos e glicopéptidos com objectivo terapêutico, profilaxia e promoção de crescimento, contribuiu para o aparecimento de  $\beta$ -lactamases no meio ambiente e em animais. Os animais constituem importantes reservatórios de genes de resistência, particularmente de BLEA, contribuindo para a entrada e disseminação destas espécies bacterianas na cadeia alimentar e no meio ambiente (Bradford, 2001;

Levy and Marshall, 2004; Cabello, 2006; Cantón and Roque, 2006; Mesa *et al*, 2006; Torres and Zarazaga, 2007).

## **7 – $\beta$ -lactamases de Espectro Alargado: Hospital, Comunidade e Lares de Idosos**

A resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é um grave problema de saúde pública, que têm vindo a aumentar em todo o Mundo em indivíduos hospitalizados e cada vez mais em indivíduos na comunidade, como em residentes de lares de idosos (Maslow *et al*, 2004; Ben-Ami *et al*, 2006; Peña *et al*, 2008). Desde a identificação dos primeiros bacilos de Gram negativo da família *Enterobacteriaceae* produtores de BLEA têm-se enfatizado a importância destes, não só como causa importante de infecção nosocomial, mas também em nichos particulares da comunidade como são os lares de idosos (Bonomo, 2000; Arpin *et al*, 2003; Ben-Ami *et al*, 2006; Paterson, 2006; López-Cerero, 2007; Pedrosa *et al*, 2007; Moor *et al*, 2008; Rodriguez-Baño and Njugro, 2008).

A incidência de espécies bacterianas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA contribui para um aumento da mortalidade e morbidade e conseqüentemente compromete a qualidade de vida, aumenta os custos dos cuidados médicos em indivíduos hospitalizados, do ambulatório e em residentes de lares de idosos (Bonomo *et al*, 2003; Filius *et al*, 2005, Miró *et al*, 2005; Owens and Rice, 2006; Conterno *et al*, 2007; Peña *et al*, 2008).

### **7.1 - Colonização do Tracto Intestinal**

O tracto intestinal alberga a maior comunidade de microrganismos do corpo humano, composto por mais de 400 espécies diferentes com função de protecção da mucosa intestinal, de forma a evitar a colonização por bactérias potencialmente patogénicas. A

*Escherichia coli*, colonizadora da mucosa intestinal é um importante agente patogénico oportunista (Murray *et al*, 2003; Donskey, 2006).

A utilização de antibióticos afecta tanto as bactérias causadoras de infecção como as bactérias comensais, podendo seleccionar bactérias com mecanismos de resistência aos mesmos no ecossistema intestinal. As espécies da família *Enterobacteriaceae* colonizadoras do tracto intestinal, podem apresentar resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como resultado da pressão selectiva pelo consumo prévio e indiscriminado dos mesmos e/ou contacto com espécies produtoras de  $\beta$ -lactamases (Österblad *et al*, 2000; Miró *et al*, 2005; López-Cerero *et al*, 2007).

O tracto intestinal representa um importante reservatório de bactérias resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, particularmente em espécies da família das *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA, *Acinetobacter spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*, como um local importante de transferência dos genes que conferem resistência ao referido grupo de antibióticos (Donskey, 2006).

## 7.2 - Ambiente Hospitalar e Comunidade

O aparecimento de espécies bacterianas em ambiente hospitalar é inevitável dadas as características particulares deste nicho, pessoas debilitadas, utilização excessiva de antibióticos, procedimentos médicos e técnicas invasivas de diagnóstico e terapêutica e infecção nosocomial normalmente consequência de infecção cruzada (Filius *et al*, 2005; Rodríguez-Baño *et al*, 2006; Denton, 2007; Christiaens *et al*, 2008). As espécies da família das *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA representam os principais agentes patogénicos nosocomiais, particularmente em unidades de cuidados intensivos (Arpin *et al*, 2003; Filius *et al*, 2005; Ben-Ami *et al*, 2006; Arpin *et al*, 2007; Denton, 2007).

As primeiras referências aludem à elevada incidência de BLEA em ambiente hospitalar, porém nos últimos anos, vários estudos realizados detectaram infecções por estes agentes na comunidade associados a ITU e infecções gastrintestinais (Miró *et al*, 2005; Moor *et al*, 2008). A colonização por estas espécies bacterianas também foi

documentada, em doentes hospitalizados e em indivíduos da comunidade (Calbo *et al*, 2006; López-Cerero *and* Pascual, 2007; Mesa *et al*, 2006; Paterson, 2006; Christiaens *et al*, 2008; Rodríguez-Baño *et al*, 2008).

Na comunidade, tem-se assistido ao aumento dramático de infecções e indivíduos colonizados a nível do tracto intestinal por *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA, particularmente *Escherichia coli*, com ênfase em enzimas do tipo CTX-M (Bisson *et al*, 2002; Valverde *et al*, 2004; Miró *et al*, 2005; Rodríguez-Baño *et al*, 2006; Denton, 2007; López-Cerero *and* Pascual, 2007; McMullan *et al*, 2007; Paterson, 2007; Coque *et al*, 2008; Rodríguez-Baño *and* Ngugro, 2008; Rodríguez-Baño *et al*, 2008).

A pressão exercida pelo consumo generalizado de antibióticos em ambiente hospitalar e contacto com a flora multiresistente, proporciona o aumento de colonização intestinal por bactérias produtoras de BLEA, particularmente em *Escherichia coli* e oportunidade destas bactérias causarem infecção (López-Cerero *et al*, 2007). Esta realidade é análoga à da comunidade, em indivíduos saudáveis e em lares de idosos, onde é evidente a elevada incidência de espécies bacterianas produtoras de BLEA (Maslow *et al*, 2004; Valverde *et al*, 2004; Miró *et al*, 2005; Mesa *et al*, 2006; Oteo *et al*, 2006; Rodríguez-Baño *and* Ngugro, 2008; Rodríguez-Baño *et al*, 2008).

### **7.3 - Lares de Idosos**

Em residentes de lares de idosos, as infecções por bactérias resistentes aos antibióticos, representam a principal causa de morbidade e mortalidade (Bonomo, 2000; Bonomo *et al*, 2003).

Estudos realizados com o objectivo de determinar a incidência de espécies produtoras de BLEA na comunidade, abrangem o estudo de colonização intestinal e/ou infecção por *Enterobacteriaceae* em residentes destas instituições (Bonomo, 2000; Cantón *et al*, 2007). As principais infecções em lares de idosos são as ITU, infecções respiratórias, intestinais e da pele (Kassis-Chikhani *et al*, 2004). Os residentes destas instituições, com idade avançada, geralmente com elevado grau de debilidade, procedimentos e técnicas médicas invasivas e sujeitos a múltiplas medicações, consomem

indiscriminadamente antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de largo espectro, o que condiciona a selecção de bactérias produtoras de BLEA colonizadoras, por exemplo no tracto intestinal (Bonomo, 2000; Simor, 2001; Loeb *et al*, 2002; Stürenberg *et al*, 2003; Kassis-Chikhani *et al*, 2004; Maslow *et al*, 2004; Sandoval *et al*, 2004; Paterson and Bonomo, 2005; Cantón *et al*, 2007). As espécies bacterianas produtoras das enzimas de amplo espectro de acção podem colonizar o tracto intestinal, tracto urinário, tracto respiratório e pele dos residentes (Bisson *et al*, 2002; Valverde *et al*, 2004; Paterson, 2007; López-Cerero and Pascual, 2007).

Em lares de idosos, a colonização por estirpes produtoras de BLEA é superior comparativamente a indivíduos da comunidade, nomeadamente em indivíduos saudáveis, constituindo um nicho particular na comunidade da existência de estirpes e genes de resistência aos oximino- $\beta$ -lactâmicos (Valverde *et al*, 2004; Ben-Ami *et al*, 2006; Rodriguez-Baño *et al*, 2006).

Os principais factores que contribuem para o aparecimento de espécies bacterianas produtoras de BLEA em lares de idosos consistem na utilização excessiva de oximino- $\beta$ -lactâmicos, procedimentos médicos e técnicas invasivas, transferência horizontal de genes de resistência bacteriana entre os residentes e transmissão das bactérias resistentes aos antibióticos entre os lares de idosos e meio hospitalar (Toubes *et al*, 2003; Paterson and Bonomo, 2005; Nicolas-Chanoine *et al*, 2008).

Os lares de idosos representam um importante reservatório de bactérias resistentes aos antibióticos nomeadamente *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA. As comissões de controlo de infecção deviam implementar medidas de precaução de forma a limitar a incidência e a disseminação destas espécies bacterianas nestes nichos particulares da comunidade (Wiener *et al*, 1999; Bonomo, 2000; Simor, 2001; Drinka *et al*, 2004; Mendelson *et al*, 2005; Oteo *et al*, 2006; Arpin *et al*, 2007; Nicolas-Chanoine *et al*, 2008).

## 7.4 - Factores de Risco

Alguns factores de risco, independentes entre si, têm sido identificados como responsáveis pela colonização e/ou infecção por *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA (Stürenburg *et al*, 2003; Pfaller *et al*, 2006; Denton, 2007; Peña and Pujol, 2007). Indivíduos com maior susceptibilidade de colonização e/ou infecção por bactérias produtoras de BLEA são aqueles que podem apresentar os seguintes factores de risco: antibioterapia múltipla particularmente com oximino- $\beta$ -lactâmicos; hospitalizações recentes; período prolongado de hospitalização sobretudo em unidades de cuidados intensivos; quadros clínicos graves; presença de dispositivos médicos e técnicas invasivas (como cateteres venosos, arteriais, urinários, de drenagem biliar e tubos endotraqueais, nasogástricos, de gastrostomia e jejunostomia); ventilação mecânica; úlceras de decúbito; administração de nutrição parenteral; doenças malignas e colonização intestinal (Colodner, 2005; Graffunder *et al*, 2005; Jacoby and Munoz-Price, 2005; Pfaller *et al*, 2006; Denton, 2007; McMullan *et al*, 2007; Peña *et al*, 2008; Pitout and Laupland, 2008; Warren *et al*, 2008). Os procedimentos e técnicas médicas invasivas contribuem para a infecção e/ou colonização, uma vez que criam potenciais portas de entrada de bactérias, nomeadamente as produtoras de BLEA no organismo Humano (Graffunder *et al*, 2005; Pfaller *et al*, 2006; Denton, 2007).

A utilização excessiva de antibióticos é um dos factores de risco mais relevantes. Vários estudos relacionam o consumo de oximino- $\beta$ -lactâmicos com a aquisição de estirpes produtoras de BLEA em indivíduos hospitalizados e em residentes de lares de idosos (Wiener *et al*, 1999; Stürenburg *et al*, 2003; Colodner, 2005; Graffunder *et al*, 2005; Jacoby and Munoz-Price, 2005; Miró *et al*, 2005; Pfaller *et al*, 2006; Pitout and Laupland, 2008). A utilização indiscriminada destes antibióticos pode contribuir para a selecção de espécies bacterianas produtoras de BLEA da flora comensal (Simor, 2001; Graffunder *et al*, 2005; Peña and Pujol, 2007). Outros estudos têm relacionado outros grupos de antibióticos, como os carbapenemos, com um maior risco de colonização por estes microrganismos (Graffunder *et al*, 2005; Peña and Pujol, 2007).

## 7.5 - Medidas de Controlo

As medidas de controlo para evitar o aparecimento e disseminação de estirpes produtoras de BLEA assentam em quatro vertentes principais: vigilância microbiológica, vigilância clinicoepidemiológica, racionalização do consumo de antibióticos e medidas de controlo de infecção. A primeira medida, refere-se à confirmação e interpretação do fenótipo de resistência bacteriana; a segunda à vigilância de áreas de risco como as unidades de cuidados intensivos e lares de idosos; a terceira medida diz respeito à restrição e/ou redução da prescrição de antibióticos do grupo oximino- $\beta$ -lactâmicos; a última refere-se à implementação de medidas eficazes de controlo de infecção em unidades de prestação de cuidados de saúde (Rodriguez-Baño *et al*, 2006; Peña *and* Pujol, 2007).

Nas instituições de prestação de cuidados de saúde, hospital e lares de idosos, as principais medidas de controlo de colonização e/ou infecção por bactérias produtoras de BLEA consistem na racionalização da prescrição e consumo de antibióticos, minimizar a sua utilização, ausência de tratamento com recurso a antibióticos por exemplo em bacteriúrias assintomáticas, minimizar a transferência de doentes colonizados e/ou infectados entre instituições como o hospital e lares de idosos, higienização das mãos e utilização das barreiras de protecção pelos prestadores de cuidados de saúde (Bonomo, 2000; Loeb *et al*, 2002; Drinka *et al*, 2004, Graffunder *et al*, 2005; Christiaens *et al*, 2008).

As mãos dos profissionais de saúde podem estar colonizadas por bacilos de Gram negativo produtores de BLEA, as medidas de higienização, desinfecção e protecção são cruciais no sentido de limitar a disseminação destas espécies bacterianas aquando do contacto com diferentes pacientes durante a prestação de cuidados de saúde (Bonomo, 2000; Drinka *et al*, 2004; Donskey, 2006; Owens *and* Rice, 2006; Warren *et al*, 2008). A higienização das mãos e práticas de controlo de infecção, em hospitais e lares de idosos, são passos importantes para minimizar a disseminação da resistência bacteriana, especialmente as espécies bacterianas produtoras de BLEA (Bonomo, 2000; Drinka *et al*, 2004; Harris *et al*, 2007). A educação e sensibilização de prestadores de cuidados de saúde das instituições hospitalares e das residências de idosos, para a

problemática das BLEA, é fundamental para minimizar a colonização e/ou infecção por bactérias produtoras de BLEA e consequente disseminação entre os residentes e outros ambientes (Bonomo, 2000; Conterno *et al*, 2007).

A notificação de indivíduos com infecção e/ou colonizados por espécies bacterianas produtoras de BLEA é uma das medidas de controlo mais relevante, em hospital e na comunidade como em lares de idosos, com consequente isolamento e/ou tratamento antimicrobiano adequado (Christiaens *et al*, 2008; Warren *et al*, 2008). As infecções são importantes indicadores de qualidade em prestação de cuidados de saúde, devido ao facto de estarem relacionadas com a eficácia das medidas de controlo de infecção em unidades de prestação de cuidados de saúde, como o hospital e lares de idosos (Conterno *et al*, 2007).

## 7.6 - Tratamento

A colonização por espécies produtoras de enzimas de espectro alargado não requer tratamento antimicrobiano, no entanto é importante estabelecer uma terapêutica adequada no caso de infecção (Bisson *et al*, 2002; Paterson, 2007). As opções terapêuticas para tratamento de infecções por bacilos de Gram negativo produtores de BLEA, assentam nos: carbapenemos, antibióticos com maior estabilidade à hidrólise pelas BLEA; cefamicinas possuem estabilidade às BLEA e antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos, como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tigeciclina e polimixinas (Paterson, 2007). Os  $\beta$ -lactâmicos associados a inibidores são outra das alternativas para o tratamento de infecções por BLEA produzidas por *Enterobacteriaceae* (Paterson, 2007; Ali Shah *et al*, 2004).

Os carbapenemos, por exemplo imipenemo, ertapenemo e meropenemo assumem um importante papel como agente antimicrobiano de eleição para o tratamento de infecções causadas pelas BLEA, uma vez que são estáveis à hidrólise pelas enzimas de espectro alargado. Contudo, podem estar associados ao aparecimento de carbapenemases (Ali Shah *et al*, 2004; Paterson, 2007; Rodríguez-Bano *et al*, 2008). O aparecimento de  $\beta$ -lactamases com capacidade de hidrolisar os carbapenemos, as carbapenemases, como as KPC e as metalo- $\beta$ -lactamases, a longo prazo compromete a

terapêutica com carbapenemos. A descoberta de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemos demonstra a importância do controlo de infecção que deve rapidamente adoptar decisões, de forma a prevenir a disseminação deste fenótipo de resistência antimicrobiana (Paterson *et al*, 2007).

## **8 – Origem das BLEA: Hospital ou Comunidade?**

A emergente e rápida disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA nos últimos anos em ambiente hospitalar e na comunidade representa um problema de saúde pública em todo o Mundo (Ben-Ami *et al*, 2006; Paterson, 2006; Pfaller *et al*, 2006; Bono, 2008; Rodriguez-Baño *and* Ngugro, 2008).

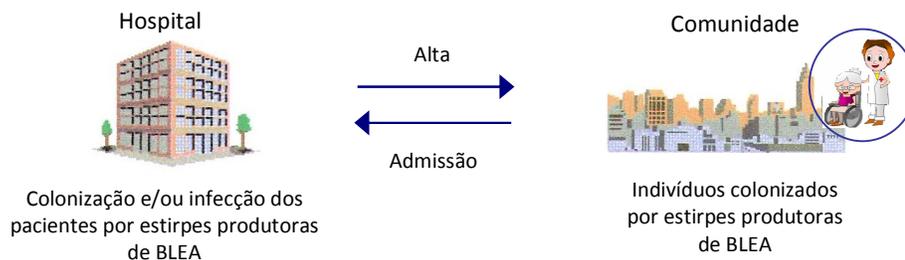
A origem das espécies bacterianas produtoras de BLEA é ainda ambígua: hospital ou comunidade. As duas realidades podem existir, porém a elevada incidência de estirpes produtoras de BLEA na comunidade, inclusive em indivíduos saudáveis sem contacto prévio com o ambiente hospitalar, atribui a este nicho um papel importante na origem e disseminação destas estirpes, particularmente ao ambiente hospitalar (Bisson *et al*, 2002; Rodriguez-Baño *et al*, 2006; Cantón *et al*, 2007; López-Cerero, 2007; Rodríguez-Baño *et al*, 2008).

As primeiras referências da origem das BLEA mencionam o ambiente hospitalar como principal reservatório de estirpes bacterianas produtoras das referidas enzimas, o aparecimento destas espécies na comunidade era resultado da difusão a partir do ambiente hospitalar. Estudos recentes, refutam a hipótese da disseminação das estirpes produtoras de BLEA do meio hospitalar para a comunidade, referindo a origem destas na comunidade e conseqüente entrada em ambiente hospitalar, aquando da admissão de indivíduos com infecção e/ou colonizados por estas estirpes (Bisson *et al*, 2002; Paterson *and* Bonomo, 2005; Cantón *et al*, 2007; López-Cerero *and* Pascual, 2007).

Nos últimos anos, a elevada incidência de estirpes produtoras de BLEA na comunidade, particularmente como colonizadoras em indivíduos sem aparente contacto prévio com o meio hospitalar surpreendeu o panorama epidemiológico das BLEA (Bisson *et al*,

2002; Ben-Ami *et al*, 2006; Cantón *et al*, 2007; Coque *et al*, 2008). Este facto corrobora a hipótese da origem destas estirpes na comunidade (Bisson *et al*, 2002; Ben-Ami *et al*, 2006; Cantón *et al*, 2007; Lewis *et al*, 2007; López-Cerero *and Pascual*, 2007). Alguns autores reforçam a ideia da origem das estirpes produtoras de BLEA na comunidade, particularmente nos lares de idosos (Bonomo, 2000; Ben-Ami *et al*, 2006).

Os lares de idosos representam o local ideal de aparecimento das estirpes bacterianas produtoras de BLEA. Os residentes destas instituições mobilizam-se frequentemente entre o ambiente hospitalar, comunidade e lares de idosos, o que facilita a disseminação destes agentes patogénicos (Arpin *et al*, 2003; Bonomo *et al*, 2003; Mendelson *et al*, 2005). A figura 4 tenta demonstrar o fluxo contínuo e dinâmico do aparecimento e disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA no hospital, comunidade e lar de idosos.



**Figura 4** - Exemplo de disseminação de estirpes produtoras de BLEA entre o ambiente hospitalar e comunidade (adaptado de <http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC438/decker/AntibioticRes/AntibioticResistance.html>).

Num primeiro momento, as estirpes produtoras de BLEA surgem no ambiente hospitalar aquando da admissão de indivíduos colonizados, com as referidas estirpes, provenientes da comunidade. Durante a hospitalização, os genes que conferem resistência aos antibióticos oximino- $\beta$ -lactâmicos, podem ser transferidos para bactérias susceptíveis através de plasmídeos conjugativos. O não cumprimento das medidas de controlo de infecção facilita a disseminação das bactérias produtoras de BLEA a outros indivíduos hospitalizados. Estes indivíduos, aquando de alta hospitalar, podem sair colonizados promovendo a disseminação na comunidade a outros indivíduos e unidades de prestação de cuidados de saúde. Os residentes de lares de

idosos sujeitos a hospitalizações frequentes, normalmente devido a agudez e situações crônicas, quando têm alta ainda colonizados com estirpes resistentes aos antibióticos, podem funcionar como veículos de disseminação na residência geriátrica, podendo inclusivamente ser origem de surtos infecciosos por bactérias multiresistentes aos antibióticos (Arpin *et al*, 2003; Filius *et al*, 2005; Paterson and Bonomo, 2005).

A colonização intestinal por *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA contribui para a entrada silenciosa destas espécies no ambiente hospitalar. O tracto intestinal é um importante reservatório de bactérias produtoras destas enzimas bacterianas, e permite a rápida e fácil difusão destes agentes patogénicos a outros ambientes, e disseminação das BLEA a outras espécies e/ou géneros bacterianos (Bisson *et al*, 2002; Stürenberg *et al*, 2003; Valverde *et al*, 2004; Sandoval *et al*, 2004; Paterson and Bonomo, 2005; Mesa *et al*, 2006; López-Cerero and Pascual, 2007). Os indivíduos da comunidade colonizados por BLEA constituem reservatórios importantes destas espécies bacterianas e veículos de transmissão da comunidade para o ambiente hospitalar (Mesa *et al*, 2006; Owens and Rice, 2006; López-Cerero and Pascual, 2007; Perez *et al*, 2007).

Salientam-se alguns estudos que evidenciam o aumento significativo da incidência de *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA em indivíduos da comunidade. No hospital universitário Ramón y Cajal (Madrid), a incidência de bacilos de Gram negativo da família *Enterobacteriaceae* produtores de BLEA, colonizadores do tracto intestinal, aumentou de 1% em 1991 para 6% no ano de 2003. Em Barcelona, a incidência de 2,1% em Fevereiro e Maio de 2001 aumentou para 3,8% em Abril e Junho de 2002 e para 7,5% em Outubro do mesmo ano. Em Zaragoza, de 2,5% em 2002 para 7,2% em 2004 (Cantón *et al*, 2007). Um outro estudo realizado no hospital Ramón y Cajal, verificou que cerca de 4% dos indivíduos da comunidade, sem contacto prévio com o ambiente hospitalar ou tratamento com antibióticos nos três meses antecedentes ao estudo, apresentavam colonização fecal por bactérias produtoras de BLEA (Cantón *et al*, 2007). Noutros países, como Israel a incidência de colonização por BLEA em indivíduos da comunidade é de cerca de 11%. A incidência pode ser superior em residentes de unidades geriátricas e em pessoas que convivem com pacientes extra-hospitalares com ITU por bacilos de Gram negativo produtores de BLEA. Nos estudos

realizados, a caracterização molecular permitiu verificar a similaridade entre as BLEA detectadas nos portadores fecais da comunidade com as BLEA detectadas no ambiente hospitalar (Cantón *et al*, 2007). A incidência de indivíduos saudáveis da comunidade portadores de BLEA demonstrou, que conseqüentemente pode aumentar o risco de transmissão directa a outros indivíduos saudáveis e ao meio ambiente. A redução da incidência de indivíduos da comunidade colonizados com BLEA diminui respectivamente a resistência bacteriana em ambiente hospitalar. A admissão hospitalar destes indivíduos constitui um importante factor de risco de infecção e/ou colonização dos indivíduos hospitalizados por agentes patogénicos produtores de BLEA, o que ajuda a reforçar a hipótese da origem das BLEA, na comunidade (Valverde *et al*, 2004; Cantón *et al*, 2007).

Nos lares de idosos, as bactérias produtoras de BLEA podem provir do meio hospitalar, aquando da admissão dos residentes na respectiva unidade de prestação de cuidados de saúde e/ou adquiridas no lar de idosos e conseqüente propagação à comunidade e/ou ambiente hospitalar (Bonomo, 2000; Simor, 2001). As instituições de idosos e outras unidades de prestação de cuidados de saúde da comunidade têm adquirido uma grande importância nos últimos tempos, devido ao aparecimento e disseminação de estirpes multiresistentes, particularmente produtoras de BLEA (Rodríguez-Baño *et al*, 2004).

O aumento da incidência de indivíduos portadores de bacilos de Gram negativo da família das *Enterobacteriaceae* produtores de BLEA na comunidade aumenta o risco da transmissão da resistência bacteriana a outras espécies e disseminação ao meio circundante, como hospital, residências de idosos, águas marítimas e pluviais (Valverde *et al*, 2004; Kümmerer, 2004; Pfaller *et al*, 2006). O conhecimento da colonização nos indivíduos da comunidade por espécies bacterianas produtoras de BLEA é importante, no sentido de limitar a disseminação e entrada em ambiente hospitalar (Filius *et al*, 2005; Peña and Pujol, 2007; Warren *et al*, 2008). A detecção e isolamento de indivíduos colonizados ou com infecção por estirpes produtoras de BLEA, aquando da admissão hospitalar, constituem as medidas mais importantes de prevenção da infecção nosocomial e para selecção da terapêutica antimicrobiana (Conterno *et al*, 2007; Ben-Ami *et al*, 2006; Perez *et al*, 2007; Warren *et al*, 2008).

## 9 – Detecção de espécies produtoras de BLEA

A heterogeneidade das BLEA dificulta a detecção laboratorial, devido aos diferentes graus de resistência que podem condicionar, variabilidade da actividade frente a potenciais substratos, associação a outros mecanismos de resistência, dissimulando a sua presença (Stürenburg *et al*, 2003; Jacoby *and* Munoz-Price, 2005; Pfaller *et al*, 2006; Pitout *and* Laupland, 2008).

A detecção das espécies produtoras de BLEA é difícil, uma vez que o fenótipo característico de resistência aos oximino- $\beta$ -lactâmicos pode não ser evidenciado de forma clara (Pitout *and* Laupland, 2008). O estabelecimento incorrecto da sensibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, pode contribuir para a entrada silenciosa das espécies bacterianas produtoras de BLEA no ambiente hospitalar e comunidade (Gheldre *et al*, 2003; Colodner, 2005). Muitos laboratórios não se encontram sensibilizados para a importância da detecção de espécies produtoras de BLEA, o que consequentemente pode levar a terapêuticas inadequadas e efeitos adversos entre os quais falência terapêutica (Colodner, 2005; Paterson *and* Bonomo, 2005; Stürenburg *et al*, 2003; Paterson, 2006; Pfaller *et al*, 2006).

Os métodos laboratoriais utilizados para detecção de espécies bacterianas produtoras de BLEA consistem em métodos de caracterização do fenótipo e genótipo. O primeiro baseia-se na capacidade das espécies produtoras de BLEA hidrolisarem os oximino- $\beta$ -lactâmicos e inibição pelo ácido clavulânico. O segundo, através de técnicas moleculares permite detectar e caracterizar os genes responsáveis pela resistência (Stürenburg *and* Mack, 2003; Jacoby *and* Munoz-Price, 2005; Pfaller *et al*, 2006; Pitout *et al*, 2006; Pitout *and* Laupland, 2008).

A detecção fenotípica das BLEA pelo método de difusão em agar segundo as directrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) baseia-se nas características específicas deste tipo de enzimas: redução da susceptibilidade às cefalosporinas de amplo espectro e aztreonamo e inibição pelo ácido clavulânico. O CLSI sugere que espécies de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* podem ser produtoras de BLEA se apresentarem, no método de difusão em agar com discos, diâmetros de halos de sensibilidade de <22mm, <27mm, <27mm, <25mm e <17mm para ceftazidima,

aztreonamo, cefotaxima, ceftriaxona e cefpodoxima respectivamente e, em *Proteus mirabilis*, halos de sensibilidade de <22mm, <22 mm e <27mm respectivamente para cefpodoxima, ceftazidima e cefotaxima. A confirmação da presença de BLEA é realizada pela observação da acção sinérgica entre o discos de amoxicilina com inibidor clássico das  $\beta$ -lactamases, ácido clavulânico, e discos das cefalosporinas de amplo espectro e/ou aztreonamo (Stürenburg and Mack, 2003; Gheldre *et al*, 2003; Pitout *et al*, 2005; CLSI, 2007; Drieux *et al*, 2008; Pitout and Laupland, 2008).

O método de adição de ácido clavulânico consiste na adição de solução de ácido clavulânico a discos de oximino- $\beta$ -lactâmicos. A presença de BLEA é verificada pela diferença entre os diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano dos discos com e sem inibidor. Uma diferença igual ou superior a 5mm no disco de antibiótico com inibidor é característico da presença de BLEA (CLSI, 2007; Drieux *et al*, 2008).

O método de *Double Disc Synergy Test* (DDST) consiste na aproximação de discos de oximino- $\beta$ -lactâmicos ao disco de amoxicilina com inibidor das  $\beta$ -lactamases, colocado no centro da placa de Müller-Hinton a uma distância de 30mm. Em algumas situações a distância entre os discos deve ser encurtada para cerca de 20mm, para aumentar a sensibilidade na detecção da BLEA (CLSI, 2007; Drieux *et al*, 2008). Existem outros métodos de detecção das BLEA como E-test e métodos automatizados (Drieux *et al*, 2008; Pitout and Laupland, 2008).

A detecção laboratorial das espécies bacterianas produtoras de BLEA com recurso a métodos convencionais de detecção do fenótipo é difícil, devido ao aparecimento de novas BLEA e de outros tipos de  $\beta$ -lactamases. A detecção do genótipo das BLEA revela-se essencial na identificação das BLEA em estudos epidemiológicos hospitalares e na comunidade. Para detecção genotípica e caracterização das variantes inerentes à família das BLEA pode-se recorrer a métodos moleculares como *Polimerase Chain Reaction* (PCR), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e técnica de *Microarray* (Pitout *et al*, 2007; Drieux *et al*, 2008; Pitout and Laupland, 2008).

**OBJECTIVO**

---

Este estudo tem por objectivo a detecção de bacilos de Gram negativo da família *Enterobacteriaceae* produtores de BLEA, como colonizadores do tracto intestinal de residentes autónomos e dependentes de lares de idosos da zona norte do País.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

## 1 – Amostras Biológicas

A selecção dos lares de idosos FFUP1, FFUP2, FFUP3, FFUP4, FFUP5 e FFUP6 foi feita aleatoriamente na zona norte do País. Às instituições de idosos foi solicitada autorização para recolha de amostras de fezes dos residentes, garantindo confidencialidade na identificação dos residentes e da instituição.

Foram colhidas amostras de fezes, entre Janeiro e Julho de 2008, a residentes autónomos e dependentes de seis lares de idosos da zona norte do País.

### 1.1 - Colheita, Transporte e Acondicionamento das Amostras

Foi colhida uma porção representativa da amostra de fezes de cerca de 1 a 2 gramas, para recipientes de colheita apropriados, inquebráveis e estéreis. Preferencialmente, fragmentos de amostra contendo pús, muco ou sangue foram recolhidos para processamento laboratorial (Murray *et al*, 2003).

O transporte das amostras foi realizado no prazo de 24h após colheita, em malas térmicas. Na impossibilidade de tal, foram armazenadas no frigorífico à temperatura de 4°C num máximo de 24h (Murray *et al*, 2003).

## 2 – Processamento das Amostras Biológicas

As amostras de fezes foram sujeitas a caracterização macroscópica atendendo à presença de sangue, muco e/ou pús. Uma porção representativa da amostra, cerca de uma “noz”, foi inoculada em 40mL de caldo de *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) e incubadas durante 24h a 37°C.

A inoculação em meio de cultura de MacConkey (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) e MacConkey contendo antibiótico  $\beta$ -lactâmico de selecção realizou-se a partir do crescimento no caldo BHI não homogeneizado. Efectuou-se uma diluição de 1/10 a

partir do sobrenadante do caldo e inoculou-se 200 $\mu$ L pela técnica de espalhamento em meio de MacConkey. Os meios de MacConkey com antibiótico ceftazidima (2 $\mu$ g/mL), cefotaxima (2 $\mu$ g/mL), aztreonamo (2 $\mu$ g/mL) e imipenemo (2 $\mu$ g/mL) foram inoculados, em condições iguais às descritas, com 200 $\mu$ L do sobrenadante e do sedimento respectivamente, provenientes do caldo de BHI. A inoculação no meio de cultura de MacConkey, a partir da diluição 1/10 do sobrenadante do caldo BHI, teve por objectivo conhecer a carga microbiana da flora colonizadora do tracto intestinal de cada residente. A inoculação nos meios com antibiótico de selecção permitiu uma avaliação semi-quantitativa da presença de isolados bacterianos colonizadores do tracto intestinal resistentes à concentração de antibiótico usado no meio de cultura e promover a selecção de estirpes resistentes aos antibióticos incorporados no meio, representativas para estudo da resistência antimicrobiana aos antibióticos oximino- $\beta$ -lactâmicos. Após o período de incubação, 24 a 48h a 37°C, procedeu-se à contagem de unidades formadoras de colónia por mililitro (UFC/mL) em cada meio inoculado e caracterização morfológica das colónias obtidas.

Os isolados, seleccionados a partir das culturas iniciais em meio de MacConkey com antibiótico, foram re-isolados no respectivo meio de selecção, com o objectivo de confirmar o crescimento e obtenção de culturas puras para teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.

No decorrer da metodologia experimental verificou-se a necessidade de adicionar aos dois meios de cultura de MacConkey com cefotaxima (2 $\mu$ g/mL) e ceftazidima (2 $\mu$ g/mL), utilizados na primeira abordagem experimental, meio de cultura de MacConkey com aztreonamo (2 $\mu$ g/mL) e imipenemo (2 $\mu$ g/mL), para detecção de BLEA e outros mecanismos de resistência.

## **2.1 - Preparação das soluções de antibiótico**

As soluções de antibiótico, de concentrações padronizadas, foram preparadas para adicionar ao meio de cultura de MacConkey as quantidades necessárias, de forma a obter concentrações de 2 $\mu$ g/mL de antibiótico  $\beta$ -lactâmico em cada meio (ceftazidima, cefotaxima, aztreonamo, imipenemo).

As soluções de antibiótico preparadas foram conservadas a -20°C, durante um período não superior a 6 meses (Isenberg, 2004).

## **2.2 - Estirpe Controlo**

Com o intuito de verificar a capacidade selectiva dos meios de cultura de MacConkey e MacConkey com antibiótico, ceftazidima (2 $\mu$ g/mL), cefotaxima (2 $\mu$ g/mL), aztreonamo (2 $\mu$ g/mL) e imipenemo (2 $\mu$ g/mL), recorreu-se à estirpe controlo, *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922 (ATCC, Virgínia, U.S.A.).

A estirpe controlo é sensível aos referidos antibióticos incorporados no meio de cultura de MacConkey e a inibição do seu crescimento permite garantir a capacidade de selecção dos mesmos.

## **2.3 - Identificação das Espécies Bacterianas**

A identificação bacteriana foi efectuada com recurso às características morfológicas das colónias, métodos de identificação bioquímica convencionais e o sistema de identificação em miniatura, galeria API<sup>®</sup> 20E (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, França).

## **2.4 - Conservação das Espécies Bacterianas**

As espécies bacterianas produtoras de BLEA foram conservadas em 1mL de meio de cultura *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) com criopreservante, 15% de Glicerol e, posteriormente, guardadas a -80°C.

### 3 – Avaliação da Susceptibilidade aos Agentes Antimicrobianos

#### 3.1 - Determinação da susceptibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em agar

A partir de colónias bacterianas provenientes de culturas puras e recentes em meio de MacConkey contendo antibiótico, foram preparadas suspensões, em soro fisiológico estéril, com turvação equivalente à unidade do padrão de 0,5 na escala de MacFarland. A suspensão bacteriana padronizada foi inoculada uniformemente por toda a superfície no meio de Müller-Hinton (Oxoid, Hampshire, Reino Unido), em três planos diferentes, com zaragatoa estéril. Os discos de antimicrobianos de concentrações definidas foram colocados, na superfície do meio inoculado, a uma distância de 30mm do disco de associação amoxicilina e ácido clavulânico (30 $\mu$ g), colocado no centro do meio inoculado (Isenberg, 2004; CLSI, 2007).

Após o período de incubação, 18 a 24h a 37°C, procedeu-se à leitura dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano para cada antibiótico (Isenberg, 2004; CLSI, 2007).

Neste procedimento, utilizou-se *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922, como estirpe controlo dos diâmetros de inibição de crescimento bacteriano previstos para estirpe sensível, de acordo com os critérios estabelecidos do CLSI (CLSI, 2007).

#### 3.2 - Antibióticos utilizados

Para realização do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foram seleccionados antibióticos representativos do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos e outros dos grupos não  $\beta$ -lactâmicos, nomeadamente quinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas, fenicois e nitrofurantoína.

Os discos de antibióticos utilizados para os grupos  $\beta$ -lactâmicos foram: amoxicilina (AMX) (10 $\mu$ g); amoxicilina e ácido clavulânico (AMC) (30 $\mu$ g); cefuroxima (CXM) (30 $\mu$ g); ceftazidima (CAZ) (30 $\mu$ g); cefotaxima (CTX) (30 $\mu$ g); cefepime (FEP) (30 $\mu$ g); aztreonamo (ATM) (30 $\mu$ g); cefoxitina (FOX) (30 $\mu$ g) e imipenemo (IPM) (10 $\mu$ g). Os discos de

antibióticos dos restantes grupos não  $\beta$ -lactâmicos foram: ácido nalidíxico (NA) (30 $\mu$ g); netilmicina (NET) (30 $\mu$ g); tetraciclina (TE) (30 $\mu$ g); ciprofloxacina (CIP) (5 $\mu$ g); estreptomicina (S) (10 $\mu$ g); cloranfenicol (C) (30 $\mu$ g) e nitrofurantoína (F) (300 $\mu$ g) (Oxoid, Hampshire, Reino Unido ou BioMérieux, Marcy-l'Etoile, França).

#### **4 – Detecção de BLEA**

A detecção de BLEA foi realizada pela observação da acção sinérgica entre os discos de oximino- $\beta$ -lactâmicos e o disco de associação de amoxicilina com inibidor das  $\beta$ -lactamases, ácido clavulânico (AMC) (30 $\mu$ g), no teste de susceptibilidade aos antibióticos do grupo  $\beta$ -lactâmico (Jarlier *et al*, 1988; CLSI, 2007).

O método DDST consiste na aproximação de cerca de 20mm, dos discos de oximino- $\beta$ -lactâmicos com o disco de amoxicilina com ácido clavulânico, para detecção do sinergismo característico da presença da BLEA (Jarlier *et al*, 1988).

O método de adição de ácido clavulânico consiste na adição de 10 $\mu$ L de solução do inibidor clássico das  $\beta$ -lactamases, ácido clavulânico (1000 $\mu$ g/mL) aos discos de cefalosporinas de terceira geração, cefotaxima (30 $\mu$ g) e ceftazidima (30 $\mu$ g), de acordo com as directivas do CLSI, e/ou aztreonamo (30 $\mu$ g). A presença da  $\beta$ -lactamase é detectada pelo aumento do halo de inibição no disco de antibiótico com inibidor das  $\beta$ -lactamases, igual ou superior a 5mm, comparativamente ao respectivo disco de antibiótico sem inibidor (CLSI, 2007). O controlo de qualidade negativo do ensaio consistiu na utilização de um disco branco sem inibidor das  $\beta$ -lactamases e um disco branco com 10 $\mu$ L do inibidor para verificar possível acção inibitória intrínseca. A adição de ácido clavulânico aos discos de antibiótico e disco de controlo foi realizada 30 minutos antes da colocação dos mesmos no meio de Müller-Hinton (CLSI, 2007).

O ensaio de adição de ácido clavulânico aos discos de oximino- $\beta$ -lactâmicos foi realizado nos casos em que não foi possível detectar resultado positivo no ensaio de DDST.

## 5 – Detecção de Outros Mecanismos de resistência: metalo- $\beta$ -lactamases

A presença de metalo- $\beta$ -lactamases é detectada pelo perfil de resistência aos carbapenemos, nomeadamente ao imipenemo, utilizado no *screening* inicial de susceptibilidade aos antimicrobianos.

A confirmação da presença de metalo- $\beta$ -lactamase foi efectuada com utilização dos seguintes discos de antibiótico: imipenemo (10 $\mu$ g) e imipenemo com EDTA (0,5M). O aumento do halo de inibição de crescimento à volta do disco de imipenemo com EDTA (0,5M), comparativamente ao disco de imipenemo, igual ou superior a 4mm, é sugestivo da presença de metalo- $\beta$ -lactamase.

O controlo negativo do ensaio consistiu na utilização de um disco branco e um disco com 10 $\mu$ L de EDTA (0,5M), de forma a garantir a fiabilidade dos resultados. A solução de EDTA (0,5M) foi adicionada aos respectivos discos num intervalo de tempo de 30 minutos anteriores à execução do ensaio.

## 6 – Caracterização Bioquímica das $\beta$ -lactamases

As estirpes produtoras de BLEA foram sujeitas a caracterização bioquímica das enzimas por focagem isoeléctrica para determinação do pI.

### 6.1 - Preparação do Extracto Bruto

Os isolados bacterianos seleccionados foram inoculados em 40mL de meio de TSB (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) e incubados *over-night* a 37°C. Após o referido período de incubação, a cultura foi centrifugada a 3800 rpm, durante 10 minutos a 4°C (SIGMA 6K15, Sigma-Aldrich, Osterode am Harz, Alemanha). O sobrenadante foi rejeitado e adicionou-se ao “*pellet*” 20mL de água destilada estéril, para lavagem das células. Após serem submetidas novamente a um processo de centrifugação nas mesmas condições de operação descritas, o sobrenadante foi rejeitado e o sedimento, juntamente com a água destilada que permanece na parede do tubo constitui o

extracto bruto da amostra. O extracto bruto foi transferido para *ependorfs* estéreis e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 6.2 - Avaliação Prévia do Extracto Bruto

De forma a avaliar o extracto bruto da amostra, foi realizado um ensaio prévio com solução de cefalosporina cromogénica, Nitrocefina ( $500\mu\text{L}/\text{mL}$ ) (Oxoid, Hampshire, Reino Unido). O extracto bruto da amostra,  $10\mu\text{L}$ , foi testado com igual quantidade da solução de Nitrocefina. Na presença de espécies produtoras de  $\beta$ -lactamases, o anel  $\beta$ -lactâmico da cefalosporina cromogénica é hidrolisado pela  $\beta$ -lactamase. O resultado é visualizado pela mudança de cor da solução de amarelo para laranja/vermelho, num período de tempo igual ou inferior a 10 segundos, evidência da actividade  $\beta$ -lactamásica do extracto.

Os extractos brutos da amostra com tempos de reacção superiores a 10 segundos foram sujeitos a choque térmico. Os cinco ciclos de congelação-descongelação foram efectuados, às temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $37^{\circ}\text{C}$ , de forma a proporcionar a libertação das  $\beta$ -lactamases presentes no espaço periplasmático. Outra abordagem efectuada aos extractos brutos, com tempos de reacção superiores a 10 segundos, consistiu na inoculação em meio de TSB com antibiótico  $\beta$ -lactâmico de selecção, cefotaxima e/ou ceftazidima.

Os extractos brutos com tempos de reacção igual ou inferior a 10 segundos foram sujeitos a focagem isoelectrica para caracterização bioquímica das  $\beta$ -lactamases.

## 6.3 - Determinação do Ponto Isoeléctrico das $\beta$ -lactamases

A determinação do pI das  $\beta$ -lactamases por focagem isoelectrica foi realizada no sistema *Phast System* (Pharmacia, Uppsala, Suécia), através da utilização de gel comercial de poliactilamida, contendo anfólitos com gradiente de pH entre 3 a 9 (PhastGel IEF 3-9, Pharmacia, Uppsala, Suécia).

Após focagem isoelectrica, as bandas de  $\beta$ -lactamases foram reveladas através da aplicação directa sobre o gel de poliacrilamida de solução de Nitrocefina (500 $\mu$ g/mL). Os padrões de extractos brutos utilizados provenientes de estirpes produtoras de  $\beta$ -lactamases com pI conhecidos foram os seguintes: TEM-1 (pI=5,4); SHV-1 (pI=7,6); MIR-1 (pI=8,4).

## **7 – Transferência de genes de resistência por Conjugação Bacteriana**

### **7.1 - Selecção das espécies dadoras**

Com o intuito de avaliar a capacidade de transferência de genes codificadores de BLEA, realizou-se a avaliação da capacidade de transferência por conjugação. Um conjunto de isolados produtores de BLEA representativos foi seleccionado com resistência superior à cefotaxima relativamente à ceftazidima e sensibilidade à estreptomicina. Como espécie receptora de plasmídeos conjugativos utilizou-se a *Escherichia coli* HB101, não fermentadora da lactose, resistente à estreptomicina.

### **7.2 - Controlo do ensaio**

O controlo dos meios de cultura contendo antibiótico consistiu no isolamento das espécies dadoras em meio de MacConkey com cefotaxima (2 $\mu$ g/mL) e a espécie receptora em meio de MacConkey com estreptomicina (500 $\mu$ g/mL), de forma a verificar a presença de crescimento e o inverso. O controlo negativo foi verificado pela ausência de crescimento da espécie dadora e receptora no meio de MacConkey com estreptomicina (500 $\mu$ g/mL) e cefotaxima (2 $\mu$ g/mL).

### 7.3 - Conjugação bacteriana

As espécies, dadoras e receptoras, foram inoculadas em 20mL de meio de TSB e incubadas *over night* a 37°C. O encontro entre as duas espécies foi promovido em meio de Müeller-Hinton, onde se colocou igual volume das duas (100 $\mu$ L) na superfície do meio. A partir do crescimento obtido, após o período de incubação de 24h a 37°C, fez-se uma suspensão densa em 1mL de soro fisiológico estéril. Desta suspensão, retirou-se 100 $\mu$ L e plaqueou-se, pela técnica de espalhamento, no meio de MacConkey com estreptomicina (500 $\mu$ g/mL) e cefotaxima (2 $\mu$ g/mL).

O crescimento dos transconjugantes, não fermentadores da lactose com resistência à estreptomicina (500 $\mu$ g/mL) e cefotaxima (2 $\mu$ g/mL), no referido meio de cultura selectivo, foi verificado após incubação de 24h a 37°C.

### 7.4 - Selecção dos transconjugantes e confirmação de presença da BLEA

As colónias não fermentadoras da lactose resistentes aos antibióticos de selecção, estreptomicina (500 $\mu$ g/mL) e cefotaxima (2 $\mu$ g/mL) incorporados no meio de MacConkey, foram reisoladas no referido meio de selecção, para verificar o crescimento e confirmar a morfologia da colónia transconjugante.

A confirmação da transferência da BLEA por conjugação foi realizada através de antibiograma para detecção da BLEA e determinação do pI do transconjugante por focagem isoeléctrica. Comparou-se com o antibiograma e pI da espécie dadora, de forma a comprovar a presença de BLEA nos transconjugantes.

## **RESULTADOS**

---

A recolha das amostras de fezes, não repetidas, de residentes de lares de idosos da zona norte do País, foi realizada entre Janeiro e Julho de 2008.

Foram estudadas 184 amostras de fezes provenientes de residentes dos lares de idosos, nomeadamente: lar FFUP1 - 9 amostras; FFUP2 - 21 amostras; FFUP3 - 37 amostras; FFUP4 - 25 amostras; FFUP5 - 51 amostras; FFUP6 - 41 amostras.

O estudo permitiu detectar 58 isolados de bacilos de Gram negativo produtores de BLEA da família *Enterobacteriaceae*, colonizadores do tracto intestinal de residentes autónomos e dependentes nos seis lares de idosos. Na tabela 2 encontra-se o número de amostras de fezes provenientes de cada lar de idosos e respectivo número de isolados produtores de BLEA, não repetidos, detectados no presente estudo.

**Tabela 2** - Amostras de fezes provenientes dos lares de idosos e respectivo número de isolados produtores de BLEA detectados

Lar de idosos	Amostras de fezes	Isolados produtores de BLEA
FFUP1	9	1
FFUP2	21	1
FFUP3	37	1
FFUP4	25	2
FFUP5	51	42
FFUP6	41	11

Embora, não fosse objectivo do estudo detectou-se a presença de 15 isolados bacterianos produtores de carbapenemases do tipo metalo- $\beta$ -lactamases em amostras provenientes de três lares de idosos, nomeadamente quatro isolados bacterianos no lar FFUP3, sete isolados bacterianos no lar FFUP5 e quatro isolados bacterianos no lar FFUP6.

## 1 – Caracterização dos lares de Idosos

Os seis lares de idosos FFUP1, FFUP2, FFUP3, FFUP4, FFUP5 e FFUP6, foram seleccionados aleatoriamente na zona norte do País. As instituições distinguem-se quanto ao número de residentes dependentes e autónomos e características inerentes à prestação de cuidados de saúde como hospitalização, procedimentos médicos e técnicas invasivas de diagnóstico e terapêutica e consumo de antibióticos.

Os lares FFUP1, FFUP2 e FFUP3 caracterizam-se pela presença de maior número de residentes autónomos comparativamente aos residentes dependentes. As três instituições apresentam serviço médico e de enfermagem (regime diurno), porém os residentes costumam recorrer às instituições hospitalares, quando necessário. Aquando da recolha de amostras no lar FFUP3, alguns residentes dependentes tiveram hospitalizações recentes, assim como um dos residentes dependentes do lar FFUP1.

O lar FFUP4 apresenta maior número de residentes dependentes do que autónomos, comparativamente aos lares de idosos referidos anteriormente. Nesta instituição, com serviço médico e de enfermagem (regime diurno e nocturno), existe uma política restrita do consumo de antibióticos, assim como evitam recorrer a serviços hospitalares.

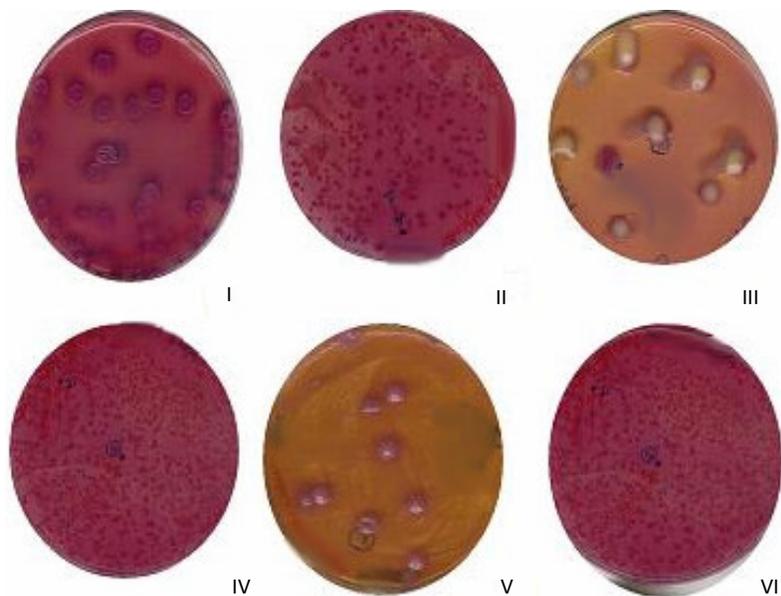
Os lares de idosos FFUP5 e FFUP6 diferenciam-se das restantes pelo elevado número de residentes dependentes, os quais se encontram separados, relativamente ao espaço físico da instituição, dos residentes autónomos. Os residentes dependentes destas instituições apresentam elevado grau de debilidade, procedimentos médicos e técnicas invasivas e elevado consumo de antibióticos, particularmente o lar FFUP5. Nestas instituições de saúde existem equipas de enfermagem de forma a assegurar a prestação de cuidados de saúde aos residentes, particularmente aos mais debilitados.

## **2 – Contagem de UFC/mL nos meios de cultura de MacConkey e MacConkey selectivo com antibiótico $\beta$ -lactâmico**

Os bacilos de Gram negativo da família *Enterobacteriaceae* produtores de BLEA, apresentam resistência ou redução da susceptibilidade aos oximino- $\beta$ -lactâmicos, nomeadamente cefotaxima e ceftazidima, e/ou aztreonamo. Utilizou-se para detecção destas espécies produtoras de BLEA, meios de cultura de MacConkey contendo antibiótico  $\beta$ -lactâmico de selecção adequado.

A inoculação das amostras de fezes a partir do caldo BHI em meio de MacConkey com antibiótico de selecção sofreu a adição de outros meios de selecção, no decorrer do estudo. Aos meios de cultura de MacConkey com antibiótico, cefotaxima (2 $\mu$ g/mL) e ceftazidima (2 $\mu$ g/mL) utilizados nas primeiras abordagens metodológicas, nomeadamente lar FFUP1, FFUP2 e FFUP3, adicionou-se meios de MacConkey com aztreonamo (2 $\mu$ g/mL) e imipenemo (2 $\mu$ g/mL). O objectivo consistiu em aumentar a probabilidade de detecção de espécies bacterianas resistentes aos respectivos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos incorporados no meio de cultura, que não seja detectada nos meios de cultura selectivos com cefotaxima e ceftazidima.

Aos meios de cultura inoculados para cada amostra, após o período de incubação de 24 a 48h a 37°C, efectuou-se contagem do crescimento bacteriano, sendo os resultados expressos em UFC/mL. A figura 5 ilustra um exemplo típico do crescimento bacteriano, amostra FFUP521 do lar FFUP5, nos meios de cultura de MacConkey com antibiótico  $\beta$ -lactâmico adequado à selecção de estirpes produtoras de BLEA.



**Figura 5** - Aspecto macroscópico do crescimento bacteriano em meio de MacConkey com antibiótico  $\beta$ -lactâmico de selecção. I - colónias fermentadoras da lactose em meio de MacConkey com cefotaxima ( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ) proveniente do sobrenadante do caldo BHI; II - colónias fermentadoras da lactose em meio de MacConkey com ceftazidima ( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ) proveniente do sobrenadante do caldo BHI; III - colónias fermentadoras da lactose em meio de MacConkey aztreonamo ( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ) proveniente do sobrenadante do caldo BHI; IV - colónias fermentadoras da lactose em meio de MacConkey cefotaxima ( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ) proveniente do sedimento do caldo BHI; V - colónias fermentadoras da lactose em meio de MacConkey ceftazidima ( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ) proveniente do sedimento do caldo BHI; VI - colónias fermentadoras da lactose em meio de MacConkey aztreonamo ( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ) proveniente do sedimento do caldo BHI.

Os resultados da contagem de UFC/mL de fermentadores da lactose em meio de MacConkey e meio de MacConkey com antibiótico cefotaxima ( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ceftazidima ( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ), aztreonamo ( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e imipenemo ( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para as amostras provenientes dos seis lares de idosos, são apresentados respectivamente nas tabelas 3 a 8. A contagem de UFC/mL de não fermentadores da lactose oxidase positivo e presença de leveduras é apresentada nas referidas tabelas.

## 2.1 - Lar FFUP1

Os resultados obtidos da contagem de UFC/mL da inoculação das 9 amostras de fezes provenientes de residentes do lar FFUP1 em meio de MacConkey e meio de MacConkey selectivo com cefotaxima (2µg/mL) e ceftazidima (2µg/mL) encontram-se na tabela 3.

**Tabela 3** - Resultado da contagem de UFC/mL nas amostras do lar FFUP1

Amostra	UFC/mL				
	mac 1/10S	mac c/ CTX (2µg/mL)		mac c/ CAZ (2µg/mL)	
		S	sed	S	Sed
FFUP101	100 lac <sup>+</sup>	0	3 lac <sup>-</sup>	0	0
FFUP102	150 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	200 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	280 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	0
FFUP103	100 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	leveduras	0	0
FFUP104	70 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP105	80 lac <sup>+</sup>	1 lac <sup>+</sup>	0	3 lac <sup>+</sup>	1 lac <sup>+</sup>
FFUP106	300 lac <sup>+</sup>	10 lac <sup>+</sup>	0	2 lac <sup>+</sup>	4 lac <sup>+</sup>
FFUP107	50 lac <sup>+</sup>	18 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	15 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	2 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>
FFUP108	300 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP109	100 lac <sup>+</sup>	leveduras	leveduras	leveduras	leveduras

**Legenda:** mac 1/10S - diluição 1/10 do sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2µg/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2µg/mL); mac c/ CAZ (2µg/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2µg/mL); mac c/ ATM (2µg/mL) - meio de MacConkey com aztreonamo (2µg/mL); mac c/ IMP (2µg/mL) - meio de MacConkey com imipenemo (2µg/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed - sedimento do caldo BHI; lac<sup>+</sup> - colónias fermentadores da lactose; lac<sup>-</sup> - colónias não fermentadores da lactose; Ox<sup>+</sup> - Oxidase positivo; 0 - ausência de crescimento bacteriano.

## 2.2 - Lar FFUP2

Os resultados obtidos da contagem de UFC/mL, em meio de MacConkey e MacConkey contendo cefotaxima (2µg/mL) e ceftazidima (2µg/mL), respectivamente para as 21 amostras de fezes provenientes dos residentes do lar FFUP2, encontram-se na tabela 4.

**Tabela 4** - Resultado da contagem de UFC/mL nas amostras do lar FFUP2

Amostra	UFC/mL				
	mac 1/10 S	mac c/CTX (2µg/mL)		mac c/CAZ (2µg/mL)	
		S	sed	S	sed
FFUP201	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	20 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	0
FFUP202	300 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP203	300 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP204	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	5 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	4 lac <sup>+</sup> leveduras
FFUP205	300 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP206	300 lac <sup>+</sup>	0	10 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup> leveduras	0	0
FFUP207	300 lac <sup>+</sup>	0	10 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup> leveduras	0	0
FFUP208	350 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP209	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP210	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	» 300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	0
FFUP211	180 lac <sup>+</sup> e lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP212	100 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP213	100 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP214	100 lac <sup>+</sup>	0	5 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	0
FFUP215	100 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP216	100 lac <sup>+</sup>	3 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	4 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	0
FFUP217	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP218	300 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP219	100 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	0	0
FFUP220	300 lac <sup>+</sup>	leveduras	leveduras	1 lac <sup>+</sup>	3 lac <sup>+</sup>
FFUP221	149 lac <sup>+</sup>	3 lac <sup>+</sup>	3 lac <sup>+</sup>	0	0

**Legenda:** mac 1/10S - diluição 1/10 do sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2µg/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2µg/mL); mac c/ CAZ (2µg/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2µg/mL); mac c/ ATM (2µg/mL) - meio de MacConkey com aztreonam (2µg/mL); mac c/ IMP (2µg/mL) - meio de MacConkey com imipenem (2µg/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed - sedimento do caldo BHI; lac<sup>+</sup> - colónias fermentadores da lactose; lac<sup>-</sup> - colónias não fermentadores da lactose; Ox<sup>+</sup> - Oxidase positivo; 0 - ausência de crescimento bacteriano.

### 2.3 - Lar FFUP3

A contagem de UFC/mL nos meios de cultura encontram-se discriminadas na tabela 5, respectivamente para as amostras de fezes dos residentes do lar FFUP3. As 37 amostras foram inoculadas nos meios de MacConkey e MacConkey contendo cefotaxima (2µg/mL) e ceftazidima (2µg/mL).

**Tabela 5 - Resultado da contagem de UFC/mL nas amostras do lar FFUP3**

Amostra	UFC/mL				
	mac 1/10 S	mac c/ CTX (2µg/mL)		mac c/ CAZ (2µg/mL)	
		S	sed	S	sed
FFUP301	300 lac <sup>+</sup>	2 lac <sup>+</sup> , colônias satélite lac <sup>+</sup>	0	1 c lac <sup>+</sup>	0
FFUP302	300 lac <sup>+</sup>	48 lac <sup>+</sup>	0	30 lac <sup>+</sup>	15 lac <sup>+</sup>
FFUP303	300 lac <sup>+</sup>	0	10 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup> leveduras	4 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	8 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>
FFUP304	9 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP305	346 lac <sup>+</sup>	leveduras	leveduras	0	leveduras
FFUP306	300 lac <sup>+</sup>	0	0	19 lac <sup>+</sup>	0
FFUP307	300 lac <sup>+</sup>	0	19 lac <sup>-</sup>	10 lac <sup>+</sup>	leveduras
FFUP308	300 lac <sup>+</sup>	10 lac <sup>+</sup>	4 lac <sup>+</sup> leveduras	20 lac <sup>+</sup>	4 lac <sup>+</sup> leveduras
FFUP309	70 lac <sup>+</sup>	0	0	0	leveduras
FFUP310	300 lac <sup>+</sup>	0	30 lac <sup>+</sup>	0	3 lac <sup>+</sup>
FFUP311	300 lac <sup>+</sup>	0	4 lac <sup>+</sup>	0	6 lac <sup>+</sup>
FFUP312	300 lac <sup>+</sup>	0	5 lac <sup>+</sup>	0	2 lac <sup>+</sup>
FFUP313	300 lac <sup>+</sup>	1 lac <sup>+</sup>	12 lac <sup>+</sup>	0	137 lac <sup>+</sup>
FFUP314	315 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP315	300 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP316	300 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP317	200 lac <sup>+</sup>	0	2 lac <sup>+</sup>	0	0
FFUP318	300 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	0	0
FFUP319	40 lac <sup>+</sup>	0	200 lac <sup>+</sup>	0	0
FFUP320	300 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP321	300 lac <sup>+</sup>	28 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	0	1 lac <sup>+</sup>
FFUP322	200 lac <sup>+</sup>	2 lac <sup>+</sup>	20 lac <sup>+</sup>	0	21 lac <sup>+</sup>
FFUP323	300 lac <sup>+</sup>	1 lac <sup>+</sup>	3 lac <sup>+</sup>	0	0
FFUP324	300 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP325	200 lac <sup>+</sup>	0	200 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	0
FFUP326	300 lac <sup>+</sup>	0	56 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	0
FFUP327	4 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP328	300 lac <sup>+</sup>	0	0	1 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	31 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>
FFUP329	234 lac <sup>+</sup> , 45 lac <sup>-</sup>	147 lac <sup>+</sup>	78 lac <sup>+</sup> 45 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	4 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>
FFUP330	100 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP331	150 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP332	256 lac <sup>+</sup>	46 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	30 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	20 lac <sup>+</sup>
FFUP333	200 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP334	8 lac <sup>+</sup>	0	5 lac <sup>+</sup>	0	0
FFUP335	300 lac <sup>+</sup>	leveduras	leveduras	leveduras	leveduras
FFUP336	300 lac <sup>+</sup>	1 lac <sup>+</sup>	50 lac <sup>+</sup>	0	0
FFUP337	300 lac <sup>+</sup>	0	0	leveduras	0

**Legenda:** mac 1/10S - diluição 1/10 do sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2µg/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2µg/mL); mac c/ CAZ (2µg/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2µg/mL); mac c/ ATM (2µg/mL) - meio de MacConkey com aztreonamo (2µg/mL); mac c/ IMP (2µg/mL) - meio de MacConkey com imipenemo (2µg/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed - sedimento do caldo BHI; lac<sup>+</sup> - colônias fermentadores da lactose; lac<sup>-</sup> - colônias não fermentadores da lactose; Ox<sup>+</sup> - Oxidase positivo; 0 - ausência de crescimento bacteriano.

No crescimento bacteriano da amostra FFUP301 em meio de MacConkey selectivo com cefotaxima inoculado a partir da porção do sobrenadante da amostra no caldo BHI, verificou-se crescimento de duas colónias fermentadoras da lactose morfológicamente iguais e várias colónias fermentadoras da lactose de tamanho pequeno a circundar as duas colónias fermentadoras. Este fenómeno designado de satelitismo deve-se à degradação do antibiótico presente no meio de MacConkey pelas duas colónias fermentadoras. As colónias de tamanho pequeno crescem junto das duas colónias fermentadoras, devido à redução da concentração de antibiótico de selecção no meio de MacConkey, quando re-isoladas no respectivo meio com antibiótico não têm capacidade de crescer uma vez que são sensíveis ao antibiótico.

## 2.4 - Lar FFUP4

As 25 amostras provenientes dos residentes do lar FFUP4 foram inoculadas em meio de MacConkey e MacConkey selectivo com cefotaxima (2µg/mL), ceftazidima (2µg/mL) e aztreonamo (2µg/mL). As UFC/mL são referidas na tabela 6.

**Tabela 6** - Resultado da contagem de UFC/mL nas amostras do lar FFUP4

Amostra	UFC/mL						
	mac 1/10 S	mac c/ CTX (2µg/mL)		mac c/ CAZ (2µg/mL)		mac c/ ATM (2µg/mL)	
		S	sed	S	sed	S	sed
FFUP401	167 lac <sup>+</sup>	24 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	42 lac <sup>+</sup>	»300 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP402	255 lac <sup>+</sup>	0	Leveduras	0	Leveduras	ni	ni
FFUP403	289 lac <sup>+</sup>	0	Leveduras	0	Leveduras	ni	ni
FFUP404	124 lac <sup>+</sup> e 34 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	0	0	0	ni	ni
FFUP405	200 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	ni	ni
FFUP406	455 lac <sup>+</sup>	3 lac <sup>+</sup>	9 lac <sup>+</sup>	0	0	ni	ni
FFUP407	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	9 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	ni	ni
FFUP408	137 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	ni	ni
FFUP409	200 lac <sup>+</sup>	leveduras	Leveduras	0	leveduras	ni	ni
FFUP410	250 lac <sup>+</sup>	Leveduras	5 lac <sup>+</sup>	0	4 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP411	296 lac <sup>+</sup> e lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	69 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	100 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	leveduras	ni	ni
FFUP412	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	28 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup> leveduras	2 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP413	159 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	31 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	30 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	0	ni	ni
FFUP414	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	21 lac <sup>+</sup> , leveduras	9 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP415	90 lac <sup>+</sup> e 55 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	200 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	50 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	leveduras	ni	ni

Amostra	UFC/mL						
	mac 1/10 S	mac c/ CTX (2µg/mL)		mac c/ CAZ (2µg/mL)		mac c/ ATM (2µg/mL)	
		S	sed	S	sed	S	sed
FFUP416	300 lac <sup>+</sup>	148 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	40 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	0	ni	ni
FFUP417	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	300 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	5 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	4 lac <sup>-</sup>	10 lac <sup>-</sup> 2 lac <sup>+</sup>
FFUP418	478 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0
FFUP419	139 lac <sup>+</sup>	50 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	3 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP420	80 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0
FFUP421	168 lac <sup>+</sup>	Incontável lac <sup>-</sup>	Incontável lac <sup>-</sup>	0	Incontável lac <sup>-</sup>	0	0
FFUP422	237 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0
FFUP423	300 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0
FFUP424	300 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0
FFUP425	340 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0

**Legenda:** mac 1/10S - diluição 1/10 do sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2µg/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2µg/mL); mac c/ CAZ (2µg/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2µg/mL); mac c/ ATM (2µg/mL) - meio de MacConkey com aztreonamo (2µg/mL); mac c/ IMP (2µg/mL) - meio de MacConkey com imipenemo (2µg/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed - sedimento do caldo BHI; lac<sup>+</sup> - colónias fermentadores da lactose; lac<sup>-</sup> - colónias não fermentadores da lactose; Ox<sup>+</sup> - Oxidase positivo; 0 - ausência de crescimento bacteriano; ni - meio não inoculado.

## 2.5 - Lar FFUP5

As 51 amostras de fezes de residentes do lar FFUP5 foram inoculadas no meio de MacConkey e nos quatro meios de MacConkey com antibiótico: cefotaxima (2µg/mL), ceftazidima (2µg/mL), aztreonamo (2µg/mL) e imipenemo (2µg/mL). A contagem das UFC/mL são mencionadas na tabela 7.

**Tabela 7** - Resultado da contagem de UFC/mL nas amostras do lar FFUP5

Amostra	UFC/mL								
	mac 1/10 S	mac c/ CTX (2µg/mL)		mac c/ CAZ (2µg/mL)		mac c/ ATM (2µg/mL)		mac c/ IPM (2µg/mL)	
		S	sed	S	sed	S	sed	S	sed
FFUP501	120 lac <sup>+</sup>	0	5	0	0	0	0	ni	ni
FFUP502	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	»300 lac <sup>+</sup>	1 lac <sup>+</sup>	8 lac <sup>+</sup>	150 lac <sup>+</sup>	150 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP503	300 lac <sup>+</sup>	0	30 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	ni	ni
FFUP504	»300 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	Incontável lac <sup>+</sup>	0	20 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	80 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP505	200 lac <sup>+</sup>	150 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	4 lac <sup>+</sup>	23 lac <sup>+</sup>	58 lac <sup>+</sup>	70 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP506	60 lac <sup>+</sup>	0	30 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	ni	ni
FFUP507	68 lac <sup>+</sup>	0	100 lac <sup>+</sup>	0	15 lac <sup>+</sup>	0	0	ni	ni
FFUP508	300 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	159 lac <sup>+</sup> , 47 lac <sup>-</sup>	ni	ni
FFUP509	51 lac <sup>-</sup>	33 lac <sup>-</sup>	80 lac <sup>-</sup>	30 lac <sup>-</sup>	100 lac <sup>-</sup>	40 lac <sup>-</sup>	0	ni	ni
FFUP510	40 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	0	ni	ni
FFUP511	300 lac <sup>+</sup>	3 lac <sup>+</sup>	5 lac <sup>+</sup>	3 lac <sup>+</sup>	0	0	0	ni	ni

Amostra	UFC/mL								
	mac 1/10 S	mac c/ CTX (2µg/mL)		mac c/ CAZ (2µg/mL)		mac c/ ATM (2µg/mL)		mac c/ IPM (2µg/mL)	
		S	sed	S	sed	S	sed	S	sed
FFUP512	200 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP513	40 lac <sup>+</sup>	70 lac <sup>+</sup>	70 lac <sup>+</sup>	70 lac <sup>+</sup>	70 lac <sup>+</sup>	70 lac <sup>+</sup>	70 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP514	300 lac <sup>+</sup>	245 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	369 lac <sup>+</sup>	345 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP515	250 lac <sup>+</sup>	3 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	ni	ni
FFUP516	8 lac <sup>+</sup>	0	13 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	ni	ni
FFUP517	250 lac <sup>+</sup>	55 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	80 lac <sup>+</sup>	»200 lac <sup>+</sup>	52 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP518	70 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	150 lac <sup>+</sup>	80 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	70 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP519	300 lac <sup>+</sup>	50 lac <sup>+</sup> , Ox <sup>+</sup>	80 lac <sup>+</sup> Ox <sup>+</sup> , 20 lac <sup>+</sup>	0	80 lac <sup>+</sup> , Ox <sup>+</sup>	50 lac <sup>+</sup> , Ox <sup>+</sup>	50 lac <sup>+</sup> Ox <sup>+</sup> , 1 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP520	300 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	33 lac <sup>+</sup>	96 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	120 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP521	300 lac <sup>+</sup>	167 lac <sup>+</sup>	Incontável lac <sup>+</sup> , lac <sup>+</sup> , Ox <sup>+</sup>	47 lac <sup>+</sup>	203 lac <sup>+</sup> , Ox <sup>+</sup>	9 lac <sup>+</sup>	134 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP522	156 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP523	200 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0	ni	ni
FFUP524	269 lac <sup>-</sup>	200 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	100 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	200 lac <sup>-</sup>	100 lac <sup>-</sup>	150 lac <sup>-</sup>	100 lac <sup>-</sup>	ni	ni
FFUP525	200 lac <sup>-</sup>	270 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	190 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	200 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	100 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	100 lac <sup>-</sup>	34 lac <sup>-</sup> , 57 lac <sup>-</sup> , Ox <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP526	200 lac <sup>+</sup>	10 lac <sup>+</sup>	50 lac <sup>+</sup>	23 lac <sup>+</sup>	34 lac <sup>+</sup>	17 lac <sup>+</sup>	30 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP527	136 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	178 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP528	200 lac <sup>-</sup>	3 lac <sup>-</sup>	0	0	0	0	0	ni	ni
FFUP529	268 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0	ni	ni
FFUP530	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	149 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	150 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP531	300 lac <sup>+</sup>	340 lac <sup>+</sup>	37 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	30 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	45 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	0
FFUP532	100 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	0	150 lac <sup>+</sup>	50 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	50 lac <sup>+</sup>
FFUP533	300 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	0	4 lac <sup>+</sup>
FFUP534	237 lac <sup>+</sup>	13 lac <sup>+</sup>	30 lac <sup>+</sup>	25 lac <sup>+</sup>	40 lac <sup>+</sup>	20 lac <sup>+</sup>	42 lac <sup>+</sup>	0	0
FFUP535	184 lac <sup>+</sup>	2	Incontável lac <sup>+</sup>	8 lac <sup>+</sup>	0 lac <sup>+</sup>	14 lac <sup>+</sup>	0	20 lac <sup>+</sup>	0
FFUP536	378 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	0	0
FFUP537	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	120 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	370 lac <sup>+</sup>	150 lac <sup>-</sup>	0
FFUP538	300 lac <sup>+</sup>	345 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	190 lac <sup>+</sup> , leveduras	380 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	10 lac <sup>+</sup>	3 lac <sup>+</sup>
FFUP539	300 lac <sup>+</sup>	240 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	234 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	170 lac <sup>+</sup>	0
FFUP540	300 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	120 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	150 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	150 lac <sup>+</sup>	0
FFUP541	300 lac <sup>+</sup>	106 lac <sup>+</sup>	70 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	90 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	50 lac <sup>+</sup>	Incontável lac <sup>+</sup>	0
FFUP542	300 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	206 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	260 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	0	0
FFUP543	300 lac <sup>+</sup>	150 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	150 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	150 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	0	0
FFUP544	249 lac <sup>+</sup>	0	0	0	leveduras	25 lac <sup>+</sup>	leveduras	0	leveduras
FFUP545	300 lac <sup>+</sup>	0	0, leveduras	0	leveduras	0	2 lac <sup>+</sup> , leveduras	0	0
FFUP546	189 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0	0	1 lac <sup>+</sup>
FFUP547	300 lac <sup>+</sup>	0	14 lac <sup>+</sup>	2 lac <sup>+</sup>	8 lac <sup>+</sup>	1 lac <sup>+</sup>	0	2 lac <sup>+</sup>	0
FFUP548	113 lac <sup>+</sup>	0	1 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0
FFUP549	300 lac <sup>+</sup>	70 lac <sup>+</sup>	134 lac <sup>+</sup>	1 lac <sup>+</sup>	leveduras	0	0	100 lac <sup>+</sup>	0
FFUP550	143 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
FFUP551	300 lac <sup>+</sup>	9 lac <sup>+</sup>	8 lac <sup>+</sup>	12 lac <sup>+</sup>	5 lac <sup>+</sup>	4 lac <sup>+</sup>	8 lac <sup>+</sup>	0	0

**Legenda:** mac 1/10S - diluição 1/10 do sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2µg/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2µg/mL); mac c/ CAZ (2µg/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2µg/mL); mac c/ ATM (2µg/mL) - meio de MacConkey com aztreonamo (2µg/mL); mac c/ IMP (2µg/mL) - meio de MacConkey com imipenemo (2µg/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed -

sedimento do caldo BHI; lac<sup>+</sup> - colónias fermentadores da lactose; lac<sup>-</sup> - colónias não fermentadores da lactose; Ox<sup>+</sup> - Oxidase positivo; 0 - ausência de crescimento bacteriano; ni - meio não inoculado.

## 2.6 - Lar FFUP6

Na abordagem experimental das 41 amostras de fezes dos residentes do lar FFUP6, empregou-se o meio de MacConkey e os quatro meios de MacConkey selectivos com antibiótico: cefotaxima (2µg/mL); ceftazidima (2µg/mL); aztreonamo (2µg/mL) e imipenemo (2µg/mL) (tabela 8). O resultado da contagem de UFC/mL encontra-se na tabela VIII.

**Tabela 8** - Resultado da contagem de UFC/mL nas amostras do lar FFUP6

Amostra	UFC/mL								
	mac 1/10 S	mac c/ CTX (2µg/mL)		mac c/ CAZ (2µg/mL)		mac c/ ATM (2µg/mL)		mac c/ IMP (2µg/mL)	
		S	sed	S	sed	S	sed	S	sed
FFUP601	269 lac <sup>+</sup>	19 lac <sup>+</sup>	20 lac <sup>+</sup>	15 lac <sup>+</sup>	5 lac <sup>+</sup> leveduras	10 lac <sup>+</sup>	12 lac <sup>+</sup> leveduras	ni	ni
FFUP602	187 lac <sup>+</sup>	22 lac <sup>+</sup>	18 lac <sup>+</sup>	12 lac <sup>+</sup>	37 lac <sup>+</sup> leveduras	19 lac <sup>+</sup>	11 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP603	300 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	16 lac <sup>+</sup>	52 lac <sup>+</sup>	9 lac <sup>+</sup>	0	ni	ni
FFUP604	478 lac <sup>+</sup>	1 lac <sup>+</sup>	leveduras	0	0	0	leveduras	ni	ni
FFUP605	298 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0	ni	ni
FFUP606	300 lac <sup>+</sup>	8 lac <sup>+</sup>	40 lac <sup>+</sup>	13 lac <sup>+</sup>	56 lac <sup>+</sup>	16 lac <sup>+</sup>	58 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP607	330 lac <sup>+</sup>	»300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP608	300 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup> , Ox <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup> , Ox <sup>+</sup>	0	0	0	0	ni	ni
FFUP609	390 lac <sup>+</sup>	278 lac <sup>-</sup>	300 lac <sup>+</sup> , Ox <sup>+</sup>	2 lac <sup>+</sup>	4 lac <sup>+</sup>	1 lac <sup>+</sup>	30 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP610	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	2 lac <sup>+</sup>	0	1 lac <sup>+</sup>	3 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP611	306 lac <sup>+</sup>	1 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	ni	ni
FFUP612	300 lac <sup>+</sup>	60 lac <sup>+</sup>	36 lac <sup>+</sup>	80 lac <sup>+</sup>	50 lac <sup>+</sup>	Incontável lac <sup>+</sup>	40 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP613	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP614	300 lac <sup>+</sup>	0	leveduras	0	0	0	leveduras	ni	ni
FFUP615	355 lac <sup>+</sup>	0	2 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	ni	ni
FFUP616	327 lac <sup>+</sup>	62 lac <sup>+</sup>	56 lac <sup>+</sup>	1 lac <sup>+</sup>	0	0	0	ni	ni
FFUP617	300 lac <sup>+</sup>	150 lac <sup>+</sup>	100 lac <sup>-</sup>	150 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	150 lac <sup>+</sup>	150 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP618	300 lac <sup>+</sup>	»300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP619	300 lac <sup>+</sup>	»300 lac <sup>+</sup>	Incontável lac <sup>+</sup>	1 lac <sup>+</sup>	Incontável lac <sup>+</sup>	0	Incontável lac <sup>+</sup>	ni	ni
FFUP620	300 lac <sup>+</sup>	13 lac <sup>+</sup>	60 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	6 lac <sup>+</sup>
FFUP621	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	»300 lac <sup>+</sup>	1 lac <sup>+</sup>	4 lac <sup>+</sup>	0	0	0	2 lac <sup>+</sup>
FFUP622	300 lac <sup>+</sup>	226 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	67 lac <sup>+</sup>	189 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP623	300 lac <sup>+</sup>	189 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	90 lac <sup>+</sup>	235 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP624	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	0	0
FFUP625	285 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
FFUP626	498 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0	0	leveduras
FFUP627	300 lac <sup>+</sup>	11 lac <sup>-</sup>	Incontável lac <sup>+</sup> e lac <sup>-</sup>	0	0	0	0	0	0

Amostra	UFC/mL								
	mac 1/10 S	mac c/ CTX (2µg/mL)		mac c/ CAZ (2µg/mL)		mac c/ ATM (2µg/mL)		mac c/ IMP (2µg/mL)	
		S	sed	S	sed	S	sed	S	sed
FFUP628	300 lac <sup>+</sup>	10 lac <sup>+</sup>	167 lac <sup>+</sup>	3 lac <sup>+</sup>	21 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP629	300 lac <sup>-</sup>	1 lac <sup>-</sup>	300 lac <sup>-</sup>	leveduras	leveduras	1 lac <sup>-</sup>	0	0	0
FFUP630	330 lac <sup>+</sup>	0	10 lac <sup>+</sup>	0	8 lac <sup>+</sup>	0	6 lac <sup>+</sup>	0	0
FFUP631	386 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	Incontável lac <sup>+</sup>	5 lac <sup>+</sup>	18 lac <sup>+</sup>	0	2 lac <sup>+</sup>	0	leveduras
FFUP632	300 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	200 lac <sup>+</sup>	60 lac <sup>+</sup>	0	2 lac <sup>+</sup>	0	leveduras
FFUP633	300 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
FFUP634	300 lac <sup>+</sup>	342 lac <sup>+</sup>	Incontável lac <sup>+</sup>	378 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	288 lac <sup>+</sup>	0	10 lac <sup>+</sup>
FFUP635	200 lac <sup>+</sup>	Incontável lac <sup>+</sup>	70 lac <sup>+</sup>	14 lac <sup>+</sup>	59 lac <sup>+</sup>	0	63 lac <sup>+</sup>	0	100 lac <sup>+</sup>
FFUP636	335 lac <sup>+</sup>	Incontável lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0	0
FFUP637	200 lac <sup>+</sup>	0	19 lac <sup>+</sup>	0	0	0	1 lac <sup>+</sup>	0	0
FFUP638	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	0	26 lac <sup>+</sup>
FFUP639	300 lac <sup>+</sup>	112 lac <sup>+</sup>	50 lac <sup>+</sup>	44 lac <sup>+</sup>	150 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0
FFUP640	273 lac <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
FFUP641	250 lac <sup>+</sup>	245 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	230 lac <sup>+</sup>	300 lac <sup>+</sup>	130 lac <sup>+</sup>	0	0	0

**Legenda:** mac 1/10S - diluição 1/10 do sobrenadante do caldo BHI em meio de MacConkey; mac c/ CTX (2µg/mL) - meio de MacConkey com cefotaxima (2µg/mL); mac c/ CAZ (2µg/mL) - meio de MacConkey com ceftazidima (2µg/mL); mac c/ ATM (2µg/mL) - meio de MacConkey com aztreonamo (2µg/mL); mac c/ IMP (2µg/mL) - meio de MacConkey com imipenemo (2µg/mL); S - sobrenadante do caldo BHI; sed - sedimento do caldo BHI; lac<sup>+</sup> - colónias fermentadores da lactose; lac<sup>-</sup> - colónias não fermentadores da lactose; Ox<sup>+</sup> - Oxidase positivo; 0 - ausência de crescimento bacteriano; ni - meio não inoculado.

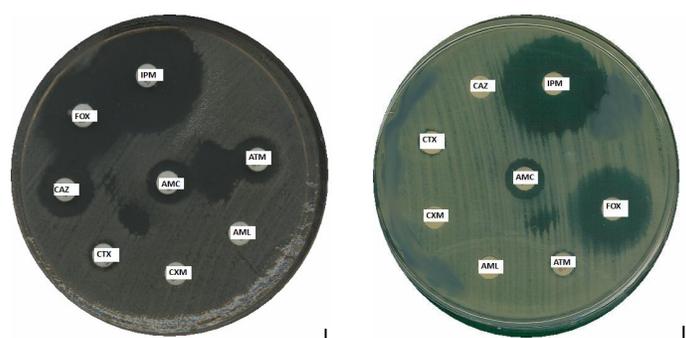
### 3 – Determinação da Susceptibilidade aos Agentes Antimicrobianos e Detecção de BLEA

A selecção de isolados representativos para estudo da resistência antimicrobiana aos antibióticos oximino-β-lactâmicos foi efectuada a partir do crescimento em meio de MacConkey com antibiótico β-lactâmico de selecção adequado. Os isolados seleccionados foram reisoladas em meio de MacConkey contendo o respectivo antibiótico de selecção inicial, de forma a certificar o crescimento e obtenção de culturas puras para teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Nos testes de susceptibilidade realizados determinou-se o diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano, após confirmação dos resultados de sensibilidade da *Escherichia coli* ATCC® 25922, a todos os antibióticos do grupo β-lactâmico e não β-lactâmicos (Anexo I).

O fenótipo característico da presença de BLEA, no teste de sensibilidade aos antimicrobianos do grupo  $\beta$ -lactâmico pelo método de difusão em agar, foi demonstrado pela acção sinérgica entre o disco de associação de amoxicilina com inibidor das  $\beta$ -lactamases, ácido clavulânico, e os discos de oximino-cefalosporinas e/ou aztreonamo. A detecção e confirmação da presença de BLEA foi efectuada pelo método de DDST e/ou método de adição de ácido clavulânico ao disco de oximino- $\beta$ -lactâmico segundo directrizes do CLSI e/ou aztreonamo.

A figura 6 ilustra dois exemplos de testes de sensibilidade aos antibióticos do grupo  $\beta$ -lactâmico realizados pelo método de difusão em agar, representativos de isolados com perfil característico da presença de BLEA.



**Figura 6** - Exemplos de testes de susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos pelo método de difusão em agar de produtores de BLEA isolados neste estudo. I - isolado FFUP517ctxsed1 (pl 5,4 + 7,4 + >8,0); II - isolado FFUP508atmsed1 (pl >8,0).

### 3.1 - Susceptibilidade aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos e detecção de BLEA

A partir dos isolados seleccionados do crescimento em meio de MacConkey com antibiótico, realizou-se teste de susceptibilidade aos antibióticos do grupo  $\beta$ -lactâmico, com o objectivo de detectar estirpes produtoras de BLEA. Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antibióticos do grupo  $\beta$ -lactâmico dos isolados seleccionados referentes a cada lar de idosos encontram-se no anexo II a VII.

A tabela 9 evidencia os 58 isolados bacterianos produtores de BLEA, não repetidos, detectados no teste de susceptibilidade aos antibióticos do grupo  $\beta$ -lactâmico pelo método de difusão em agar, DDST e/ou método de adição de ácido clavulânico aos discos de oximino-cefalosporinas, especificamente cefotaxima e ceftazidima segundo as directrizes do CLSI, e/ou aztreonamo. Na respectiva tabela menciona-se o pl referente à estirpe produtora de BLEA, estabelecido com base nos pl's conhecidos dos padrões: TEM-1 (pl=5,4); SHV-1 (pl=7,6) e MIR-1 (pl=8,4).

**Tabela 9** - Fenótipo de resistência aos antibióticos β-lactâmicos dos isolados representativos produtores de BLEA dos seis lares de idosos estudados

Amostra	Isolado	Antibiótico de Seleção	Espécie	Antibióticos β-lactâmicos (halo de inibição em mm)									Adição de Ácido Clavulânico*	pI
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX		
FFUP105	FFUP105cazS1	CAZ	<i>Citrobacter freundii</i>	6	7	7	12 Si	7 Si	na	7 Si	13	6		5,4 + >8,0
FFUP221	FFUP221ctxsed1	CTX	<i>Proteus mirabilis</i>	6	6	11	17	14 Si	na	26 Si	28	23		7,6 + >8,0
FFUP322	FFUP322ctxS1	CTX	<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	10	6	28	30	na	15	30	na	Δ <sup>CTX/CLAV</sup> <sub>5</sub>	5,4 + 7,4 + 7,6 + >8,0
FFUP401	FFUP401ctxsed2	CTX	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6	6	28	Sv	na	7 Si	Sv	Sv		>8,0
FFUP414	FFUP414cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	6	6	10 Si	8 Si	na	6 Si	26	6		5,4 + 5,6 + 7,0 + 7,4 + 7,6 + >8,0
FFUP502	FFUP502ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	15	6	14 Si	20 Si	na	18 Si	26	15		5,4 + 7,4 + >8,0
FFUP504	FFUP504atmS2	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	15	6	11 Si	14	na	17 Si	26	12		7,4 + >8,0
FFUP508	FFUP508atmsed1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	10	6	6	6	na	6 Si	26	20		>8,0
FFUP510	FFUP510ctxS1	CTX	<i>Enterobacter aerogenes</i>	6	10	6	6 Si	6	na	8 Si	21	20		5,6 + 7,2 + 7,4 + 7,6 + >8,0
FFUP511	FFUP511ctxsed1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	6	6	6	6	na	10	25	6	Δ <sup>CTX/CLAV</sup> <sub>7</sub>	>8,0
	FFUP511cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	7	6	18	19	na	31	21	20	Δ <sup>CTX/CLAV</sup> <sub>6</sub>	5,4 + 7,4 + >8,0
FFUP512	FFUP512ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	12	6	6 Si	12 Si	na	9 Si	28	20		5,4 + >8,0
FFUP513	FFUP513ctxS3	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	15	6	10 Si	15 Si	na	10 Si	32	26		5,4 + >8,0
	FFUP513cazS2	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	11	6	6 Si	14 Si	na	11 Si	28	20		5,4 + 7,4 + >8,0

**Legenda:** S - Sobrenadante; sed - sedimento; Si - sinergismo com AMC (30µg); na - não avaliado; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição do crescimento bacteriano; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; pI - ponto Isoeléctrico; Adição de Ácido Clavulânico\* - adição de ácido clavulânico ao disco de oximino-β-lactâmico; Δ<sup>CTX/CLAV</sup> - diferença estabelecida entre o halo de inibição de crescimento bacteriano do disco de CTX e o disco de CTX com ácido clavulânico; Δ<sup>CAZ/CLAV</sup> - diferença estabelecida entre o halo de inibição de crescimento bacteriano do disco de CAZ e o disco de CAZ com ácido clavulânico.

**Tabela 9** - Fenótipo de resistência aos antibióticos β-lactâmicos dos isolados representativos produtores de BLEA dos seis lares de idosos estudados (Continuação)

Amostra	Isolado	Antibiótico de Seleção	Espécie	Antibióticos β-lactâmicos (halo de inibição em mm)									Adição de Ácido Clavulânico*	pI
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX		
FFUP517	FFUP517ctxsed1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	12	6	6 Si	14 Si	na	6 Si	26	24		5,4 + 7,4 + >8,0
	FFUP517atmS1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	10	6	6	11 Si	na	9 Si	26	20		5,4 + >8,0
FFUP518	FFUP518ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	8	10	17	15	na	21	25	9	Δ <sup>CTX/CLAV</sup> 5 Δ <sup>CAZ/CLAV</sup> 6	5,4 + >8,0
	FFUP518cazS2	CAZ	<i>Proteus mirabilis</i>	6	16	16	20 Si	7 Si	na	26 Si	24	26		7,4 + >8,0
FFUP520	FFUP520ctxS1	CTX	<i>Citrobacter freundii</i>	6	10	6	6 Si	14 Si	na	10 Si	28	24		5,4 + >8,0
	FFUP520cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	9	6	6 Si	6	na	6 Si	25	20		5,4 + 7,4 + >8,0
FFUP521	FFUP521ctxS1	CTX	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	19	14 Si	19 Si	6	na	14 Si	25	19		> 8,0
	FFUP521ctxS2	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	8	6	6	6	na	7 Si	26	20	Δ <sup>CTX/CLAV</sup> 6	5,4 + >8,0
	FFUP521atmS2	ATM	<i>Enterobacter sakazakii</i>	6	9	15 Si	20 Si	6	na	14 Si	25	6		5,4 + 7,6 + >8,0
FFUP522	FFUP522cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	10	6	6 Si	12 Si	na	9 Si	26	20		5,4 + >8,0
FFUP526	FFUP526cazS1	CAZ/ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	10	6	7 Si	12 Si	na	10 Si	28	26		5,4 + 7,4 + >8,0
FFUP527	FFUP527ctxsed1	CTX	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	12	6	8 Si	14 Si	na	12 Si	28	22		5,4 + >8,0
	FFUP527cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	14	24	30	18	na	30	26	26	Δ <sup>CAZ/CLAV</sup> 5	> 8,0
FFUP530	FFUP530atmS2	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	16	6	6 Si	10 Si	na	6 Si	35	23		5,4 + >8,0
FFUP531	FFUP531ctxsed2	CTX	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	9	6	11	6	23 Si	8 Si	24	7	Δ <sup>ATM/CLAV</sup> 8	5,4 + 7,8 + >8,0
	FFUP531impS3	IMP	<i>Escherichia coli</i>	6	6	7	15 Si	6 Si	6	6	6	18 Si		5,4 + >8,0

**Legenda:** S - Sobrenadante; sed - sedimento; Si - sinergismo com AMC (30μg); na - não avaliado; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição do crescimento bacteriano; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; pI - ponto Isoelétrico; Adição de Ácido Clavulânico\* - adição de ácido clavulânico ao disco de oximino-β-lactâmico; Δ<sup>CTX/CLAV</sup> - diferença estabelecida entre o halo de inibição de crescimento bacteriano do disco de CTX e o disco de CTX com ácido clavulânico; Δ<sup>CAZ/CLAV</sup> - diferença estabelecida entre o halo de inibição de crescimento bacteriano do disco de CAZ e o disco de CAZ com ácido clavulânico.

**Tabela 9** - Fenótipo de resistência aos antibióticos β-lactâmicos dos isolados representativos produtores de BLEA dos seis lares de idosos estudados  
(Continuação)

Amostra	Isolado	Antibiótico de Seleção	Espécie	Antibióticos β-lactâmicos (halo de inibição em mm)									Adição de Ácido Clavulânico*	pI
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX		
FFUP532	FFUP532atmsed1	ATM	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	8	6	7	6	24 Si	6 Si	28	6	5,4 + 7,4 + >8,0	
	FFUP532cazS2	CAZ	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	8	6	16	12 Si	22 Si	14 Si	19	6	5,4 + 7,6 + >8,0	
FFUP533	FFUP533ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	22	6	12	12 Si	10 Si	6 Si	40	7	5,4 + 7,4 + >8,0	
FFUP534	FFUP534atmS1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	24	6	6	12 Si	11 Si	6 Si	36	24	5,4 + >8,0	
FFUP535	FFUP535cazS1	CAZ	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	7	6	8	6	26 Si	6 Si	28	7	5,4 + 7,6 + >8,0	
FFUP536	FFUP536cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	7	6	6	12 Si	14 Si	9 Si	36	25	5,4 + 7,4 + >8,0	
FFUP537	FFUP537atmsed1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	9	6	8 Si	14 Si	12 Si	12 Si	26	24	5,4 + >8,0	
FFUP538	FFUP538atmS1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	19	6	7 Si	16 Si	16 Si	15 Si	32	22	5,4 + >8,0	
FFUP539	FFUP539atmS1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	9	6	12	14	13 Si	6 Si	29	6	5,4 + 7,4 + >8,0	
	FFUP539ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	20	6	6	18	12 Si	6	38	6	5,4 + 7,4 + >8,0	
FFUP540	FFUP540atmS1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	24	6	6	8 Si	11 Si	6 Si	36	19	5,4 + >8,0	
FFUP541	FFUP541cazsed1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	16	6	8 Si	14 Si	11 Si	7 Si	26	22	5,4 + >8,0	
FFUP542	FFUP542cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	26	6	6 Si	13 Si	12 Si	6	12	25	5,4 + >8,0	
FFUP543	FFUP543cazsed1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	10	6	8 Si	14 Si	10 Si	12	Sv	22	5,4 + >8,0	
FFUP544	FFUP544atmS1	ATM	<i>Enterobacter sakazakii</i>	6	11	12	28	30	32	15	30	32	Δ <sup>ATM/CLAV</sup> 7 5,4 + 7,6 + > 8,0	

**Legenda:** S - Sobrenadante; sed - sedimento; Si - sinergismo com AMC (30µg); na - não avaliado; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição do crescimento bacteriano; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; pI - ponto Isoelétrico; Adição de Ácido Clavulânico♦ - adição de ácido clavulânico ao disco de oximino-β-lactâmico; Δ<sup>CTX/CLAV</sup> - diferença estabelecida entre o halo de inibição de crescimento bacteriano do disco de CTX e o disco de CTX com ácido clavulânico; Δ<sup>CAZ/CLAV</sup> - diferença estabelecida entre o halo de inibição de crescimento bacteriano do disco de CAZ e o disco de CAZ com ácido clavulânico.

**Tabela 9** - Fenótipo de resistência aos antibióticos β-lactâmicos dos isolados representativos produtores de BLEA dos seis lares de idosos estudados  
(Continuação)

Amostra	Isolado	Antibiótico de Seleção	Espécie	Antibióticos β-lactâmicos (halo de inibição em mm)									Adição de Ácido Clavulânico*	pI
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX		
FFUP547	FFUP547ctxsed1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	6	6	7	6	11	9	23	6	$\Delta^{CAZ/CLAV} 8$ $\Delta^{CTX/CLAV} 5$	5,4 + >8,0
FFUP551	FFUP551ctxsed1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	15	15	16 Si	14 Si	20 Si	11 Si	25	22		5,4 + >8,0
FFUP603	FFUP603ctxS2	CTX	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	7	6	6	6	na	6	25	6	$\Delta^{CTX/CLAV} 7$	5,4 + >8,0
FFUP607	FFUP607ctxS1	CTX/CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	11	6	7 Si	12 Si	14 Si	12 Si	30	26		5,4 + >8,0
FFUP612	FFUP612atmS1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	21	16	20 Si	14 Si	24 Si	16 Si	30	26		5,4 + 7,4 + >8,0
FFUP617	FFUP617ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	22	6	22 Si	16 Si	18 Si	16 Si	26	24		5,4 + 7,4 + >8,0
FFUP618	FFUP618atmS1	ATM/CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	15	6	7 Si	10 Si	12 Si	12 Si	28	24		5,4 + 7,4 + >8,0
FFUP619	FFUP619ctxsed1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	11	6	6	11 Si	10	9 Si	27	25		5,4 + 7,4 + >8,0
FFUP624	FFUP624ctxS1	CTX	<i>Enterobacter aerogenes</i>	6	10	6	6 Si	12 Si	10 Si	6 Si	Sv	6		> 8,0
FFUP634	FFUP634ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	18	6	8 Si	16 Si	15 Si	14 Si	26	24		7,4 + >8,0
FFUP637	FFUP637atmsed1	ATM	<i>Morganella morganii</i>	26	6	16	18	22	Sv	32	6	18	$\Delta^{CAZ/CLAV} 6$	5,4 + 7,6 + >8,0
FFUP638	FFUP638ctxsed1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	Sv	6	7 Si	16 Si	11 Si	6 Si	36	26		5,4 + >8,0
FFUP641	FFUP641ctxsed1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	7	6	7 Si	11 Si	14 Si	14 Si	12	24		5,4 + >8,0

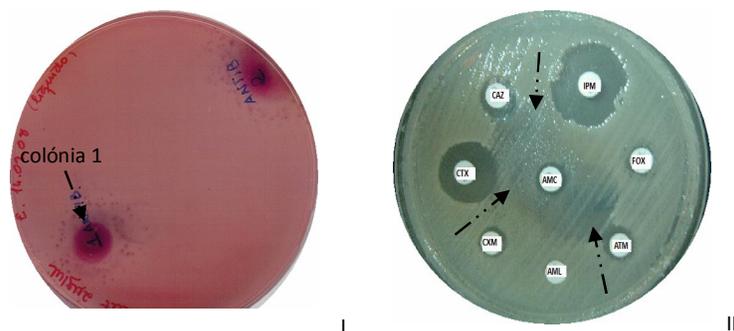
**Legenda:** S - Sobrenadante; sed - sedimento; Si - sinergismo com AMC (30μg); na - não avaliado; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição do crescimento bacteriano; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; pI - ponto Isoelétrico; Adição de Ácido Clavulânico\* - adição de ácido clavulânico ao disco de oximino-β-lactâmico;  $\Delta^{CTX/CLAV}$  - diferença estabelecida entre o halo de inibição de crescimento bacteriano do disco de CTX e o disco de CTX com ácido clavulânico;  $\Delta^{CAZ/CLAV}$  - diferença estabelecida entre o halo de inibição de crescimento bacteriano do disco de CAZ e o disco de CAZ com ácido clavulânico.

### 3.1.1 - Lar FFUP1

Nas 9 amostras de fezes provenientes de residentes autônomos e dependentes do lar FFUP1 detectou-se a presença de uma espécie bacteriana, *Citrobacter freundii*, produtora de BLEA. Neste lar, verificou-se crescimento de colônias fermentadoras da lactose em três amostras: FFUP101, FFUP105 e FFUP106 (tabela 3).

Do crescimento obtido nos meios de MacConkey com antibiótico seleccionou-se colônias fermentadoras da lactose representativas, para realização do teste de susceptibilidade aos antibióticos do grupo β-lactâmico (Anexo II). Do crescimento bacteriano obtido nos meios selectivos com antibiótico correspondente à amostra FFUP105, seleccionou-se duas colônias morfologicamente iguais, fermentadoras da lactose do meio de MaConkey com cefotaxima e ceftazidima, da inoculação do sobrenadante do caldo BHI. O teste de susceptibilidade aos antibióticos permitiu evidenciar através da acção sinérgica entre o disco de amoxicilina com ácido clavulânico (AMC) e os discos de oximino-cefalosporinas, cefotaxima e ceftazidima, e aztreonamo a presença de BLEA nas duas colônias seleccionados da amostra FFUP105 (pI 5,4 e >8,0).

Associada à expressão da BLEA na espécie *Citrobacter freundii* encontra-se a expressão de β-lactamase nativa do tipo AmpC (figura 7), condicionando resistência à amoxicilina com ácido clavulânico (AMC), amoxicilina (AML), cefuroxima (CXM) e cefoxitina (FOX) (tabela 9).



**Figura 7** - Teste de susceptibilidade do isolado FFUP105cazS1, *Citrobacter freundii* produtor de BLEA. I - colônias fermentadoras em meio de MacConkey com cefotaxima (2µg/mL); II - Sinergismo entre a associação amoxicilina e ácido clavulânico com ceftazidima, cefotaxima e aztreonamo.

### 3.2.2 - Lar FFUP2

Das 20 amostras inoculadas em meio de MacConkey com antibiótico de selecção, cefotaxima e ceftazidima, seleccionou-se estirpes bacterianas fermentadores da lactose representativas do crescimento em cinco amostras: FFUP204; FFUP207; FFUP219; FFUP220 e FFUP221 (tabela 4).

A detecção de BLEA foi identificada na espécie *Proteus mirabilis* (pl 7,6 e >8,0), isolado FFUP221ctxsed1 correspondente à amostra FFUP221, proveniente da inoculação do sedimento do caldo BHI em meio de MacConkey com cefotaxima (tabela 9) (Anexo III). A presença de BLEA foi confirmada pelo sinergismo característico entre o disco de amoxicilina com ácido clavulânico (AMC) e os discos de ceftazidima e aztreonamo, no método de DDST. A detecção da BLEA foi realizada pelo método de DDST, visto apresentar no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, oximino-cefalosporinas e aztreonamo, diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano (CTX=20mm; CAZ=18mm; ATM=26mm; CXM=11mm) presumíveis da presença de BLEA. Os discos de cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima e aztreonamo foram colocados a cerca de 20mm de distância do disco de amoxicilina com ácido clavulânico (AMC), colocado no centro do meio de Müller-Hinton inoculado, de forma a detectar a presença de sinergismo característico da presença de BLEA. A acção sinérgica foi visualizada entre os discos de ceftazidima e aztreonamo com o disco de amoxicilina e ácido clavulânico.

### 3.3.3 - Lar FFUP3

Foram estudadas 37 amostras de fezes provenientes de residentes autónomos e dependentes do lar FFUP3. Do crescimento em meio de MacConkey selectivo com antibiótico, cefotaxima e ceftazidima, seleccionou-se isolados fermentadores da lactose provenientes de 11 amostras: FFUP301; FFUP302; FFUP306; FFUP307; FFUP308; FFUP310; FFUP313; FFUP321; FFUP322; FFUP329 e FFUP336 (tabela 5).

No *screening* inicial aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos não se detectou a presença de nenhuma espécie produtora de BLEA (Anexo IV), porém os isolados FFUP301ctxSa, FFUP310cazsedb, FFUP313ctxSa, FFUP322ctxSa e FFUP322ctxSb, foram testados com

ácido clavulânico aos discos de oximino-β-lactâmicos (anexo IX). A presença de BLEA foi detectada pelo referido método nos isolados FFUP322ctxSa e FFUP322ctxSb, com igual morfologia, da amostra FFUP322, espécie *Klebsiella oxytoca* (pI 5,4 + 7,4 + 7,6 + >8,0) (tabela 9).

#### 3.1.4 - Lar FFUP4

A detecção de espécies produtoras de BLEA nas 25 amostras fezes de residentes dependentes e autónomos do lar FFUP4 foi verificada em duas amostras: FFUP401 e FFUP414 (tabela 6) (Anexo IV).

A BLEA presente na espécie *Klebsiella pneumoniae* correspondente ao isolado FFUP401ctxsed2, amostra 1, inoculação do sedimento do caldo de BHI em meio de MacConkey com cefotaxima foi detectada pela acção sinérgica entre o disco de aztreonamo e o disco de amoxicilina com ácido clavulânico (pI >8,0). A espécie *Escherichia coli* produtora de BLEA, isolado FFUP414cazS1 da amostra 14, proveniente da inoculação do sobrenadante do caldo de BHI em meio de MacConkey com ceftazidima foi verificada pela acção sinérgica entre o disco de amoxicilina com ácido clavulânico e os discos de oximino-cefalosporinas, cefotaxima e ceftazidima, e aztreonamo (pI 5,4 + 5,6 + 7,0 + 7,4 + 7,6 + >8,0) (tabela 9).

#### 3.1.5 - Lar FFUP5

A selecção de isolados bacterianos fermentadores da lactose foi efectuada a partir do crescimento em meio de MacConkey com os antibióticos de selecção: cefotaxima, ceftazidima, aztreonamo e imipenemo, da inoculação das 51 amostras de fezes provenientes dos residentes dependentes do lar FFUP5 (tabela 7).

A presença de BLEA foi verificada em 39 isolados, não repetidos, de 31 amostras que apresentavam crescimento nos meios de MacConkey com antibiótico de selecção: FFUP502; FFUP504; FFUP508; FFUP510; FFUP511; FFUP512; FFUP513; FFUP517; FFUP518; FFUP520; FFUP521; FFUP522; FFUP526; FFUP527; FFUP530; FFUP531; FFUP532; FFUP533; FFUP534; FFUP535; FFUP536; FFUP537; FFUP538; FFUP539;

FFUP540; FFUP541; FFUP542; FFUP543; FFUP544; FFUP547 e FFUP551 (tabela 9), no *screening* inicial aos antibióticos β-lactâmicos. A maioria das espécies produtoras de BLEA foram seleccionadas a partir do crescimento em meio de MacConkey com cefotaxima da inoculação do sobrenadante e/ou sedimento do caldo BHI (Anexo VI). O isolado FFUP544atmS1, amostra FFUP544, foi seleccionado do único crescimento em meio de MacConkey com antibiótico de selecção, aztreonamo, a partir da inoculação do sobrenadante em caldo de BHI. No teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, verifica-se sensibilidade às oximino-cefalosporinas, cefotaxima e ceftazidima, e resistência ao aztreonamo, sem presença de sinergismo característico da presença de BLEA.

Os bacilos de Gram negativo da família das *Enterobacteriaceae* detectados como produtores de BLEA foram a espécie *Escherichia coli*, maior predomínio, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* e espécies dos géneros *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.*. Estas espécies apresentam fenótipo semelhante, com pl de 5,4 referente a TEM, 7,4 a OXA e superior a 8,0 característicos da presença de β-lactamases do tipo CTX-M. Algumas amostras estudadas apresentam mais de duas estirpes produtoras de BLEA na mesma amostra. A amostra FFUP520 é exemplo da presença de duas espécies *Citrobacter freundii* e *Escherichia coli* produtoras de BLEA e a amostra FFUP521, as espécies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter sakazakii*, igualmente produtoras da referida enzima de espectro alargado.

Os isolados susceptíveis da presença de BLEA foram testados com adição de ácido clavulânico aos discos de oximino-β-lactâmicos, devido ao perfil apresentado no teste de susceptibilidade aos antibióticos β-lactâmicos (tabela 10).

### 3.1.6 - Lar FFUP6

As 41 amostras de fezes dos residentes dependentes do lar FFUP6 foram inoculadas no meio de MacConkey com os quatro antibióticos de selecção: cefotaxima (2μ/mL), ceftazidima (2μ/mL), aztreonamo (2μ/mL) e imipenemo (2μ/mL) (tabela 8).

A presença de BLEA, visualizada pela acção sinérgica entre os discos de oximino-cefalosporinas, cefotaxima e ceftazidima, e aztreonamo com o disco de amoxicilina

com ácido clavulânico, foi detectada nos isolados: FFUP603ctxS2; FFUP607ctxS1; FFUP612atmS1; FFUP617ctxS1; FFUP618atmS1; FFUP619ctxsed1; FFUP624ctxS1; FFUP634ctxS1; FFUP637atmsed1; FFUP638ctxsed1 e FFUP641ctxsed1, correspondentes às amostras FFUP603, FFUP607, FFUP612, FFUP617, FFUP618, FFUP619, FFUP624, FFUP634, FFUP37, FFUP638 e FFUP641 (tabela 9) (anexo VII).

Os isolados susceptíveis da presença de BLEA não detectados no *screening* inicial aos antibióticos foram testados com ácido clavulânico (tabela 10).

### **3.2 - Confirmação da presença de BLEA**

A confirmação da produção de BLEA foi realizada segundo as directivas do CLSI, pelo método de adição de ácido clavulânico aos discos de oximino-cefalosporinas, especificamente cefotaxima e ceftazidima (CLSI, 2007). Neste ensaio, testou-se, nas mesmas condições, aztreonamo para isolados susceptíveis da presença de BLEA.

O aumento do halo de inibição do crescimento bacteriano no disco de antibiótico com ácido clavulânico, igual ou superior a 5mm, por comparação com o halo de inibição de crescimento bacteriano no disco com antibiótico sem inibidor, é característico da presença de BLEA (CLSI, 2007). A inexistência de aumento do halo de inibição no disco com inibidor das  $\beta$ -lactamases alude à ausência de produção de BLEA pela espécie bacteriana.

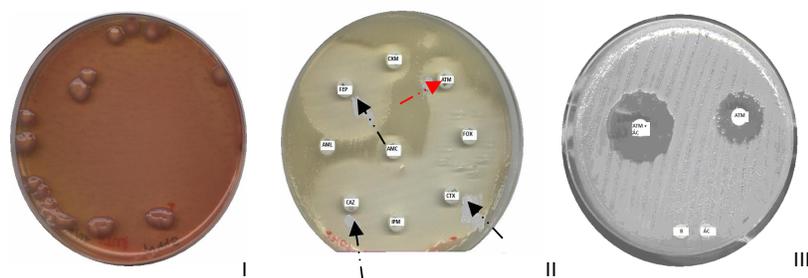
Para os isolados susceptíveis da presença de BLEA mas para os quais não se detectou sinergismo, realizou-se o ensaio de adição de ácido clavulânico ao disco de oximino- $\beta$ -lactâmico e determinou-se a diferença entre os diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano entre os discos do oximino- $\beta$ -lactâmicos e oximino- $\beta$ -lactâmicos com inibidor da  $\beta$ -lactamase (tabela 10).

**Tabela 10** - Resultados da confirmação da presença de BLEA por adição de ácido clavulânico aos discos de oximino-β-lactâmicos

Amostra	Isolado	Antibiótico β-lactâmico								
		CAZ	CAZ/CLAV	$\Delta^{CAZ/CLAV}$	CTX	CTX/CLAV	$\Delta^{CTX/CLAV}$	ATM	ATM/CLAV	$\Delta^{ATM/CLAV}$
FFUP322	FFUP322ctxSa	28	29	1	24	29	5	-	-	-
	FFUP322ctxSb	28	29	1	24	29	5	-	-	-
FFUP511	FFUP511ctxsed1	-	-	-	6	12	6	-	-	-
	FFUP511cazS1	-	-	-	18	24	6	-	-	-
FFUP518	FFUP518ctxS1	15	21	6	17	22	5	-	-	-
FFUP521	FFUP521ctxS2	-	-	-	6	11	6	-	-	-
FFUP527	FFUP527cazS1	18	23	5	-	-	-	-	-	-
FFUP531	FFUP531impS3	-	-	-	-	-	-	6	14	8
FFUP544	FFUP544atmS1	30	32	2	-	-	-	18	25	7
FFUP547	FFUP547ctxsed1	6	14	8	12	17	5	-	-	-
FFUP551	FFUP551ctxsed1	14	25	11	17	27	10	-	-	-
FFUP601	FFUP601cazS1	20	20	0	12	18	6	-	-	-
	FFUP603ctxS2	-	-	-	6	13	7	11	13	3
FFUP603	FFUP603atmS1	15	19	4	10	19	9	-	-	-
FFUP623	FFUP623cazS1	12	15	3	17	17	0	-	-	-
FFUP637	FFUP637atmsed1	15	21	6	-	-	-	-	-	-

**Legenda:** CAZ/CLAV - disco de CAZ com 10μL de ácido clavulânico;  $\Delta^{CAZ/CLAV}$  - diferença dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano em CAZ e CAZ com ácido clavulânico; CTX/CLAV - disco de CTX com 10μL de ácido clavulânico;  $\Delta^{CTX/CLAV}$  - diferença dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano em CTX e CTX com ácido clavulânico; ATM/CLAV - disco de ATM com 10μL de ácido clavulânico;  $\Delta^{ATM/CLAV}$  - diferença dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano em ATM e ATM com ácido clavulânico.

A figura 8 apresenta um resultado positivo, presença de BLEA no isolado FFUP544S1, amostra 44 do lar FFUP5, espécie *Enterobacter sakazakii*, proveniente do crescimento em meio de MacConkey com aztreonamo, porção do sobrenadante do caldo BHI.



**Figura 8** - Confirmação da BLEA pela adição de ácido clavulânico. I - Meio de cultura MacConkey selectivo com aztreonamo (2μg/mL); II - Teste de susceptibilidade aos antibióticos β-lactâmicos com resistência ao aztreonamo e sensibilidade à cefotaxima, ceftazidima e cefepime; III - Confirmação da presença de BLEA com adição de ácido clavulânico ao disco de aztreonamo.

O ensaio de adição de ácido clavulânico ao disco de aztreonamo, uma vez que apresenta sensibilidade à cefotaxima e ceftazidima, permitiu verificar alargamento do diâmetro do halo de inibição no disco de aztreonamo com ácido clavulânico. A diferença de 7mm estabelecida por comparação entre o diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano no disco correspondente ao aztreonamo com ácido clavulânico e o disco de aztreonamo sem inibidor evidencia a presença da BLEA.

### 3.2 - Ponto Isoelétrico dos isolados produtores de BLEA

Os pI's das BLEA foram determinados por comparação com os pI's dos padrões, característicos de β-lactamases do tipo TEM (5,4), SHV (7,6) e MIR-1 (8,4). Na presença de pI's das β-lactamases das amostras não correspondentes aos pI's dos padrões, estabeleceu-se um pI por aproximação.

A análise dos pI's dos isolados produtores de BLEA detectados no estudo evidencia a presença de diferentes tipos de β-lactamases. A tabela 11 apresenta os isolados produtores de BLEA detectados no estudo associados ao perfil do pI e espécie da família das *Enterobacteriaceae*.

**Tabela 11** - Perfil dos pI's dos isolados produtores de BLEA detectados no estudo

pI	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Morganella morganii</i>
5,4+7,4+>8,0	17					1			
5,4+>8,0	17	1		2		1			
7,4+>8,0	2				1				
>8,0	3	2					1		
7,6+>8,0					1				
5,4+7,4+7,6+>8,0			1						
5,4+5,6+7,0+7,4+7,6+>8,0	1								
5,6+7,2+7,4+7,6+>8,0							1		
5,4+7,6+>8,0						2		2	1
5,4+7,8+>8,0						1			

A figura 9 apresenta pl's característicos de isolados produtores de BLEA do lar FFUP5, espécie *Escherichia coli*, respectivamente isolado FFUP540atmS1, FFUP542cazS1, FFUP534atmS1, FFUP537atmsed1, FFUP538atmS1, FFUP541cazsed1 e FFUP531impS3.



**Figura 9** - Exemplo de focagem isoelétrica de isolados produtores de BLEA do lar FFUP5. 1 - padrão com β-lactamases do tipo TEM (5,4), SHV (7,6) e MIR-1 (8,4); 2 - isolado FFUP540atmS1; 3 - isolado FFUP542cazS1; 4 - isolado FFUP534atmS1; 5 - isolado FFUP537atmsed1; 6 - isolado FFUP538atmS1; 7 - isolado FFUP541cazsed1; 8 - isolado FFUP531impS3.

Verifica-se um comportamento semelhante com pl's de 5,4 e >8,0 característicos de β-lactamases do tipo TEM e provavelmente do tipo CTX-M, de acordo com o fenótipo de resistência.

#### 4 – Resistência aos antibióticos não β-lactâmicos

O teste de sensibilidade aos antibióticos não β-lactâmicos pelo método de difusão em agar foi realizado para isolados bacterianos produtores de BLEA representativos dos seis lares de idosos, em relação aos quais foram obtidos transconjugantes (tabela 12).

**Tabela 12** - Resultados da susceptibilidade dos isolados produtores de BLEA aos antibióticos não β-lactâmicos

Lar de idosos	Isolado	Antibiótico não β-lactâmico (halo de inibição em mm)						
		CIP	S	NA	NET	TE	C	F
FFUP4	FFUP414cazS1	26	13	20	26	24	28	28
	FFUP513ctxS3	14	13	20	22	17	20	18
	FFUP513cazS2	24	13	22	22	18	20	18
	FFUP517ctxsed1	6	10	6	8	6	21	na
FFUP5	FFUP518ctxS1	22	13	20	17	11	22	na
	FFUP520ctxS1	26	13	21	6	20	6	18
	FFUP530atmS2	6	11	7	11	6	20	19
	FFUP534atmS1	6	14	8	10	7	25	20
FFUP6	FFUP634ctxS1	30	13	20	22	14	20	18

## 5 – Transferência de genes de resistência a antibióticos β-lactâmicos

Para verificar a transferência de genes que conferem resistência aos oximino-β-lactâmicos, seleccionou-se um conjunto de isolados bacterianos representativos dos seis lares de idosos, com perfil de resistência à cefotaxima superior à ceftazidima e sensibilidade à estreptomicina. A espécie receptora, *Escherichia coli* HB101, não fermentadora da lactose, apresenta resistência à estreptomicina.

O perfil de susceptibilidade à estreptomicina foi analisado, por comparação com o diâmetro do halo de sensibilidade ao referido antibiótico pelo CLSI (intermédio: 12-14mm; susceptível ≥15mm) no sentido de seleccionar-se estirpes dadoras.

Seleccionaram-se as estirpes com o perfil de resistência pretendido e verificou-se capacidade de transferência dos genes da BLEA por conjugação bacteriana, com obtenção de colónias de transconjugantes com capacidade de crescer em meio de MacConkey com cefotaxima (2μg/mL) e estreptomicina (500μg/mL) (tabela 13).

**Tabela 13** - Transferência da BLEA e contagem de UFC de transconjugantes no ensaio de conjugação

Lar de idosos	Isolados dadores	Transferência da BLEA	Transconjugantes
			UFC
FFUP1	FFUP105cazS1	não	0
	FFUP414cazS1	sim	9
FFUP5	FFUP513ctxS3	sim	5
	FFUP517ctxsed1	sim	3
	FFUP518cazS2	não	0
	FFUP527ctxsed1	não	0
	FFUP540atmS1	não	0
	FFUP520ctxS1	sim	2
	FFUP522atmS1	não	0
	FFUP518ctxS1	sim	45
	FFUP521ctxS1	não	0
	FFUP530atmS2	sim	86
	FFUP521atmS2	não	0
	FFUP521cazS1	não	0
FFUP6	FFUP513cazS2	sim	13
	FFUP534atmS1	sim	5
	FFUP607ctxS1	não	0
	FFUP634ctxS1	sim	2
	FFUP638ctxsed1	não	0
	FFUP624ctxS1	não	0

Os resultados dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano para os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e perfil de resistência aos antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos das estirpes dadoras e respectivos transconjugantes encontram-se na tabela 14.

**Tabela 14** - Resultados do teste de susceptibilidade aos antibióticos β-lactâmicos e não β-lactâmicos de isolados representativos do estudo e transconjugantes

Estirpes dadoras e respectivos transconjugantes	Antibióticos β-lactâmicos (halo de inibição em mm)										Adição de Ácido Clavulânico*	Resistência aos antibióticos não β-lactâmicos	pI
	AMC	AML	CTX	CAZ	ATM	IMP	FOX	CXM	FEP	FEP			
FFUP414cazS1 <i>Escherichia coli</i>	6	6	10 Si	8 Si	6 Si	26	6	6	6	na		5,4 + 5,6 + 7,0 + 7,4 + 7,6 + >8,0	
Tcj1	7	6	12	9	7	25	6	6	14	Δ <sup>CTX/CLAV</sup> <sub>6</sub>	S	5,4 + >8,0	
FFUP513ctxS3 <i>Escherichia coli</i>	15	6	10 Si	15 Si	10 Si	32	26	6	na		CIP	5,4 + >8,0	
Tcj 1	20	6	18 Si	8	8	Sv	30	6	13 Si		S, CIP	5,4 + >8,0	
Tcj 2	Sv	6	Sv	14 Si	Sv	Sv	Sv	Sv	Sv		S, CIP	5,4 + >8,0	
FFUP513cazS2 <i>Escherichia coli</i>	11	6	6 Si	14 Si	11 Si	28	20	6	na			5,4 + 7,4 + >8,0	
Tcj1	Sv	8	Sv	12 Si	Sv	Sv	Sv	Sv	Sv		S	5,4 + 7,4 + >8,0	
FFUP517ctxsed1 <i>Escherichia coli</i>	12	6	6 Si	14 Si	6 Si	26	24	6	na		TE, NET, NA, CIP	5,4 + 7,4 + >8,0	
Tcj2	18	6	Sv	14 Si	32	Sv	Sv	6	Sv		S	7,4 + >8,0	
FFUP518ctxS1 <i>Escherichia coli</i>	8	6	17	15	21	25	9	10	na		TE	5,4 + >8,0	
Tcj1	7	7	18	15	22	25	9	10	13	Δ <sup>CTX/CLAV</sup> <sub>6</sub>	S, TE	5,4 + >8,0	
FFUP520ctxS1 <i>Citrobacter freundii</i>	10	6	6 Si	14 Si	10 Si	28	24	6	na		NET	5,4 + >8,0	
Tcj1	Sv	6	Sv	16 Si	Sv	Sv	Sv	Sv	Sv		S	>8,0	
Tcj2	Sv	6	Sv	12 Si	26	Sv	Sv	20	Sv		S	>8,0	
FFUP530atmS2 <i>Escherichia coli</i>	16	6	6 Si	10 Si	6 Si	35	23	6	na		TE, NET, NA, CIP	5,4 + >8,0	
Tcj1	14	6	8 Si	12 Si	7 Si	32	20	7	23		S, NET	5,4 + >8,0	
FFUP534atmS1 <i>Escherichia coli</i>	24	6	6	12 Si	6 Si	36	24	6	11 Si		TE, NET, NA, CIP	5,4 + >8,0	
Tcj1	22	6	7	12	7	34	25	7	12	Δ <sup>CAZ/CLAV</sup> <sub>7</sub>	S	5,4 + >8,0	
FFUP634ctxS1 <i>Escherichia coli</i>	18	6	8 Si	16 Si	14 Si	26	24	6	15 Si		TE	7,4 + >8,0	
Tcj1	17	6	9 Si	17 Si	16 Si	24	24	7	18 Si		S	>8,0	

**Legenda:** Tcj - Transconjugante; Si - Sinergismo com o disco de amoxicilina com ácido clavulânico (AMC); Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição de crescimento bacteriano; na - não avaliado; pI - ponto Isoelétrico; Adição de Ácido Clavulânico\* - adição de ácido clavulânico ao disco de oximino-β-lactâmico; Δ<sup>CTX/CLAV</sup> - diferença estabelecida entre o halo de inibição de crescimento bacteriano em CTX e CTX com ácido clavulânico; Δ<sup>CAZ/CLAV</sup> - diferença estabelecida entre o halo de inibição de crescimento bacteriano em CAZ e CAZ com ácido clavulânico.

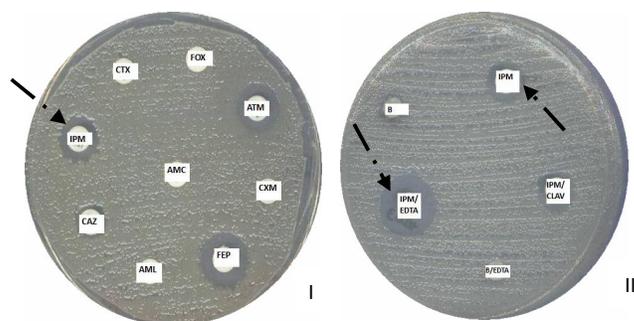
## 6 – Outros mecanismos de Resistência: metalo- $\beta$ -lactamases

A detecção de estirpes com redução da susceptibilidade aos carbapenemos, nomeadamente ao imipenemo, foi efectuada aquando da realização do teste de susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

Detectou-se a presença de 18 isolados produtores de metalo- $\beta$ -lactamases em três lares de idosos, nomeadamente lar FFUP3, lar FFUP5 e lar FFUP6. No lar FFUP3 verificou-se nos isolados: FFUP301ctxS1, FFUP302cazsed3, FFUP308ctxS1 e FFUP310cazsed2 respectivamente das amostras FFUP301, FFUP302, FFUP308 e FFUP310. No lar FFUP5 verificou-se nos isolados: FFUP525ctxS1; FFUP531impS3; FFUP532impS1; FFUP533impSed1; FFUP535cazS2; FFUP542cazS1 e FFUP547impS1, respectivamente das amostras de FFUP525, FFUP531, FFUP532, FFUP533, FFUP535, FFUP542 e FFUP547. No lar FFUP6 constatou-se nos isolados FFUP602atmS1, FFUP613atmS1, FFUP620impSed1 e FFUP635impS1, das respectivas amostras FFUP602, FFUP613, FFUP620 e FFUP635.

Estes isolados bacterianos, detectados com perfil de redução da susceptibilidade igual ou inferior ao intervalo estabelecido pelo CLSI (halo de inibição de crescimento bacteriano 14-15mm), foram testados com 10 $\mu$ L de EDTA (0,5M) para comprovar a presença das carbapenemases do tipo das metalo- $\beta$ -lactamases. Pela análise comparativa dos halos de inibição, verificou-se em todos os isolados um alargamento superior a 4mm, entre o disco de imipenemo e disco de imipenemo com EDTA (0,5M), indicativo da presença de metalo- $\beta$ -lactamase (Anexo VIII).

A espécie correspondente ao isolado FFUP620impSed1 proveniente do lar FFUP6 é produtora de metalo- $\beta$ -lactamase caracteristicamente inibida pelo EDTA. A figura 10-I ilustra os resultados obtidos no teste de susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, com ênfase a resistência ao imipenemo (halo de inibição de 10mm). A confirmação da presença da metalo- $\beta$ -lactamase (figura 10-II), realizada pelo método descrito anteriormente, mostra a diferença dos diâmetros dos halos de inibição entre o disco de imipenemo e imipenemo com EDTA (0,5M).



**Figura 10** - Detecção de metalo- $\beta$ -lactamase. I - Redução do halo de inibição do imipenemo no teste de susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos; II - Detecção de metalo- $\beta$ -lactamase inibida pelo EDTA (0,5M). IPM/EDTA - disco de imipenemo com 10 $\mu$ L de EDTA (0,5M); B - disco branco sem antibiótico e EDTA; B/EDTA - disco branco com EDTA(0,5M).

As estirpes produtoras de metalo- $\beta$ -lactamase foram conservadas em meio de TSB com 15% de glicerol, e guardadas a -80°C, para futuro estudo.

## **DISCUSSÃO**

---

A resistência aos antibióticos é um importante problema de saúde pública à escala Mundial. A utilização prolongada e indiscriminada de antibióticos, com ênfase os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, para tratamento de infecções bacterianas, contribuiu para o aparecimento e disseminação de mecanismos de resistência como estratégia intrínseca de sobrevivência das bactérias (Peña *et al*, 2008). Actualmente, a resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em unidades de prestação de cuidados de saúde é um problema emergente em todo o Mundo, para o qual os prestadores de cuidados de saúde têm de estar sensibilizados (Bonomo, 2000; Warren *et al*, 2008).

As unidades de prestação de cuidados de saúde podem constituir importantes reservatórios de bactérias resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, particularmente *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA (Paterson *and* Bonomo, 2005; Rodriguez-Baño *and* Ngugro, 2008). Actualmente, na comunidade verifica-se um aumento da incidência de colonização fecal em indivíduos saudáveis e em nichos específicos de unidades de prestação de cuidados de saúde como os lares de idosos (Bonomo, 2000; Bem-Ami *et al*, 2006). A presença de *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA colonizadoras do tracto intestinal em residentes de lares de idosos é uma realidade descrita internacionalmente, mas pouco estudada no nosso País.

O estudo das 184 amostras de fezes provenientes de seis lares de idosos da zona norte do País, seleccionados aleatoriamente, lar FFUP1, FFUP2, FFUP3, FFUP4, FFUP5 e FFUP6, permitiu a detecção de 58 isolados de bacilos de Gram negativo da família *Enterobacteriaceae* produtores de BLEA, colonizadores do tracto intestinal de residentes autónomos e dependentes.

O estado clínico, idade, procedimentos médicos e técnicas invasivas de diagnóstico e terapêutica, tratamento antimicrobiano especificamente com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, permanência em unidades de prestação de cuidados de saúde como hospitais e residências de idosos, e inadequadas medidas de controlo de infecção são factores importantes relacionados com o aparecimento e disseminação de estirpes produtoras de BLEA (Wiener *et al*, 1999; Pitout *and* Laupland, 2008; Warren *et al*, 2008).

No lar FFUP1 detectou-se uma espécie produtora de BLEA nas 9 amostras de fezes estudadas, *Citrobacter freundii*, num residente com hospitalização recente, cerca de

três semanas antecedentes à recolha da amostra. Nas 21 amostras estudadas do lar FFUP2, detectou-se uma espécie produtora de BLEA, *Proteus mirabilis*, num residente dependente. Nas 37 amostras estudadas do lar de idosos FFUP3 detectou-se uma *Klebsiella oxytoca* produtora de BLEA. No lar FFUP4, duas espécies produtoras de BLEA, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, nas 25 amostras estudadas. A maior incidência de bacilos de Gram negativo produtores de BLEA verificou-se no lar FFUP5, seguida do lar FFUP6. Nas 51 amostras de fezes estudadas do lar FFUP5 detectaram-se 42 estirpes produtoras de BLEA em várias espécies de bacilos de Gram negativo da família *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis* e espécies do género *Enterobacter spp.* No lar FFUP6 detectou-se a presença de 11 estirpes produtoras de BLEA, em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* e no género *Enterobacter spp.* nas 41 amostras de fezes estudadas.

A incidência de *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA detectadas em cada lar de idosos, parece depender de características dos residentes em termos de dependência funcional, história de internamento em unidades hospitalares (inferior a um ano antes da colheita da amostra fecal), bem como do tratamento antimicrobiano a que estão sujeitos. A recolha de amostras de fezes provenientes dos residentes de lares de idosos foi evoluindo no sentido de recolha das amostras dos residentes com maior grau de dependência. Nos primeiros lares de idosos FFUP1, FFUP2 e FFUP3 com poucos residentes dependentes, recolheu-se também amostras de residentes autónomos, particularmente com hospitalizações inferiores a um ano. Os residentes, dependentes e autónomos, do lar FFUP4 na altura da colheita das amostras, não se encontravam com tratamento antimicrobiano, este lar opta por uma política de racionalização do consumo de antibióticos, bem como, nenhum dos residentes tinha episódio recente de hospitalização (inferior a um ano). As amostras de fezes provenientes dos lares FFUP5 e FFUP6, contrariamente aos lares de idosos anteriores, são unicamente de residentes dependentes, com terapêutica antimicrobiana e procedimentos médicos e técnicas invasivas na altura da colheita das amostras de fezes. O aparecimento de *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA em lares de idosos encontra-se relacionado com características da instituição e dos residentes, tal como refere a literatura (Wiener

*et al*, 1999; Paterson and Bonomo, 2005; Nicolas-Chanoine *et al*, 2008). A incidência de *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA no lar FFUP5 vai de encontro a esta afirmação, a colheita de fezes nesta instituição de idosos foi realizada apenas a residentes dependentes que na altura da colheita se encontravam debilitados, com terapêutica antimicrobiana e alguns dos residentes submetidos a procedimentos médicos e técnicas invasivas. Os residentes do lar FFUP6 apresentam características similares aos residentes do lar FFUP5, na altura da colheita das amostras de fezes.

Na abordagem metodológica para detecção de estirpes produtoras de BLEA recorreu-se à utilização de meio de MacConkey com antibiótico (cefotaxima, ceftazidima, aztreonamo e imipenemo). A inoculação das amostras em meio de MacConkey com antibiótico de selecção adequado, a partir da inoculação em caldo BHI, permitiu detectar presumíveis isolados bacterianos produtores de BLEA. No decorrer do estudo, sentiu-se a necessidade de ajustar a metodologia com o objectivo de aumentar a sensibilidade na detecção de estirpes produtoras de BLEA, com a introdução do meio de MacConkey com aztreonamo (2 $\mu$ g/mL) e adicionalmente, meio de MacConkey com imipenemo (2 $\mu$ g/mL), para detecção de BLEA e/ou outros mecanismos de resistência. Na análise do crescimento bacteriano nos meios de MacConkey com antibiótico de selecção, verifica-se um predomínio acentuado do crescimento bacteriano no meio de MacConkey com cefotaxima (2 $\mu$ g/mL), referente à inoculação do sobrenadante e/ou sedimento do crescimento em caldo de BHI. Salienta-se, por exemplo, o crescimento em meio de MacConkey com aztreonamo (2 $\mu$ g/mL) realizado da sementeira da amostra 17 do lar FFUP4. Nesta amostra, obteve-se crescimento de colónias fermentadores da lactose no meio de MacConkey com o respectivo antibiótico, a partir da porção do sobrenadante e sedimento do caldo BHI. O crescimento de fermentadores da lactose não se verificou nos outros meios com antibiótico de selecção, cefotaxima e ceftazidima, que apresentam crescimento de não fermentadores da lactose oxidase positivo. A amostra 44 referente ao lar FFUP5 é outro exemplo da selecção de fermentadores da lactose em meio de MacConkey com aztreonamo (2 $\mu$ g/mL), crescimento de 25 UFC/mL, na porção correspondente ao sobrenadante. O teste de susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos realizado de um isolado representativo do crescimento no meio mencionado evidencia

sensibilidade à cefotaxima (diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano de 28mm) e ceftazidima (diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano de 30mm), e resistência ao aztreonamo (diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano de 15mm). A adição de ácido clavulânico ao disco de aztreonamo permitiu verificar a presença da BLEA, pelo alargamento do halo de inibição do crescimento bacteriano no disco de aztreonamo com inibidor das  $\beta$ -lactamases, ácido clavulânico. Apesar de, não ter sido empregue desde a fase inicial da metodologia experimental torna-se relevante o uso de aztreonamo neste tipo de abordagem, uma vez que permitiu a selecção de estirpes produtoras de BLEA, não detectadas nos meios selectivos com cefotaxima e ceftazidima, e verificar o crescimento de estirpes resistentes neste antibiótico morfológicamente semelhantes às que cresceram nos meios selectivos com oximino-cefalosporinas.

Através do fenótipo característico no teste de susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos pelo método de difusão em agar, método de DDST e adição de ácido clavulânico aos discos de oximino- $\beta$ -lactâmicos, segundo as directrizes do CLSI, detectaram-se estirpes produtoras de BLEA. No decorrer do estudo introduziu-se cefepime, cefalosporina de quarta geração, no teste de susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos com o objectivo de verificar a presença de BLEA e/ou  $\beta$ -lactamase nativa do tipo AmpC em espécies de *Enterobacter spp.*

A *Escherichia coli* representa a principal espécie da família *Enterobacteriaceae* produtora de BLEA, detectada nas nossas amostras. No presente estudo, detectou-se a referida espécie produtora de BLEA em amostras dos lares FFUP4, FFUP5 e FFUP6. Outros bacilos de Gram negativo da família *Enterobacteriaceae* são igualmente produtores destas enzimas bacterianas, com menor incidência, como as espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* e espécies do género *Enterobacter spp.*

No presente estudo às espécies do género *Enterobacter spp.* produtoras de BLEA de isolados do lar FFUP5 e FFUP6, realizou-se o teste de susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em meio de Müller-Hinton e Müller-Hinton com cloxacilina, inibidor das  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC, para confirmar a presença de BLEA. Nestas espécies, podem estar presente  $\beta$ -lactamase nativa cromossómica AmpC, que inactivam as

cefalosporinas de amplo espectro de acção e não são inibidas pelo inibidor das  $\beta$ -lactamases, ácido clavulânico, que podem dissimular a presença de BLEA, dificultando a interpretação do antibiograma.

As *Enterobacteriaceae* produtoras de  $\beta$ -lactamases detectadas nos diferentes lares de idosos exibem perfis de resistência diferentes: resistência superior à cefotaxima comparativamente à ceftazidima, perfil de resistência superior à ceftazidima comparativamente à cefotaxima; resistência a cefoxitina e resistência ao imipenemo. As espécies produtoras de BLEA detectadas nas amostras do lar FFUP5 apresentam perfis de resistências muito semelhantes, com maior predomínio do perfil de resistência superior à cefotaxima comparativamente à ceftazidima. Os pl's das estirpes produtoras de BLEA sugerem a presença de  $\beta$ -lactamases do tipo TEM e CTX-M. As  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M, de rápida disseminação em todo o Mundo, com maior prevalência em ambiente hospitalar e na comunidade, conferem resistência aos oximino- $\beta$ -lactâmicos em *Enterobacteriaceae* (Cantón *et al*, 2007; Livermore *et al*, 2007; Coque *et al*, 2008).

Os resultados do presente estudo parecem indicar a presença de  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M, uma vez que se verificou um predomínio de crescimento bacteriano em meio de MacConkey com cefotaxima, as estirpes bacterianas produtoras de BLEA apresentam na sua maioria resistência superior à cefotaxima no teste de susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, bem como pl's característicos de BLEA desta família, superior a 8,0. No lar FFUP5, verifica-se maior incidência de *Escherichia coli* produtora de BLEA nos isolados estudados, com pl presumíveis da presença de  $\beta$ -lactamase do tipo TEM (pl 5,4) e CTX-M (pl >8,0). Esta realidade encontra-se de acordo com outras realidade estudadas, internacionalmente e em Portugal, em ambiente hospitalar e em indivíduos da comunidade, que apontam para uma disseminação com características clonais de *Escherichia coli* produtora de BLEA do tipo CTX-M. Esta situação, no lar FFUP5 (a ser avaliada em trabalho futuro), alerta para a necessidade de as unidades de prestação de cuidados de serviços de saúde estarem alerta para a necessidade de um controlo de infecção ajustado à realidade de cada unidade. A tipagem destas estirpes produtoras de BLEA é fundamental para conhecer o tipo de  $\beta$ -lactamase presente, e estabelecer uma relação epidemiológica da disseminação destas

enzimas na comunidade, nomeadamente nos residentes de lares de idosos e em ambiente hospitalar.

Os genes de resistência aos antibióticos podem ser transferidos para outros géneros e espécies bacterianas diferentes, por exemplo por processos de transferência horizontal de genes, através de elementos genéticos móveis como plasmídeos. A transferência de resistência aos oximino- $\beta$ -lactâmicos foi possível ser demonstrada através do ensaio de conjugação bacteriana, por exemplo verificou-se transferência da resistência aos oximino- $\beta$ -lactâmicos do isolado FFUP513cazS2, confirmada através do teste de susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e determinação do pl. A disseminação das BLEA a géneros e espécies bacterianas diferentes através de disseminação plasmídica de genes de resistência está relacionada com o aparecimento de surtos em ambientes hospitalar e em residências de idosos. Normalmente, *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA apresentam co-resistência a outros grupos de antibióticos, sendo alguns dos casos transferível por conjugação, como se verificou com os isolados FFUP513ctxS3, FFUP517ctxsed1, FFUP518ctxS1, FFUP520ctxS1, FFUP530atmS2, FFUP534atmS1 e FFUP634ctxS1 com a transferência de resistência a antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos.

No *screening* de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos detectou-se a presença de 15 isolados bacterianos, com perfil de redução da susceptibilidade ao imipenemo, carbapenemo de uso hospitalar, produtores de carbapenemases do tipo metalo- $\beta$ -lactamase. Foi testada a sensibilidade ao EDTA para confirmar a presença da carbapenemase, nos isolados provenientes de amostras dos lares FFUP3, FFUP5 e FFUP6. Os meios de MacConkey com antibiótico oximino- $\beta$ -lactâmicos utilizados para detecção de estirpes produtoras de BLEA, permitiu detectar estirpes produtoras de outros mecanismos de resistência, não contempladas no objectivo do estudo, que foram guardadas para estudo futuro.

A detecção de isolados produtores de BLEA em residentes de lares de idosos é uma realidade conhecida em alguns países da Europa e Estados Unidos da América (Wiener *et al*, 1999; Kassis-Chikhani *et al*, 2004; Nicolas-Chanoine *et al*, 2008). Em Portugal, a detecção de isolados produtores de BLEA em lares de idosos, ainda pouco estudada, mas conhecida em ambiente hospitalar, em indivíduos da comunidade e no meio

ambiente (Machado *et al*, 2007; Mendonça *et al*, 2007; Pedrosa *et al*, 2007). Com o presente estudo foi possível verificar que os lares de idosos representam um nicho particular da comunidade, que funciona como reservatório de estirpes resistentes e genes de resistência aos antibióticos, particularmente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

Os lares de idosos assumem-se como unidades de prestação de cuidados de saúde na comunidade, devido às características e necessidades em termos de prestação de cuidados de saúde aos residentes, tal como o grau de debilidade, procedimentos médicos e técnicas invasivas de diagnóstico e terapêutica e terapêutica antimicrobiana, com necessidade da permanência de profissionais de saúde na instituição, de forma a garantir os cuidados médicos aos residentes, particularmente os mais dependentes, de forma a evitar recorrer a instituições hospitalares por questões menores (Bonomo, 2000; Oteo *et al*, 2006).

Os residentes de lares de idosos são vulneráveis às infecções que podem adquirir nos locais onde ocorre a prestação de cuidados de saúde em situações agudas, sobretudo devido ao recurso a procedimentos médicos mais invasivos, à terapêutica antibiótica e aos internamentos consecutivos, quer nas unidades de cuidados intensivos ou noutras unidades de saúde. O aparecimento de estirpes produtoras de BLEA nos residentes de lares de idosos está relacionado com factores de risco como o grau de debilidade do idoso, consumo de antibióticos particularmente os de largo espectro de acção, procedimentos e técnicas médicas invasivas e hospitalizações (Bonomo, 2000, Mendelson *et al*, 2005, Oteo *et al*, 2006, Moor *et al*, 2008).

O aparecimento de infecções adquiridas no decurso da prestação de cuidados de saúde em hospital e em nichos particulares da comunidade está relacionado com a prestação de cuidados pelos profissionais. As infecções adquiridas nestas unidades de saúde dificultam o tratamento adequado dos pacientes e constituem causas importante de morbilidade e mortalidade, bem como de consumo acrescido de recursos. A implementação de medidas de controlo de infecção na prestação de cuidados a residentes dos lares de idosos é fundamental para minimizar a disseminação de estirpes produtoras de BLEA, entre os residentes, prestadores de cuidados e a outros ambientes. Nos lares de idosos estudados e dadas as características das instituições e residentes, particularmente do lar FFUP5, parece

existir uma disseminação clonal provavelmente resultado de inadequadas medidas de controlo de infecção, é importante a implementação de medidas de controlo de infecção eficazes, de forma a minimizar a disseminação destas estirpes produtoras de BLEA.

As unidades de prestação de cuidados de saúde, hospital e na comunidade, lares de idosos, unidades de longa e média duração, permitem uma articulação intra e interinstitucional dos pacientes. É fundamental a vigilância epidemiológica e a implementação de medidas de controlo de infecção eficazes, que devem abranger todas as unidades de prestação de cuidados de saúde, a fim de reduzir a disseminação destas estirpes.

Em prol da garantia da qualidade da prestação de cuidados de saúde, em ambiente hospitalar e em nichos particulares da comunidade como lares de idosos, cuidados continuados de longa e média duração, cuidados de saúde primários e em unidades privadas de saúde, as seguintes medidas devem ser tidas em consideração: actividades de vigilância epidemiológica; educação e sensibilização dos prestadores de cuidados; incentivo às medidas de controlo de infecção, com ênfase na higienização das mãos; desenvolvimento de políticas de racionalização do consumo de antibióticos; meios e recursos que permitam o isolamento de pacientes com infecção e/ou colonizados por estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos, particularmente as produtoras de BLEA. A detecção e identificação das estirpes produtoras de BLEA aquando admissão e/ou alta hospitalar é importante no sentido de limitar a sua disseminação ao ambiente hospitalar.

A área de prestação de cuidados geriátricos é uma área em expansão em todo o Mundo, particularmente em Portugal, onde é exigida a qualidade da prestação de cuidados de saúde de forma a garantir qualidade de vida do idoso. Esta não deverá descurar a necessidade de atenção particular às questões infecciosas e de resistência aos antibióticos típicas desta faixa etária vulnerável e das características das unidades residenciais. É imprescindível a cooperação dos prestadores de cuidados de saúde em garantir a prestação de cuidados de saúde eficazes, de forma a aumentar a esperança média de vida com qualidade, que conseqüentemente permite diminuir a incidência e

disseminação de estirpes resistentes aos antibióticos, com impacto directo na incidência de mortalidade e morbilidade, recursos médicos e económicos.

As medidas de controlo de infecção são indispensáveis em ambiente hospitalar, e assumem cada vez mais importância em unidades de prestação de cuidados de saúde da comunidade, como os lares de idosos. O cumprimento de medidas em todas as unidades de prestação de cuidados de saúde, como higienização e desinfecção das mãos dos profissionais de saúde é fundamental para evitar a disseminação de estirpes resistentes aos antibióticos, assim como o isolamento destes pacientes (Bem-Ami *et al*, 2006, Oteo *et al*, 2006, Arpin *et al*, 2007).

É fundamental a sensibilização dos laboratórios de microbiologia para a detecção de estirpes produtoras de BLEA e monitorização terapêutica adequada, para aconselhar o clínico na selecção do antibiótico adequado, de forma a diminuir o consumo de antibióticos inadequados que contribuem para a pressão selectiva com aparecimento de estirpes resistentes (Bonomo, 2000, Arpin *et al*, 2007).

O tracto intestinal representa um importante reservatório de bactérias resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, particularmente em espécies da família das *Enterobacteriaceae*, e um importante local de transferência dos genes que conferem resistência ao referido grupo de antibióticos. A colonização intestinal por estirpes produtoras de BLEA, em residentes de lares de idosos, pode contribuir para a entrada silenciosa em ambiente hospitalar. A mobilização dos residentes colonizados por estirpes produtoras de BLEA inter-instituições facilita a introdução e disseminação nestes ambientes de prestação de cuidados de saúde (Bem-Ami *et al*, 2006).

Esta realidade, ainda pouco estudada no nosso país, demonstra a necessidade de se contemplar este tipo de estudo, em unidades de prestação de cuidados de saúde existentes na comunidade, como um ambiente particularmente relevante na disseminação da resistência aos antibióticos, podendo considerar-se importante na introdução de estirpes resistentes aos antibióticos, nomeadamente as produtoras de BLEA, no ambiente hospitalar. A detecção de estirpes produtoras de BLEA como colonizadoras fecais em residentes oriundos de lares de idosos, aquando do internamento hospitalar será muito relevante em termos de controlo de infecção hospitalar, de forma a evitar a introdução destas no ambiente do hospital, bem como

medidas de controlo de infecção adequadas, incluindo isolamento destes residentes, vantajoso para o residente promovendo uma terapêutica adequada em caso de vir a instalar-se um processo infeccioso para o qual a flora fecal possa contribuir, e colaborando para o controlo da disseminação destas estirpes.

O estudo permitiu demonstrar a existência de estirpes produtoras de BLEA na comunidade, particularmente em lares de idosos, que em Portugal são cada vez mais, e indispensáveis, dadas as características da nossa população, bem como a necessidade de existir prestação de cuidados de saúde, fora do ambiente hospitalar. Os prestadores de cuidados de saúde em lares de idosos devem ser sensibilizados para esta realidade, no sentido de adoptarem medidas de controlo de infecção adequadas e ajustadas a cada instituição, com o objectivo de minimizar a disseminação de estirpes resistentes aos antibióticos entre os residentes e a outros ambientes da comunidade e ambiente hospitalar, e garantir a prestação de cuidados de saúde de qualidade.

**CONCLUSÃO**

---

A colonização de residentes de lares de idosos por bacilos de Gram negativo da família *Enterobacteriaceae* produtores de BLEA é uma realidade em vários países da Europa e dos Estados Unidos da América, mas ainda pouco conhecida no nosso País. É importante contemplar este tipo de estudo em ambientes relevantes na disseminação da resistência aos antibióticos como é a área de prestação de cuidados geriátricos.

O aparecimento e rápida disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA, torna imprescindível conhecer com exactidão a origem destas espécies: hospital ou comunidade. Na comunidade, os lares de idosos constituem importantes reservatórios de espécies bacterianas com resistência aos oximino- $\beta$ -lactâmicos, como demonstrado no presente estudo. A detecção destas espécies produtoras de BLEA como colonizadoras fecais em residentes de lares de idosos, aquando do internamento hospitalar, é extremamente relevante em termos de implementação de medidas adequadas de controlo de infecção hospitalar.

A educação e sensibilização dos prestadores de cuidados de saúde para as medidas de controlo de infecção é fundamental em ambiente hospitalar, assim como em lares de idosos, unidades de cuidados de saúde com papel importante na disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA, como demonstrado pelo presente estudo.

**PERSPECTIVAS FUTURAS**

---

A incidência e disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEA assumem um papel relevante em unidades de prestação de cuidados de saúde, como o hospital, nichos particulares da comunidade como os lares de idosos e no meio ambiente.

Com o objectivo de conhecer esta realidade no nosso país, sugere-se as seguintes perspectivas futuras:

- Caracterização molecular das BLEA detectadas no presente estudo;
- Avaliação das relações de clonalidade entre os isolados produtores de BLEA detectados no estudo, de forma a interpretar epidemiologicamente a sua ocorrência;
- Caracterização molecular das metalo- $\beta$ -lactamases detectadas no presente estudo;
- Detecção de resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em águas marítimas e pluviais nas áreas circundantes aos lares de idosos;
- Continuidade do estudo da colonização do tracto intestinal por bacilos de Gram negativo da família *Enterobacteriaceae*, para detecção e caracterização molecular de BLEA em outros lares de idosos da zona norte do País e outras unidades de prestação de cuidados de saúde como hospitais, unidades de cuidados continuados de média e longa duração, paliativos e de convalescença;
- Detecção de estirpes produtoras de BLEA em residentes provenientes de residências de idosos, aquando da admissão hospitalar, de forma a evitar a introdução destas no ambiente hospitalar, propondo medidas de controlo de infecção adequadas, incluindo isolamento destes pacientes.

**MANUSCRITO DE ARTIGO CIENTÍFICO – *LETTER***  
**A SUBMETER A PUBLICAÇÃO**

---

## **Extended-spectrum beta-lactamase producers in Portuguese nursing home residents**

### **Background**

Faecal colonization with antimicrobial resistant *Enterobacteriaceae* might represent a risk of infection and spreading in settings of debilitated people as are nursing homes (Wiener *et al*, 1999).

Our previous work in clinical isolates of community alerted us for the finding of Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producers in particular niches of community as are nursing homes (Pedrosa *et al*, 2007). In that way the purpose of this study was the detection of ESBL producers responsible for intestinal colonization of nursing home residents.

Geriatric care facilities are a particular kind of aggregate community presenting special threats related to the characteristics of the population. In that way, the type of care in these facilities, the grade of dependence of the residents and type of pathologies, seems to relate with colonization by antibiotic resistant strains (Wiener *et al*, 1999).

### **Objective**

The purpose of this study was the detection of ESBL producers responsible for intestinal colonization of nursing home residents.

### **Methods**

Faecal samples of nursing home residents of the Northern area of Portugal, were collected from January to July of 2008. Samples were suspended in BHI and overnight culture was spread in MacConkey agar. Isolates were selected with ceftazidime (2mg/L), cefotaxima (2mg/L), aztreonam (2mg/L) and imipenem (2mg/L). Lactose fermenters were randomly selected and susceptibility to antimicrobial agents was determined by agar diffusion methods according to the CLSI guidelines (CLSI, 2007).

Colony counts of faecal samples were performed in MacConkey agar in order to relate to the presence of isolates in selective media with antibiotics. Screening for ESBL producers was performed by the double disk synergy test and, when necessary, confirmatory test were carried out according to the CLSI guidelines (CLSI, 2007). Identification of the selected strains was achieved by API®20E. Beta-lactamases were characterized by isoelectric focusing. Conjugation assays were performed with *Escherichia coli* HB101.

## Results

*Enterobacteriaceae* harbouring ESBLs of  $pI > 8$  were prevalent in this approach seeming to relate with the previous reports of spreading of *Escherichia coli* clone harbouring CTX-M-15, OXA-1 and TEM-1 in Portuguese community (Machado *et al*, 2006).

$pI$	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Morganella morganii</i>
5,4+7,4+>8,0	17					1			
5,4+>8,0	17	1		2		1			
7,4+>8,0	2				1				
>8,0	3	2					1		
7,6+>8,0					1				
5,4+7,4+7,6+>8,0			1						
5,4+5,6+7,0+7,4+7,6+>8,0	1								
5,6+7,2+7,4+7,6+>8,0							1		
5,4+7,6+>8,0						2		2	1
5,4+7,8+>8,0						1			

Prevalence of one pattern of beta-lactamase association of 5,4+7,4+>8, and other combinations of beta-lactamase  $pI > 8$  with beta-lactamase of  $pI$ s 5,4 and 7,4 and other ones, suggests that we might be in face of a clonal and plasmidic dispersion of *Escherichia coli*.

ESBL gene was successfully transferred coding a beta-lactamase of pl>8 responsible for the ESBL phenotype.

## Conclusions

Our results showed that nursing homes are particular niches of community that need adequate infection control measures for the prevention of inner and outer dissemination of multi-resistant opportunistic pathogens. This reality may pose questions in terms of acute care hospital admissions of nursing home residents, suggesting the need of special measures to prevent hospital dissemination. Also the inverse, spreading in nursing homes from colonized patients discharged from hospital that return to the geriatric care facility or family home, might create a cycle of dissemination of ESBL producing *Enterobacteriaceae*.

## Bibliography

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement M100-S17 ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., Baquero, F., Sousa, J. C., Peixe, L. and The Portuguese Resistance study Group. (2006). Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1- producing *Enterobacteriaceae* strains containing the acc(6')-Ib-cr gene, which encodes an aminoglycoside- and fluorquinolone-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:3220-3221.

- Pedrosa, A.S., Duarte, B.P., Sousa, M.I. and Ferreira, H.N. (2007). Emerging ESBL producers in particular niches of community. *4<sup>th</sup> Congress of the European Society for Emerging Infections, Lisbon - Portugal*.

- Wiener, J., Quinn, J., Bradford, P., Goering, R., Nathan, C. Bush, K. and Weinstein, R. (1999). Multiple Antibiotic-Resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in Nursing Homes. *JAMA*, 6(281):517-523.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- Ali Shah, A., Hasan, F., Ahmed, S. and Hameed, A. (2004). Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β-lactamases. *Research in Microbiology*, 155:409-421.
  
- Arpin, C., Coulange, L., Dubois, V., André, C., Fischer, I., Fourmaux, S., Grobost, F., Jullin, J., Dutilh, B., Couture, J. F., Noury, P., Lagrange, I., Ducastaing, A., Doermann, H. P. and Quentin, C. (2007). Extended-Spectrum-β-lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Strains in Various Types of Private Health Care Centers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(9):3440-3444.
  
- Arpin, C., Dubois, V., Coulange, L., André, C., Fischer, I., Noury, P., Grobost, F., Brochet, J., Jullin, J., Dutilh, B., Larribet, G., Lagrange, I. and Quentin, C. (2003). Extended-Spectrum-β-lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Community and Private Health Care Centers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(11):3506-3514.
  
- Baquero, F., Nombela, C., Cassell, G. and Gutiérrez-Fuentes, J. (2008). Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal. *American Society Microbiology*. Washington.
  
- Ben-Ami, R., Schwaber, M., Navon-Venezia, S., Schwartz, D., Giladi, M., Chmelnitsky, I., Leavitt, A. and Carmeli, Y. (2006). Influx of Extended-Spectrum β-lactamases Producing *Enterobacteriaceae* into the Hospital. *Clinical Infectious Diseases*, 42(1):925-934.
  
- Bisson, G., Fishman, N., Patel, J., Edelstein, P. and Lautenbach, E. (2002). Extended-Spectrum β-lactamases-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: risk factors colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 23(5):254-260.
  
- Bonnet, R. (2004). Growing Group of Extended-Spectrum β-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1):1-14.

- Bonomo, R. (2000). Multiple antibiotic-resistant bacteria in long-term-care facilities: an emerging problem in the practice of infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 31: 1414-1422.
- Bonomo, R., Donskey, C., Blumer, J., Hujer, A., Hoenig, C., Jacobs, M., Whalen, C. and Salata, R. (2003). Cefotaxime-Resistant Bacteria Colonizing Older People Admitted to an Acute Care Hospital. *American Geriatrics Society*, 51:519-522.
- Bradford, P. (2001). Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4): 933-951.
- Bradford, P. and Bonomo, R. (2005). Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4): 657-686.
- Bush, K., Jacoby, G. and Medeiros, A. (1995). A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6):1211-1233.
- Cabello, F. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7): 1137-1144.
- Calbo, E., Romaní, V., Mariona, X., Gómez, L., Vidal, C., Quintana, S., Vila, J. and Garau, J. (2006). Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57:780-783.
- Cantón, R. and Coque, T. (2006). The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9:466-475.
- Cantón, R., Valverde, A., Novais, Á., Baquero, F. and Coque, T. (2007). Evolución y panorama actual de las BLEE. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 25(2):2-10.

- Christiaens, G., Barbier, C., Warnotte, J. and Mutsers, J. (2008). Implementation of an infection control programme to limit the spread of extended spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a Belgian university hospital. *Journal of Hospital Infection*, 68:366-380.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement M100-S17 ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.
- Colodner, R. (2005). Extended-spectrum-β-lactamases: A challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. *Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology*, 33(2):104-107.
- Conterno, L. O., Shymanski, J., Ramotar, K., Toye, B., Zvonar, R. and Roth, V. (2007). Impact and cost of infection control measures to reduce nosocomial transmission of extended spectrum β-lactamase-producing organisms in a non-outbreak setting. *Journal of Hospital Infection*, 65:354-360.
- Coque, T. M., Baquero, F. and Canton, R. (2008). Increasing Prevalence of ESBL-Producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill*, 13(47):19044. [<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19044> - 21/11/2008]
- Coque, T. M., Novais, Â., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Baquero, F. Cantón, R. and Nordmann, P. (2008). Dissemination of Clonally Related *Escherichia coli* Strains Expressing Extended-Spectrum β-Lactamase CTX-M-15. *Emerging Infectious Diseases*, 14(2):195-200.
- Denton, M. (2007). *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29(3):9-22.
- Doi, Y. and Paterson, D. (2007). Detection of plasmid-mediated class C β-lactamases. *International Journal of Infectious Diseases*, 11:191-197.

- Doi, Y., Adams, J., O'Keefe, A., Quereshi, Z., Ewan, L. and Paterson, D. (2007). Community acquired Extended-Spectrum β-lactamases Producers, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 13(7): 1121-1123.
- Donskey, C. (2006). Antibiotic Regimens and Intestinal Colonization with Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Clinical Infectious Diseases*, 43(2):62-69.
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W. and Jarlier, V. (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum β-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *CMI*, 14(1):90-103.
- Drinka, P., Stemper, M., Gauerke, C., Miller, J. and Reed, K. (2004). The Identification of Genetically Related Bacterial Isolates Using Pulsed Field Gel Electrophoresis on Nursing Home Units: A Clinical Experience. *American Geriatrics Society*, 52(8):1373-1377.
- Fang, H., Ataker, F., Hedin, G. and Dornbusch, K. (2008). Molecular Epidemiology Extended-Spectrum-β-lactamases among *Escherichia coli* Isolates Collected in a Swedish Hospital and Its Associated Health Care Facilities from 2001 to 2006. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (2):707-712.
- Filius, P; Gyssens, I., Kershof, I., Roovers, P., Ott, A., Vulto, A., Verbrugh, H. and Endtz, H. (2005). Colonization and Resistance Dynamics of Gram-Negative Bacteria in Patients during and after Hospitalization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7): 2879-2886.
- Fluit, A., Maarten, R. Visser, R. and Schmitz, F. (2001). Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4):836-871.
- Gheldre, Y., Avesani, V., Berhin, C., Delmée, M. and Glupczynski, Y. (2003). Evaluation of Oxid combination discs for detection of extended-spectrum β-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52:591-597.

- Giske, C., Sundsfjord, A., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D. Cantón, R. and Walsh, T. (2008). Redefining extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1-14.
- Graffunder, E., Preston, K., Evans, A and Venezia, R. (2005). Risk factors associated with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing organisms at a tertiary care hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 139-145.
- Harris, A., Kotetishvili, M., Shurland, S., Johnson, J., Morris, G., Nemoy, L., and Johnson, J. (2007). How important is patient-to-patient transmission in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase *Escherichia coli* acquisition. *Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology*, 35(2):97-101.
- Hawkey, PM. (2008). Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *British Journal of Pharmacology*, 153:406-413.
- Isenberg, H. (2004). Clinical Microbiology Procedures Handbook. *American Society Microbiology*. Washington.
- Jacoby, G. and Munoz-Price, L. (2005). Mechanisms of Disease: The new  $\beta$ -Lactamases. *N Engl J Med*, 352(4)380-91.
- Jarlier, V., Nicolas, M., Fournier, G., and Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10:867-878
- Kassis-Chikhani, N., Vimont, S., Asselat, K., Trivalle, C., Minassian, B., Sengelín, C., Gautier, V., Mathieu, D., Dussaix, E. and Arlet, G. (2004). CTX-M  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* in Long-term Care Facilities, France. *Emerging Infectious Diseases*, 9(10):1697-1698.
- Levey, S. and Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 12(10): 122-129.

- Lewis, J., Herrera, M., Wickes, B., Patterson, J. and Jorgensen, J. (2007). First Report of the Emergence of CTX-M-Type Extended-Spectrum-β-Lactamase (ESBLs) as the Predominant ESBL Isolated in a U.S. Health Care System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11):4015-4021.
  
- Livermore, D. M. (2008). Defining an extended-spectrum β-lactamase. *CMI*, 14(1):3-10.
  
- Livermore, D. M. and Woodford, N. (2006). The β-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*, 14(9): 413-419.
  
- Livermore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L. and Woodford, N. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59:165-174.
  
- Loeb, M., Brazil, K., Lohfeld, L., McGeer, A., Simor, A., Stevenson, K., Walter, S. and Zoutman, D. (2002). Optimizing antibiotics in residents of nursing homes: protocol of a randomized trial. *BMC Health Services Research*, 2(17):1-6.
  
- López-Cerero, L. and Pascual, Á. (2007). Epidemiología de las BLEE en la comunidad: un problema emergente. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 25(2):23-28.
  
- Machado, E., Coque, T., Cantón, R. Novais, Â., Sousa, J.C., Baquero, F. and Peixe, L. (2007). High diversity of extended-spectrum β-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60:1370-1374.
  
- Mascaretti, O. (2003). *Bacteria versus Antimicrobial Agents: an Integrated Approach*. American Society Microbiology. Washington.
  
- Maslow, J., Lautenbach, E., Glaze, T., Bilker, W. and Johnson, J. (2004). Colonization with Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* among Nursing Home Residents and

its Relationship to Fluoroquinolone Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(9): 3618-3620.

- McMullan, R., Loughrey, A. C., McCalmont, M. and Rooney, P. J. (2007). Clinico-epidemiological features of infections caused by CTX-M type extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in hospitalised patients. *Journal of Infection*, 54:46-52.

- Mendelson, G., Hait, V., Ben-Israel, J., Gronich, D., Granot, E. and Raz, R. (2005). Prevalence and risk factors of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in an Israeli long term care facility. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 24: 17-22.

- Mendonça, N., Leitão, J., Manageiro, V., Ferreira, E., the antimicrobial resistance Surveillance Program in Portugal and Caniça, M. (2007). Spread of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase CTX-M-Producing *Escherichia coli* Clinical Isolates in Community and Nosocomial Environments in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(6):1946-1955.

- Mesa, R., Blanc, V., Blanch, A., Corte, P., Gonza, J., Miro, E., Muniesa, M., Saco, M., Tortola, M.T., Mireles, B., Coll, P., Llagostera, M., Prats, G. and Navarro, F. (2006). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58: 211–215

- Miró, E., Mirelis, B., Navarro, F., Rivera, A., Mesa, R., Roig, M. C., Gómez, L. and Coll, P. (2005). Surveillance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56:1152–1155.

- Moor, C. T., Roberts, S.A., Simmons, G., Briggs, S., Morris, A. J., Smith, J. and Heffernan, H. (2008). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing

enterobacteria: factors associated with infection in the community setting, Auckland, New Zealand. *Journal of Hospital Infection*, 68:355-362.

- Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Pfaller, M. and Tenover, R. (2003). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM, Washington.

- Naas, T., Poirel, L. and Nordmann, P. (2008). Minor extended-spectrum β-lactamases. *CMI*, 14(1): 42-52.

- Nicolas-Chanoine, M. H., Jarlier, V. and 'La Collégiale' de Bactériologie-Virologie-Hygiène Hospitalière de l'Assistance Publique. (2008). Extended-spectrum β-lactamases in long-term-care facilities. *CMI*, 14(1):111-116.

- Österblad, M., Hakanen, A., Manninen, R., Leistevo, T., Peltonen, R., Meurman, O., Huovinen, P. and Kotilainen, P. (2000). A between-Species Comparison of Antimicrobial Resistance in *Enterobacteria* in Fecal Flora. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6):1479-1484.

- Oteo, J., Navarro, C., Cercenado, E., Delgado-Iribarren, A., Wilhelmi, I., Orden, B., Garcia, C., Miguelañez, S., Pérez-Vázquez, M., Garcia-Cobos, S., Aracil, B., Bautista, V. and Campos, J. (2006). Spread of *Escherichia coli* Strains with High-Level Cefotaxime and Ceftazidime Resistance between the Community, Long-Term Care Facilities, and Hospital Institutions. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7):2359-2366.

- Owens, R. and Rice, L. (2006). Hospital-Based Strategies for Combating Resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 42(4):173-181.

- Paterson, D. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *The American Journal of Medicine*, 119(6A):20-28.

- Paterson, D. (2007). Tratamento de las infecciones por microorganismos productores de BLEE. *Enferm Infecc Microb Clin*, 25(2):60-63.

- Paterson, D. and Bonomo, R. (2005). Extended-spectrum-β-Lactamase: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4):657-686.
- Pedrosa, A.S., Duarte, B.P., Sousa, M.I. and Ferreira, H.N. (2007). Emerging ESBL producers in particular niches of community. 4<sup>th</sup> Congress of the European Society for Emerging Infections, Lisbon - Portugal.
- Peña, C. and Pujol, M. (2007). Epidemiología y control de los microorganismos productores de BLEE nosocomiales. *Enferm Infec Microbiol Clin*, 25(2):18-22.
- Peña, C.; Gudiol, C., Calatayud, L., Tubau, F., Domínguez, M.A., Pujol, M., Ariza, J. and Gudiol, F. (2008). Infections due to *Escherichia coli* producing extended-spectrum β-lactamase among hospitalised patients: factors influencing mortality. *Journal of Hospital Infection*, 68:116-122.
- Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K. and Bonomo, R. (2007). The continuing challenge of ESBLs. *Current Opinion in Pharmacology*, 7:459-469.
- Pfaller, M. and Segreti, J. (2006). Overview of the Epidemiological Profile and Laboratory Detection of Extended-Spectrum β-lactamases. *Infectious Diseases Society of America*, 42(4):153-163.
- Pitout, J. D. and Laupland, K. (2008). Extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *The Lancet*, 8:159-166.
- Pitout, J., Hamilton, N., Church, D., Nordmann, P. and Poirel, L. (2007). Development and clinical validation of a molecular diagnostic assay to detect CTX-M-type β-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology Infect*, 13(3):291-297.
- Pitout, J., Hossain, A. and Hanson, N. (2004). Phenotypic and Molecular detection of CTX-M-β-lactamases Produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.*. *Journal of Clinical Microbiology*, 12(42):5715-5721.

- Pitout, J., Nordmann, P., Laupland, K. and Poirel, L. (2005). Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56:52-59.
- Pitout, J., Reisbig, M., Venter, E., Church, D. and Hanson, N. (2003). Modification of the double-Disk test for detection of *Enterobacteriaceae* producing Extended-Spectrum and AmpC β-lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(8): 3933-3935.
- Queenan, A. and Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile β-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3):440-458.
- Rodríguez-Baño, J., López-Cerero, L., Navarro, M., Díaz de Alba, P. and Pascual, A. (2008). Faecal carriage of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
- Rodríguez-Baño, J. and Ngugro, M. (2008). Extended-spectrum β-lactamases in ambulatory care: a clinical perspective. *CMI*, 14(1):104-110.
- Rodríguez-Baño, J. and Pascual, A. (2004). Microorganismos multirresistentes, ¿adquisición nosocomial o comunitaria? *Enterobacteriaceae* into the Hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22(9):505-506.
- Rodriguez-Baño, J. and Paterson, D. (2006). A Change in the Epidemiology of Infections Due to Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Organisms. *Clinical Infectious Diseases*, 42(1):935-937.
- Rodriguez-Baño, J., Navarro, M., Romero, L., Muniain, M., Perea, E., Pérez-Cano, R., Hernández, J. R. and Pascual, A. (2006). Clinical and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing *Escherichia coli* as a Cause of Nosocomial Infection or Colonization: Implications for Control. *Clinical Infectious Diseases*, 42(1):37-45.

- Samaha-Kfoury, J. and Araj, G. (2003). Recent developments in  $\beta$ -lactamases and extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *BMJ*, 327:1209-1213.
- Sandoval, C., Walter, S., McGeer, A., Simor, A., Bradley, S., Moss, L. and Loeb, M. (2004). Nursing Home Residents and *Enterobacteriaceae* Resistant to third-generation Cephalosporins. *Emerging Infectious Diseases*, 10(6):1050-1055.
- Shah, A., Hasan, F, Ahmed, S. and Hameed, A. (2004). Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Research in Microbiology Reviews*, 409:421.
- Simor, A. (2001). The Role of the Laboratory in Infection Prevention and Control Programs in Long-Term-Care Facilities for the Elderly. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 22:459-463.
- Sousa, J. C. (2006). Manual de Antibióticos Antibacterianos. *Edição Universidade Fernando Pessoa*. Porto.
- Stürenburg, E. and Mack, D. (2003). Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *Journal of Infection*, 47:273-295.
- Torres, C. and Zarazaga, M. (2007). BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. *Enferm Infecc Microb Clin*, 25(2):29-37.
- Toubes, E., Singh, K., Yin, D., Lyu, R., Glick, N., Russell, L., Mohapatra, S., Saghal, N., Weinstein, A. and Trenholme, G. (2003). Risk Factors for Antibiotic-Resistant Infection and Treatment Outcomes among Hospitalized Patients Transferred from Long-Term Care Facilities: Does Antimicrobial Choice Make a Difference?. *Clinical Infectious Diseases*, 36(15): 724-30.
- Valverde, A., Coque, T., Sánchez-Moreno, M., Rollán, A., Baquero, F. and Cantón, R. (2004). Dramatic Increase in Prevalence of Fecal Carriage of Extended-Spectrum  $\beta$ -

Lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during Nonoutbreak situations in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10):4769-4775.

- Warren, R. E., Harvey, G., Carr, R., Ward, D. and Doroshenko, A. (2008). Control of infectious due to extended-spectrum β-lactamase-producing organisms in hospitals and the community. *CMI*, 14(1):124-133.

- Wiener, J., Quinn, J., Bradford, P., Goering, R., Nathan, C. Bush, K. and Weinstein, R. (1999). Multiple Antibiotic-Resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in Nursing Homes. *JAMA*, 6(281):517-523.

[<http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC438/decker/AntibioticRes/AntibioticResistance.html-02/11/08>]

**ANEXOS**

---

## ANEXO I

Susceptibilidade da *Escherichia coli* ATCC® 25922 aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e não  $\beta$ -lactâmicos

<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922			
<b>Antibióticos</b> (halo de inibição em mm)	<b><math>\beta</math>-lactâmicos</b>	AMC	24
		AML	18
		CAZ	28
		IMP	30
		CXM	26
		FOX	24
		ATM	33
		CTX	32
		FEP	33
	<b>Outros antibióticos não <math>\beta</math>-lactâmicos</b>	F	22
		NET	23
		TE	21
		C	23
		CIP	35
		S	16
NA	25		

## ANEXO II

Perfil de susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos dos isolados bacterianos do lar FFUP1

Amostra	Isolado	Antibiótico de Seleção	Espécie	Antibióticos $\beta$ -lactâmicos (halo de inibição em mm)									pI
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX	
FFUP101	FFUP101ctxsed1	CTX		14	15	20	32	28	na	28	27	26	
FFUP105	FFUP105cazS1	CAZ	<i>Citrobacter freundii</i>	6	7	7	12 Si	7 Si	na	7 Si	13	6	5,4 + >8,0
	FFUP105ctxS1	CTX	<i>Citrobacter freundii</i>	6	7	7	10 Si	9 Si	na	8 Si	13	9	5,4 + >8,0
FFUP106	FFUP106ctxS1	CTX	<i>Morganella morganii</i>	7	12	6	24	22	na	27	25	21	
	FFUP106ctxS2	CTX		Sv	15	Sv	Sv	Sv	na	Sv	Sv	Sv	
	FFUP106cazS1	CAZ		6	12	6	9	10	na	21	22	18	
	FFUP106cazsed2	CAZ		6	6	6	16	14	na	27	23	21	

**Legenda:** S - Sobrenadante; sed - sedimento; Si - sinergismo com AMC (30 $\mu$ g); na - não avaliado; A\* - antagonismo com IMP; A<sup>q</sup> - antagonismo com FOX; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição; pI - ponto Isoelétrico.

## ANEXO III

Perfil de susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos dos isolados bacterianos do lar FFUP2

Amostra	Isolado	Antibiótico de Seleção	Espécie	Antibióticos $\beta$ -lactâmicos (halo de inibição em mm)									pI
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX	
FFUP204	FFUP204ctxS1	CTX		6	6	6	6	21	na	25	29	6	
	FFUP204cazS4	CAZ		6	6	6	6	18	na	17	30	6	
	FFUP204cazsed1	CAZ		6	6	6	6	16	na	16	30	6	
	FFUP204cazsed2	CAZ		6	6	6	6	16	na	15	26	6	
FFUP207	FFUP207ctxS3	CTX		6	6	6	21	28	na	29	35	6	
FFUP219	FFUP219ctxS1	CTX		6	6	6	11	29	na	18	31	6	
FFUP220	FFUP220cazsed1	CAZ		Sv	Sv	Sv	Sv	Sv	na	Sv	Sv	Sv	
	FFUP220cazS1	CTX		6	Sv	Sv	6	6	na	Sv	Sv	6	
FFUP221	FFUP221ctxsed1	CTX	<i>Proteus mirabilis</i>	6	6	11	17	14 Si	na	26 Si	28	23	7,6 + >8,0
	FFUP221ctxsed2	CTX		6	6	8	24	23	na	28	24	21	
	FFUP221ctxS1	CTX		Sv	6	Sv	Sv	Sv	na	Sv	Sv	Sv	
	FFUP221ctxS2	CTX		6	6	9	25	25	na	32	29	23	
	FFUP221ctxS3	CTX		6	6	11	27	25	na	32	32	Sv	

**Legenda:** S - Sobrenadante; sed - sedimento; Si - sinergismo com AMC (30 $\mu$ g); na - não avaliado; A\* - antagonismo com IMP; A<sup>a</sup> - antagonismo com FOX; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição; pI - ponto Isoelétrico.

## ANEXO IV

Perfil de susceptibilidade aos antibióticos β-lactâmicos dos isolados bacterianos do lar FFUP3

Identificação	Isolado	Antibiótico de selecção	Espécie	Antibióticos β-lactâmicos (halo de inibição em mm)									pI
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX	
FFUP301	FFUP301ctxS1	CTX	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6	6	6	13	na	15	10	na	
FFUP302	FFUP302ctxS1	CTX	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	12	6	6	6	na	10	36	na	
	FFUP302cazS1	CAZ		6	11	6	17	9	na	12	34	na	
	FFUP302cazS2	CAZ		6	12	19	22	24	na	22	32	na	
	FFUP302cazsed1	CAZ		6	15	6	22	18	na	16	Sv	6	
	FFUP302cazsed3	CAZ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6	6	6	7	na	12	10	6	
FFUP306	FFUP306cazS1	CAZ		6	Sv	Sv	Sv	Sv	na	Sv	34	na	
FFUP307	FFUP307cazS2	CAZ		6	6	6	23	Sv	na	34 A*	25	na	
FFUP308	FFUP308ctxS1	CTX	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6	6	6	15	na	17	12	na	
FFUP310	FFUP310cazsed2	CAZ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6	6	6	7	na	9	7	na	
FFUP313	FFUP313cazsed1	CAZ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	10	6	17	11	na	12	26	6	
	FFUP313ctxsed1	CTX	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	15	6	16	10	na	14	28	6	
	FFUP313ctxs2	CTX		6	9	10	24	18 A*	na	20 A*	23	na	
FFUP321	FFUP321ctxS1	CTX	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6	6	13	27 A*	na	20	27	6	
FFUP322	FFUP322ctxS1	CTX	<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	10	6	28	30	na	15	30	na	5,4 + 7,4 + 7,6 + >8,0
	FFUP322ctxS2	CTX	<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	11	6	25	28	na	14	25	na	5,4 + 7,4 + 7,6 + >8,0
FFUP329	FFUP329cazS2	CAZ		6	6	6	6	15	na	18	25	6	
FFUP336	FFUP336ctxsed1	CTX		6	10	10	21	20	na	24	23	na	

**Legenda:** S - Sobrenadante; sed - sedimento; Si - sinergismo com AMC (30µg); na - não avaliado; A\* - antagonismo com IMP; A<sup>a</sup> - antagonismo com FOX; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição; pI - ponto Isoeléctrico.

## ANEXO V

Perfil de susceptibilidade aos antibióticos β-lactâmicos dos isolados bacterianos do lar FFUP4

Amostra	Isolado	Antibiótico de seleção	Espécie	Antibióticos β-lactâmicos (halo de inibição em mm)									pi
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX	
FFUP401	FFUP401ctxsed2	CTX	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6	6	28	Sv	na	7 Si	Sv	Sv	>8,0
	FFUP401cazS1	CAZ		6	9	11	20	16	na	19	26	6	
FFUP410	FFUP410ctxsed1	CTX		6	12	9	18	14	na	11	26	6	
	FFUP410ctxsed2	CTX		6	6	6	18	22	na	19	29	6	
	FFUP410cazsed1	CAZ		6	7	6	6	6	na	6	23	6	
FFUP412	FFUP412cazsed1	CAZ		6	12	9	17	12	na	16	23	6	
FFUP414	FFUP414cazsed1	CAZ		6	18	20	Sv	20	na	26	26	24	
	FFUP414ctxS1	CTX		6	22	24	Sv	Sv	na	26	26	Sv	
	FFUP414cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	6	6	10 Si	8 Si	na	6 Si	26	6	5,4 + 5,6 + 7,0 + 7,4 + 7,6 + >8,0
FFUP416	FFUP416ctxS2	CTX		6	6	6	16	26 A <sup>a</sup>	na	20	28	6	
FFUP417	FFUP417atmS2	ATM		6	6	6	20	24	na	20	30	6	

**Legenda:** Si - sinergismo com AMC (30µg); NA - não avaliado; A\* - antagonismo com IMP; A<sup>a</sup> - antagonismo com FOX; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição.

## ANEXO VI

Perfil de susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos dos isolados bacterianos do lar FFUP5

Amostra	Isolado	Antibiótico de Seleção	Espécie	Antibióticos $\beta$ -lactâmicos (halo de inibição em mm)									pl
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX	
FFUP502	FFUP502atmS1	ATM		6	12	6	11 Si	14	na	17	29	9	
	FFUP502cazS1	CAZ		6	12	6	7	10	na	10	24	15	
	FFUP502ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	15	6	14 Si	20 Si	na	18 Si	26	15	5,4 + 7,4 + > 8,0
FFUP504	FFUP504ctxsed1	CTX		6	12	6	8	10	na	13	26	11	
	FFUP504atmS2	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	15	6	11 Si	14	na	17 Si	26	12	7,4 + > 8,0
FFUP508	FFUP508atmsed1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	10	6	6	6	na	6 Si	26	20	> 8,0
FFUP510	FFUP510ctxsed1	CTX		6	10	6	6 Si	6	na	6	26	20	
	FFUP510ctxS1	CTX	<i>Enterobacter aerogenes</i>	6	10	6	6 Si	6	na	8 Si	21	20	5,6 + 7,2 + 7,4 + 7,6 + > 8,0
FFUP511	FFUP511ctxsed1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	6	6	6	6	na	10	25	6	> 8,0
	FFUP511cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	7	6	18	19	na	31	21	20	5,4 + 7,4 + > 8,0
FFUP512	FFUP512ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	12	6	6 Si	12 Si	na	9 Si	28	20	
	FFUP512ctxsed1	CTX		6	12	6	6 Si	11 Si	na	8 Si	26	18	
FFUP513	FFUP513ctxS3	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	15	6	10 Si	15 Si	na	10 Si	32	26	5,4 + > 8,0
	FFUP513cazS2	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	11	6	6 Si	14 Si	na	11 Si	28	20	5,4 + 7,4 + > 8,0
	FFUP513atmS3	ATM		6	11	6	6 Si	12 Si	na	6 Si	30	24	5,4 + > 8,0

**Legenda:** Si - sinergismo com AMC (30 $\mu$ g); NA - não avaliado; A\* - antagonismo com IMP; A<sup>a</sup> - antagonismo com FOX; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição.

Perfil de susceptibilidade aos antibióticos β-lactâmicos dos isolados bacterianos do lar FFUP5 (continuação)

Amostra	Isolado	Antibiótico de Seleção	Espécie	Antibióticos β-lactâmicos (halo de inibição em mm)									pI
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX	
FFUP517	FFUP517ctxsed1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	12	6	6 Si	14 Si	na	6 Si	26	24	5,4 + 7,4 + > 8,0
	FFUP517ctxsed2	CTX		6	10	6	6Si	12 Si	na	9 Si	26	24	
	FFUP517ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	10	6	6 Si	13 Si	na	9 Si	26	24	5,4 + 7,4 + > 8,0
	FFUP517atmS1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	10	6	6	11 Si	na	9 Si	26	20	5,4 + > 8,0
FFUP518	FFUP518ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	8	10	17	15	na	21	25	9	5,4 + > 8,0
	FFUP518cazS2	CAZ	<i>Proteus mirabilis</i>	6	16	16	20 Si	7 Si	na	26 Si	24	26	7,4 + > 8,0
FFUP520	FFUP520ctxS1	CTX	<i>Citrobacter freundii</i>	6	10	6	6 Si	14 Si	na	10 Si	28	24	5,4 + > 8,0
	FFUP520cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	9	6	6 Si	6	na	6 Si	25	20	5,4 + 7,4 + > 8,0
FFUP521	FFUP521ctxS1	CTX	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	19	14 Si	19 Si	6	na	14 Si	25	19	> 8,0
	FFUP521ctxS2	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	8	6	6	6	na	7 Si	26	20	5,4 + > 8,0
	FFUP521cazS1	CAZ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	17	14 Si	20Si	6	na	12Si	24	20	
	FFUP521atmS2	ATM	<i>Enterobacter sakazakii</i>	6	9	15 Si	20 Si	6	na	14 Si	25	6	5,4 + 7,6 + > 8,0
	FFUP521ctxsed1	CTX		6	9	6	11	13	na	16	23	6	
FFUP522	FFUP522atmS1	ATM		6	10	6	6	11	na	8 Si	27	23	5,4 + > 8,0
	FFUP522cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	10	6	6 Si	12 Si	na	9 Si	26	20	5,4 + > 8,0
	FFUP522ctxsed1	CTX		6	9	6	6 Si	11 Si	na	8 Si	28	22	
	FFUP522ctxS1	CTX		6	10	6	6	11 Si	na	9 Si	26	22	5,4 + > 8,0
	FFUP522cazsed1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	10	6	6	11 Si	na	9 Si	28	24	5,4 + 7,4 + > 8,0

**Legenda:** Si - sinergismo com AMC (30µg); NA - não avaliado; A\* - antagonismo com IMP; A<sup>a</sup> - antagonismo com FOX; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição.

Perfil de susceptibilidade aos antibióticos β-lactâmicos dos isolados bacterianos do lar FFUP5 (continuação)

Amostra	Isolado	Antibiótico de Seleção	Espécie	Antibióticos β-lactâmicos (halo de inibição em mm)									pI
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX	
FFUP524	FFUP524ctxS1	CTX		6	6	6	16	28	na	24	24	6	
	FFUP524ctxsed1	CTX		6	10	6	8	Sv	na	9	26	6	
	FFUP524atmsed1	ATM		6	11	6	9	6	na	8	21	6	
	FFUP524cazsed1	CAZ		6	7	8	12	11	na	13	23	7	
FFUP525	FFUP525ctxS1	CTX		6	6	7	6	12	na	26 A*	12	8	
FFUP526	FFUP526cazsed1	CAZ		6	11	6	6 Si	15 Si	na	10 Si	30	22	> 8,0
	FFUP526cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	10	6	7 Si	12 Si	na	10 Si	28	26	5,4 + 7,4 + > 8,0
	FFUP526atmS1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	10	6	8 Si	14 Si	na	11	28	22	5,4 + 7,4 + > 8,0
	FFUP526ctxsed1	CTX		6	11	6	7 Si	13 Si	na	10 Si	26	22	5,4 + > 8,0
	FFUP526ctxS2	CTX		6	11	6	9 Si	15 Si	na	12 Si	28	22	
FFUP527	FFUP527ctxsed1	CTX	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	12	6	8 Si	14 Si	na	12 Si	28	22	5,4 + > 8,0
	FFUP527atmS1	ATM		6	11	6	7	13 Si	na	9 Si	28	24	
	FFUP527cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	14	24	30	18	na	30	26	26	> 8,0
	FFUP527cazS2	CAZ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	16	28 Si	22 Si	7	na	15 Si	22	22	
	FFUP527ctxS2	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	12	6	7	13 Si	na	10 Si	28	22	5,4 + > 8,0
FFUP530	FFUP530ctxS1	CTX		6	16	6	6 Si	8 Si	na	7 Si	Sv	24	
	FFUP530ctxS2	CTX		6	14	6	6 Si	6 Si	na	6 Si	Sv	22	
	FFUP530 atmS1	ATM		6	18	6	6 Si	7 Si	na	6 Si	24	10	
	FFUP530atmS2	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	16	6	6 Si	10 Si	na	6 Si	35	23	5,4 + > 8,0

**Legenda:** Si - sinergismo com AMC (30µg); NA - não avaliado; A\* - antagonismo com IMP; A<sup>a</sup> - antagonismo com FOX; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição.

Perfil de susceptibilidade aos antibióticos β-lactâmicos dos isolados bacterianos do lar FFUP5 (continuação)

Amostra	Isolado	Antibiótico de Seleção	Espécie	Antibióticos β-lactâmicos (halo de inibição em mm)									pI
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX	
FFUP531	FFUP531atmsed1	ATM	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	9	6	15	7	23 Si	11 Si	25	7	
	FFUP531ctxsed2	CTX	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	9	6	11	6	23 Si	8 Si	24	7	5,4 + 7,8 + >8,0
	FFUP531cazsed1	CAZ		6	14	6	15	18 A*	28	16 A <sup>a</sup>	28	6	
	FFUP531ctxS1	CTX		6	11	6	6	7	25	11	22	6	
	FFUP531ctxsed1	CTX		6	13	6	13	7	25	12	25	7	
	FFUP531impS1	IMP		6	8	6	18	18	20 Si	6 Si	6	6	
	FFUP531impS3	IMP	<i>Escherichia coli</i>	6	6	6	7	15 Si	18 Si	6 Si	6	6	5,4 + >8,0
FFUP532	FFUP532atmsed1	ATM	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	8	6	7	6	24 Si	6 Si	28	6	5,4 + 7,4 + >8,0
	FFUP532cazS2	CAZ	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	8	6	16	12 Si	22 Si	14 Si	19	6	5,4 + 7,4 + >8,0
	FFUP532impS1	IMP		6	8	6	11Si	17Si	18 Si	7	6	6	
FFUP533	FFUP533ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	22	6	12	12 Si	10 Si	6 Si	40	7	5,4 + 7,4 + >8,0
	FFUP533impSed1	IMP		6	8	6	7	18 Si	13 Si	12 Si	13	28	
FFUP534	FFUP534atmS1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	24	6	6	12 Si	11 Si	6 Si	36	24	5,4 + >8,0

**Legenda:** Si - sinergismo com AMC (30µg); NA - não avaliado; A\* - antagonismo com IMP; A<sup>a</sup> - antagonismo com FOX; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição.

Perfil de susceptibilidade aos antibióticos β-lactâmicos dos isolados bacterianos do lar FFUP5 (continuação)

Amostra	Isolado	Antibiótico de Seleção	Espécie	Antibióticos β-lactâmicos (halo de inibição em mm)									pI
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX	
FFUP535	FFUP535cazS1	CAZ	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	7	6	8	6	26 Si	6 Si	28	7	5,4 + 7,6 + >8,0
	FFUP535ctxsed1	CTX		6	6	6	6	14	26	14	24	6	
	FFUP535cazS2	CAZ		6	9	9	16 Si	14 Si	26 Si	12 Si	19	10	5,4 + 7,6 + >8,0
FFUP536	FFUP536cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	7	6	6	12 Si	14 Si	9 Si	36	25	5,4 + 7,4 + >8,0
	FFUP536ctxS2	CTX		6	6	6	6	24	22	19	30	6	
FFUP537	FFUP537cazS1	CAZ		6	13	6	6	14	12 Si	12 Si	26	25	
	FFUP537atmsed1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	9	6	8 Si	14 Si	12 Si	12 Si	26	24	5,4 + >8,0
	FFUP537atmS2	ATM		6	6	6	7	9	23	19	30	6	
FFUP538	FFUP538atmS1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	19	6	7 Si	16 Si	16 Si	15 Si	32	22	5,4 + >8,0
	FFUP538impsed1	IMP		6	7	6	15	20	19	13	28	6	
FFUP539	FFUP539atmS1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	9	6	12	14	13 Si	6 Si	29	6	5,4 + 7,4 + >8,0
	FFUP539ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	20	6	6	18	12 Si	6	38	6	5,4 + 7,4 + >8,0
FFUP540	FFUP540ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	28	6	7	18	12 Si	10	36	26	5,4 + >8,0
	FFUP540atmS1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	24	6	6	8 Si	11 Si	6 Si	36	19	5,4 + >8,0

**Legenda:** Si - sinergismo com AMC (30µg); na - não avaliado; A\* - antagonismo com IMP; A<sup>a</sup> - antagonismo com FOX; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição.

Perfil de susceptibilidade aos antibióticos β-lactâmicos dos isolados bacterianos do lar FFUP5 (continuação)

Amostra	Isolado	Antibiótico de Seleção	Espécie	Antibióticos β-lactâmicos (halo de inibição em mm)									pI
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX	
FFUP541	FFUP541impS1	IMP	<i>Escherichia coli</i>	6	9	6	16	26	22	14	32	6	
	FFUP541atmS2	ATM		6	14	6	24	24	27	13	Sv	6	
	FFUP541cazsed1	CAZ		6	16	6	8 Si	14 Si	11 Si	7 Si	26	22	5,4 + >8,0
	FFUP541ctxS1	CTX		6	20	6	9 Si	11 Si	16 Si	15 Si	32	24	5,4 + 7,4 + >8,0
	FFUP541cazS1	CAZ		6	19	6	8 Si	13 Si	14 Si	12 Si	28	21	5,4 + 7,4 + >8,0
FFUP542	FFUP542cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	26	6	6 Si	13 Si	12 Si	6	12	25	5,4 + >8,0
FFUP543	FFUP543cazsed1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	10	6	8 Si	14 Si	10 Si	12	Sv	22	5,4 + >8,0
FFUP544	FFUP544atmS1	ATM	<i>Enterobacter sakazakii</i>	6	11	12	28	30	32	15	30	32	5,4 + 7,6 + >8,0
FFUP546	FFUP546impS1	IMP		16	20	22	30	26	30	28	20	24	
FFUP547	FFUP547ctxsed1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	6	6	7	6	11	9	23	6	5,4 + > 8,0
	FFUP547atmS1	ATM		6	12	6	7	7	Sv	10	6	26	
	FFUP547impS1	IMP		6	7	6	22	30	26	20	22	6	
FFUP551	FFUP551cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	7	6	18 A*	14 A*	30	18	25	6	
	FFUP551ctxsed1	CTX		6	15	15	16 Si	14 Si	20 Si	11 Si	25	22	5,4 + > 8,0
	FFUP551ctxS1	CTX		6	6	6	13	9	29	16	22	6	
	FFUP551atmsed1	ATM		6	14	12	16 Si	12 Si	28 Si	13 Si	26	23	

**Legenda:** Si - sinergismo com AMC (30µg); na - não avaliado; A\* - antagonismo com IMP; A<sup>a</sup> - antagonismo com FOX; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição.

## ANEXO VII

Perfil de susceptibilidade aos antibióticos β-lactâmicos dos isolados bacterianos do lar FFUP6

Amostra	Isolado	Antibiótico de Seleção	Espécie	Antibióticos β-lactâmicos (halo de inibição em mm)									pl
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX	
FFUP601	FFUP601cazS1	CAZ	<i>Morganella morganii</i>	6	6	6	6	15	na	21 A <sup>o</sup>	17	18	
FFUP602	FFUP602atmS1	ATM		6	6	6	6	8	12	12	10	6	
FFUP603	FFUP603ctxS1	CTX		6	6	6	11	9	na	16	16	16	
	FFUP603ctxS2	CTX	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	7	6	6	6	na	6	25	6	5,4 + >8,0
	FFUP603ctxsed2	CTX		6	10	6	6	6	na	8	21	6	
	FFUP603atmS1	ATM	<i>Morganella morganii</i>	6	6	6	12	10	na	18	18	18	
FFUP604	FFUP604ctxS1	CTX	<i>Morganella morganii</i>	6	6	6	16	12	na	26	19	17	
FFUP606	FFUP606cazS2	CAZ		6	6	11	12	6	na	16	20	6	
	FFUP606atmS1	ATM	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	6	6	13	8	na	15	23	11	
	FFUP606atmsed1	ATM	<i>Citrobacter freundii</i>	6	6	6	10	11	na	15	20	10	
FFUP607	FFUP607ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	11	6	7 Si	12 Si	14 Si	12 Si	30	26	5,4 + >8,0
	FFUP607cazS1	CAZ	<i>Escherichia coli</i>	6	14	6	7	11 Si	12 Si	12 Si	28	27	
FFUP609	FFUP609cazsed1	CAZ		6	6	6	6	7	13	12	21	6	
FFUP610	FFUP610cazS1	CAZ		6	6	6	6	8	15	16	20	6	
FFUP612	FFUP612atmS1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	21	16 Si	20 Si	14 Si	24 Si	16	30	26	5,4 + 7,4 + >8,0
FFUP613	FFUP613ctxS1	CTX		6	6	6	6	8 A*	na	19	20	6	

**Legenda:** Si - sinergismo com AMC (30µg); na - não avaliado; A\* - antagonismo com IMP; A<sup>a</sup> - antagonismo com FOX; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição.

Perfil de susceptibilidade aos antibióticos β-lactâmicos dos isolados bacterianos do lar FFUP6 (continuação)

Amostra	Isolado	Antibiótico de Seleção	Espécie	Antibióticos β-lactâmicos (halo de inibição em mm)									pl
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX	
FFUP615	FFUP615ctxsed1	CTX		6	6	6	15	12	36	26	26	18	
FFUP617	FFUP617ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	22	6	22 Si	16 Si	18 Si	16 Si	26	24	5,4 + 7,4 + > 8,0
	FFUP617atmS1	ATM		6	19	14	18 Si	12 Si	25 Si	14 Si	26	24	
FFUP618	FFUP618atmS1	ATM	<i>Escherichia coli</i>	6	15	6	7 Si	10 Si	12 Si	12 Si	28	24	5,4 + 7,4 + > 8,0
	FFUP618cazS1	CAZ		6	14	6	7 Si	11 Si	15 Si	12 Si	30	26	
FFUP619	FFUP619ctxsed1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	11	6	6	11 Si	10	9 Si	27	25	5,4 + 7,4 + > 8,0
	FFUP619cazS1	CAZ	<i>Morganella morganii</i>	6	6	6	15	11	na	19	15	19	
FFUP620	FFUP620impsed1	IMP		6	6	6	6	10	10	8	9	6	
	FFUP620ctxS1	CTX		6	6	6	6	11	13	12	11	6	
FFUP621	FFUP621cazS1	CAZ		6	19	12	19	15	30	17	29	6	
FFUP622	FFUP622cazsed1	CAZ		6	7	8	11	12	22	28	22	19	
	FFUP622ctxsed1	CTX		12	12	12	17	16	na	34	32	22	
FFUP623	FFUP623cazS1	CAZ		6	15	12	21	20	26	26	34	22	

**Legenda:** Si - sinergismo com AMC (30µg); na - não avaliado; A\* - antagonismo com IMP; A<sup>a</sup> - antagonismo com FOX; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição.

Perfil de susceptibilidade aos antibióticos β-lactâmicos dos isolados bacterianos do lar FFUP6 (continuação)

Amostra	Isolado	Antibiótico de Seleção	Espécie	Antibióticos β-lactâmicos (halo de inibição em mm)									pI
				AML	AMC	CXM	CTX	CAZ	FEP	ATM	IMP	FOX	
FFUP624	FFUP624ctxS1	CTX	<i>Enterobacter aerogenes</i>	6	10	6	6 Si	12 Si	10 Si	6 Si	Sv	6	> 8,0
	FFUP624ctxS2	CTX		6	Sv	6	6 Si	14 Si	12 Si	6 Si	Sv	6	
FFUP628	FFUP628cazS1	CAZ		10	12	10	20	18	42	30	34	26	
FFUP629	FFUP629cazS1	CAZ		Sv	Sv	22	Sv	Sv	Sv	7	Sv	Sv	
	FFUP629ctxsed1	CTX		7	6	6	6	6	6	6	19	15	
FFUP631	FFUP631cazS1	CAZ	<i>Morganella morganii</i>	6	6	6	14	16	36	22	22	26	
	FFUP631ctxS1	CTX		6	6	8	16 A*	26 A*	Sv	28	32	6	
FFUP632	FFUP632cazsed1	CAZ		6	6	7	19	12	34	26	24	22	
	FFUP632ctxS1	CTX		14	12	12	20	18	S	Sv	Sv	24	
FFUP634	FFUP634ctxS1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	18	6	8 Si	16 Si	15 Si	14 Si	26	24	7,4 + > 8,0
FFUP635	FFUP635ctxS2	CTX		6	7	6	20	28	na	18	28	20	
	FFUP635impS1	IMP		6	6	6	6	9	15	14	9	6	
	FFUP635cazsed1	CAZ		6	6	6	7	14	16	16	12	6	
FFUP637	FFUP637atmsed1	ATM	<i>Morganella morganii</i>	26	6	16	18	22	Sv	32	6	18	5,4 + 7,6 + > 8,0
FFUP638	FFUP638ctxsed1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	Sv	6	7 Si	16 Si	11 Si	6 Si	36	26	5,4 + > 8,0
	FFUP638impsed2	IMP		6	9	6	9	24	19	14	28	6	
FFUP639	FFUP639cazS2	CAZ	<i>Morganella morganii</i>	12	13	8	16	16	40	6	32	22	
	FFUP639impS1	IMP		6	6	6	Sv	32 A*	32	27	28	6	
FFUP641	FFUP641ctxsed1	CTX	<i>Escherichia coli</i>	6	7	6	7 Si	11 Si	14 Si	14 Si	12	24	5,4 + > 8,0
	FFUP641ctxS1	CTX		6	20	6	9 Si	15 Si	13 Si	14 Si	28	22	
	FFUP641impsed1	IMP		6	7	20	28	26	28	34	20	14	

**Legenda:** Si - sinergismo com AMC (30µg); na - não avaliado; A\* - antagonismo com IMP; A<sup>o</sup> - antagonismo com FOX; A<sup>o</sup> - antagonismo com AML; Sv - bactéria sensível ao antibiótico mas impossível de medir o halo de inibição.

## ANEXO VIII

Resultados da presença da carbapenemase do tipo metalo- $\beta$ -lactamase para os isolados com perfil de resistência ao imipenemo.

Lar de Idosos	Isolado	Carbapenemo (halo de inibição em mm)	
		Imipenemo	Imipenemo/EDTA
FFUP3	FFUP301ctxS1	10	14
	FFUP302cazsed3	10	15
	FFUP308ctxS1	12	16
	FFUP310cazsed2	7	11
FFUP5	FFUP525ctxS1	12	16
	FFUP531impS3	6	26
	FFUP532impS1	9	13
	FFUP533impSed1	10	15
	FFUP535cazS2	19	25
	FFUP542cazS1	12	17
	FFUP547impS1	10	15
FFUP6	FFUP602atmS1	11	16
	FFUP613atmS1	11	16
	FFUP620impSed1	10	18
	FFUP635impS1	11	17

**Legenda:** Imipenemo/EDTA - disco de imipenemo com 10 $\mu$ L de EDTA (0,5M).