



**CARLA MANUELA
FERREIRA DE SÁ**

**ESBL em enterobactérias no Centro Hospitalar
Póvoa de Varzim/Vila do Conde**

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 Isabel Henriques, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação científica do Dr. Fernando Augusto Seixas Barandas Fonseca, Especialista em Patologia Clínica e Director do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Póvoa de Varzim/Vila do Conde.

A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita”.

Mahatma Gandhi

o júri

presidente

Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso

Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves

Investigador Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Isabel da Silva Henriques

Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dr. Fernando Augusto Seixas Barandas Fonseca

Chefe de Serviço e Director do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Póvoa de Varzim/Vila do Conde

agradecimentos

À Professora Doutora Isabel Henriques, orientadora deste trabalho, pela ajuda preciosa ao longo deste caminho nem sempre fácil, mostrando total disponibilidade, estímulo, orientação científica, sugestões e críticas que permitiram enriquecer a minha formação académica.

Ao Dr. Fernando Fonseca, co-orientador deste trabalho, e director do serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Póvoa Varzim/Vila Conde, agradeço toda a ajuda, orientações e críticas extremamente válidas ao longo do trabalho.

Ao Centro Hospitalar Póvoa de Varzim/Vila do Conde por autorizar a utilização dos dados necessários para esta pesquisa.

Às minhas colegas de mestrado e de trabalho, Angelina Maia, Marta Valadas e Emília Machado, pela partilha de informações, angústias, dúvidas e alegrias.

À Dr.^a Carla Leite, agradeço a sugestão inicial do tema para a minha tese, bem como o seu interesse e ajuda genuína na pesquisa dos dados e nas conversas informais sobre o tema.

À Dr.^a Alberta Cruz, que mesmo a orientar outros colegas, sempre arranhou um tempinho para me ouvir, bem como a sua ajuda na correcção do texto.

À Dr.^a Olívia Pina, agradeço as boas vibrações e as palavras de incentivo.

À minha colega Joana Barbosa, pela colaboração preciosa na tradução de alguns textos.

A todos os colegas de trabalho, que de alguma forma e em algum momento expressaram o seu apoio, a sua amizade e compreensão.

A todos os meus amigos, que me proporcionaram momentos de alegria e descontração.

Aos meus pais pelo amor incondicional e por acreditarem que eu posso e consigo.

À minha irmã, por estar sempre perto, por ser companheira e amiga, pelas longas conversas e pela inesgotável paciência que teve comigo.

*A todos, **MUITO OBRIGADA.***

palavras-chave

β -lactamases de espectro alargado, β -lactâmicos, β -lactamases, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, teste VITEK[®] 2 ESBL, resistência antimicrobiana, prestação de cuidados de saúde

resumo

A resistência a antibióticos entre bacilos Gram negativo representa um importante problema no tratamento de infecções hospitalares e mais recentemente em infecções comunitárias.

A produção de β -lactamases de espectro alargado (ESBL) é o principal mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias da família *Enterobacteriaceae*, nomeadamente em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

A emergência da produção de ESBL como um importante mecanismo de resistência entre enterobactérias a nível mundial conduz à necessidade de conhecimento da epidemiologia local. Dados sobre a frequência de isolamento de produtores de ESBL, os respectivos perfis de susceptibilidade antimicrobiana e as características dos doentes auxiliam a uma melhor decisão terapêutica.

Assim torna-se fundamental que o diagnóstico *in vitro* seja efectuado com recurso a metodologias de alta especificidade e sensibilidade, adequadas à realidade hospitalar em que cada laboratório se insere.

Em Portugal existem dados sobre a caracterização de enzimas isoladas em estirpes resistentes mas os dados sobre a prevalência de ESBLs em isolados clínicos de enterobactérias em hospitais portugueses são escassos.

O principal objectivo deste estudo foi determinar a frequência de isolamento de espécies da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs numa unidade hospitalar da zona norte de Portugal, com base na utilização do teste VITEK[®]2 ESBL, bem como analisar a susceptibilidade aos antibióticos entre as estirpes produtoras e não produtoras de ESBLs.

Das 831 *Enterobacteriaceae* estudadas, 22.6% foram classificadas como produtoras de ESBL. Dos isolados produtores de ESBL, 9% eram *E. coli* e 13.6% eram *K. pneumoniae*. Urina e expectoração foram os produtos biológicos com maiores taxas de isolamento de produtores de ESBL (77.3% e 27.4% respectivamente). Na data da colheita, 51.9% dos indivíduos encontrava-se em regime de ambulatório (urgência e consulta externa) e 47.3% em regime de internamento.

As enterobactérias em estudo apresentaram altas taxas de resistência aos β -lactâmicos e aos aminoglicosídeos. *E. coli* foi particularmente resistente à ciprofloxacina e *K. pneumoniae* à nitrofurantoína e ao trimetoprim-sulfametoxazole. Os antibióticos que apresentaram melhor actividade contra os agentes etiológicos em estudos foram o imipenemo, a nitrofurantoína e a piperacilina-tazobactam para *E. coli* e imipenemo, tetraciclina e piperacilina-tazobactam para *K. pneumoniae*.

Este estudo permite dispor de dados importantes sobre a produção de ESBL em *Enterobacteriaceae* na área geográfica em estudo e disponibiliza informação sobre os seus padrões de resistências, necessários para se iniciar uma terapêutica empírica adequada e elaborar protocolos de tratamento.

keywords

Extended Spectrum β - lactamases, β -lactam, β -lactamases, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, VITEK® 2 ESBL test, antimicrobial resistance, provision of health care.

abstract

Antibiotic resistance among Gram negative bacilli is a major problem in nosocomial infections and more recently in community-acquired infections. The production of β -lactamases extended spectrum (ESBL) is the major mechanism of antibiotic resistance among the family *Enterobacteriaceae*, particularly *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. The emergence of ESBL production as an important mechanism of resistance among *Enterobacteriaceae* worldwide leads to the need for knowledge of local epidemiology. Data on the isolation frequency of ESBL producers, their antimicrobial susceptibility profiles and the characteristics of patients lead to better therapeutic decisions. So it becomes essential that the *in vitro* diagnostics is carried out using methods of high specificity and sensitivity that are adequate for the hospital laboratory where each is inserted. In Portugal, there is data on the characterization of enzymes isolated from strains highly resistant but data on the prevalence of ESBLs in clinical isolates of enterobacteria are scarce. The main objective of this study was to determine the frequency of isolation of *Enterobacteriaceae* ESBLs producers in a hospital in northern Portugal, based on the use of the VITEK ® 2 ESBL test and to analyze the susceptibility patterns to antibiotics among ESBL producers and not-producers. Of the 831 *Enterobacteriaceae* studied, 22.6% were classified as ESBL producers. Among ESBL producers, 9% were *E. coli* and 13.6% were *K. pneumoniae*. Urine and sputum were the organic products with higher rates of isolation of ESBL producers (77.3% and 27.4% respectively). At the time of harvest, 51.9% of subjects were on an outpatient (emergency and outpatient) and 47.3% in inpatient settings. The enterobacteria studied showed high rates of resistance to β -lactams and aminoglycosides. *E. coli* was particularly resistant to ciprofloxacin and *K. pneumoniae* to nitrofurantoin and trimethoprim-sulfamethoxazole. The antimicrobial agents that showed the foremost activity against the *E. coli* isolated in this study was the imipenem, nitrofurantoin and piperacillin-tazobactam. For *K. pneumoniae*, the most effective antibiotics were imipenem, piperacillin-tazobactam and tetracycline. This study analyses and makes important data about ESBL production among *Enterobacteriaceae* in the geographical area under study available. It also provides information on patterns of resistance of the ESBL producers needed to initiate empirical therapy and to develop treatment protocols to future use.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	X
SIGLAS E ABREVIATURAS	XI
INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações Gerais	3
1.1.1 Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde	3
1.1.2 Família <i>Enterobacteriaceae</i>	7
1.1.3 Resistência aos Antibióticos	9
1.1.4 Antibióticos β -lactâmicos	15
1.1.5 β -lactamases	19
1.2 β-lactamases de espectro alargado	24
1.2.1 Definição e Histórico	25
1.2.2 Classificação	27
1.2.2.1 β -lactamases TEM	28
1.2.2.2 β -lactamases SHV	29
1.2.2.3 β -lactamases CTX-M	30
1.2.2.4 β -lactamases OXA	31
1.2.2.5 Outros tipos de ESBL	32
1.3 Outros tipos de β-lactamases	33
1.3.1 β -lactamases resistentes aos Inibidores	33
1.3.2 β -lactamases não ESBLs	34
1.4 Epidemiologia das <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBL	35
1.5 Origem das ESBL: Hospital, Comunidade e Meio Ambiente	38
1.5.1 Factores de risco	38
1.5.2 Medidas de Controlo	39
1.5.3 Ambiente Hospitalar vs Comunidade vs Meio ambiente	40
1.6 Detecção Laboratorial de ESBLs	42
1.6.1 Significado clínico	46
1.6.2 Terapêutica	47
OBJECTIVOS	49
MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1 Local de recolha	50
3.2 Amostra	51
3.2.1 Identificação das espécies bacterianas	51
3.2.2 Avaliação da Susceptibilidade aos Antibióticos	52
3.2.3 Teste VITEK®2 ESBL	53
3.2.4 Controlo de Qualidade	54
3.3 Tratamento Estatístico	54
RESULTADOS	55
4.1 Caracterização da população em estudo	55
4.2 Caracterização dos isolados clínicos	57
4.3 Susceptibilidade aos antibióticos	60

DISCUSSÃO	68
CONCLUSÃO	77
PERSPECTIVAS FUTURAS	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXOS	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalência de IACS em países em desenvolvimento *	4
Figura 2. Prevalência de IACS em países desenvolvidos *	5
Figura 3. Propaganda à penicilina durante a Segunda guerra Mundial	9
Figura 4. Mecanismos gerais de aquisição de ADN exógeno por parte das células bacterianas	13
Figura 5. Diferentes mecanismos de resistência aos antibióticos presentes em bactérias Gram negativo.	15
Figura 6. Estrutura química das penicilinas e das cefalosporinas	16
Figura 7. Estrutura química dos β -lactâmicos	16
Figura 8. Constituição da parede celular das bactérias Gram negativo e Gram positivo, e respectiva localização das β -lactamases	17
Figura 9. Explosão de referências a ESBL	25
Figura 10. Distribuição mundial de <i>Escherichia coli</i> produtora de β -lactamase CTX-M-15*	37
Figura 11. Teste de adição de ácido clavulânico	43
Figura 12. Tira Etest® ESBL positiva	45
Figura 13. Placas agar com crescimento de <i>Enterobacteriaceae</i> e respectiva coloração de Gram	52
Figura 14. Processamento de Cartas VITEK®2	53
Figura 15. Distribuição dos 831 isolados em estudo por produto biológico	56
Figura 16. Incidência dos isolados de <i>Enterobacteriaceae</i> em termos globais	57
Figura 17. Incidência dos isolados no grupo dos produtores de ESBL	57
Figura 18. Distribuição dos isolados produtores de ESBL e não produtores em regime de internamento e ambulatório	58
Figura 19. Distribuição dos isolados produtores de ESBL nas várias especialidades de internamento	59
Figura 20. Número de microrganismos produtores de ESBL isolados por faixa etária e por género	59
Figura 21. Distribuição dos isolados produtores de ESBL por produto de isolamento	60
Figura 22. Comportamento dos isolados de <i>E. coli</i> frente aos antibióticos	61
Figura 23. Comportamento dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> frente aos vários antibióticos	63
Figura 24. Perfil de susceptibilidade dos isolados produtores de ESBL	65
Figura 25. Perfil de susceptibilidade dos isolados de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> não produtores de ESBL	65
Figura 26. Distribuição dos perfis de resistência das <i>Enterobacteriaceae</i> estudadas entre Janeiro de 2009 e Março de 2010	66

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. Características das β -lactamases segundo Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros	22
Tabela II. Proposta de classificação das β -lactamases segundo Giske et al.	23
Tabela III. Diferentes famílias e grupos de ESBL (tipo de ESBL e país de origem)	26
Tabela IV. Distribuição dos doentes estudados por faixa etária versus género	55
Tabela V. Distribuição dos microrganismos isolados em função do resultado do teste ESBL	58
Tabela VI. Padrão de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de <i>E. coli</i> produtores de ESBL e não produtores de ESBL	62
Tabela VII. Padrão de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtores de ESBL e não produtores de ESBL	64
Tabela VIII. Comparação entre padrão global de susceptibilidade e não-susceptibilidade das <i>Enterobacteriaceae</i> testadas para ESBL	67

SIGLAS E ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AES	<i>Advanced Expert System</i>
AST	<i>Antimicrobial Susceptibility Test</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C3G	Cefalosporinas de 3ª Geração
C4G	Cefalosporinas de 4ª Geração
CAZ	Ceftazidima
CCIH	Comissão de Controlo e Infecção Hospitalar
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CPD	Cefpodoxima
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
DGS	Direcção Geral de Saúde
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	<i>Extended Spectrum Beta lactamase</i>
ESBLpos	Isolados produtores de ESBL
FEP	Cefepima
FOX	Cefoxitina
IACS	Infecção Associada aos Cuidados de Saúde
IβL	Inibidor das β-lactamases
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
PBPs	<i>Penicilin Binding Proteins</i>
pi	Ponto Isoeléctrico
PNCI	Programa Nacional Controlo de Infecção
UCI (s)	Unidade (s) Cuidados Intensivos
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com sensibilidade diminuída à vancomicina
VRE	Enterococos resistentes à vancomicina
μg	Micrograma

INTRODUÇÃO

Infecções causadas por bactérias multiresistentes representam um desafio diário para os infecciólogistas, para os doentes e para todos aqueles que trabalham para combater a sua rápida disseminação global. Durante a última década, os esforços desenvolvidos para combater estes microrganismos, com as farmacêuticas a apostarem no fabrico de novos agentes antibióticos, focaram-se essencialmente nas bactérias Gram positivo. Lamentavelmente, o crescente problema da multiresistência em bactérias Gram negativo não foi acompanhado com o surgimento de novos antibióticos (Souli *et al.*, 2008). Como resultado, surgem cada vez em maior número relatórios que documentam infecções por microrganismos Gram negativo para os quais não existem opções terapêuticas adequadas (Augusti *et al.*, 2007; Pitout e Laupland, 2008).

A resistência a antibióticos entre espécies da família *Enterobacteriaceae* representa um importante problema em infecções hospitalares (Augusti *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2009; Coque *et al.*, 2008; Falagas e Karageorgopoulos, 2009), assim como em infecções da comunidade (Oteo *et al.*, 2006; Mendonça *et al.*, 2007).

Escherichia coli e *Klebsiella* spp. são as enterobactérias mais frequentemente relacionadas com infecções associadas aos cuidados de saúde (Rodríguez-Baño *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2009).

Os antibióticos β -lactâmicos, grupo constituído por penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos, estão entre os mais frequentemente prescritos em todo o mundo (Pitout *et al.*, 2005). Um dos mecanismos mais importantes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos é a produção de β -lactamases, enzimas bacterianas capazes de

hidrolisar o anel β -lactâmico presente nestes antibióticos, tornando-os inactivos (Wilke *et al.*, 2005; Sousa, 2006; Babic *et al.*, 2006).

A pressão selectiva exercida pelo uso contínuo de antibióticos, particularmente compostos β -lactâmicos como as cefalosporinas de 3ª geração (p.ex: cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona) e monobactâmicos (aztreonamo), constitui um factor de risco para a selecção de espécies resistentes, incluindo enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro alargado (*Extended Spectrum Beta Lactamase, ESBL*) (Sánchez *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2007; Pitout e Laupland 2008; Kobayashi *et al.*, 2009). Segundo vários autores, a diversidade de *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases é distinta nas diversas áreas geográficas estudadas (Mendonça *et al.*, 2007; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008; Coque *et al.*, 2008), apresentando diferentes padrões de sensibilidade aos antibióticos (Hanberg *et al.*, 1999; Kahlmeter, 2003; Souli *et al.*, 2008) e taxas de prevalência diferentes.

Em Portugal, apesar da problemática das ESBLs não ser claramente conhecida, são vários os relatórios que têm surgido nos últimos anos. Mendonça e colegas em 2004 relataram pela primeira vez uma *Escherichia coli* que expressava uma β -lactamase tipo CTX-M-15. Foram caracterizadas duas estirpes provenientes de dois hospitais portugueses com uma distância de 400 km entre eles. Foram também detectados os genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-30} e *bla*_{CTX-M-15} nos 2 isolados. A caracterização molecular destas estirpes permitiu evidenciar a sua relação filogenética, bem como demonstrar a expressão de genes codificantes para diferentes β -lactamases no mesmo isolado (Mendonça *et al.*, 2006). Em 2004 foi identificada nos Hospitais da Universidade de Coimbra a primeira estirpe de *E. coli* produtora de CTX-M-15 (Simões *et al.*, 2006).

Num estudo mais alargado sobre a difusão de β -lactamases entre isolados clínicos de *E. coli* provenientes de hospitais portugueses de três zonas geográficas distintas, realizado entre Março de 2004 e Março de 2006 os autores obtiveram os seguintes dados: 92% dos isolados expressavam uma β -lactamases CTX-M-15 e foram isolados de amostras de urina de doentes de ambos os géneros com idade ≥ 60 anos; uma *E. coli* expressava o gene *bla*_{CTX-M-32} (identificado pela primeira vez no nosso país); 9 isolados expressavam o gene *bla*_{CTX-M-14}; o elemento genético móvel *ISEcp1* foi encontrado em todos os isolados; 90% apresentavam resistência a 11 dos 14 β -lactâmicos testados e 92% eram multiresistentes; imipenemo e meropenemo foram os únicos antibióticos efectivos contra 100% dos isolados estudados; 50% dos isolados eram de origem comunitária e 37% de origem hospitalar. Este estudo sugere a difusão deste clone entre várias zonas do país possivelmente por disseminação/transferência horizontal de elementos móveis entre hospitais e comunidade (Mendonça *et al.*, 2007).

Consequentemente são de extrema importância os estudos locais, de modo a conhecer melhor as resistências dos microrganismos em questão e a realidade de cada instituição de modo a otimizar recursos e a estabelecer protocolos de tratamento mais adequados.

1.1 Considerações Gerais

1.1.1 Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Infecção Associada aos Cuidados de Saúde (IACS) é uma infecção adquirida pelos doentes em consequência dos cuidados e procedimentos de saúde prestados (cuidados agudos, reabilitação ou domiciliários), e que pode também afectar os profissionais de saúde durante o exercício da sua actividade (PNCI, 2007). O conceito de IACS é abrangente, na medida em que se refere a todas as unidades prestadoras de cuidados de saúde.

A Organização Mundial de Saúde, através da *World Alliance for Patient Safety*, estabeleceu como desafio para 2005/2006 a redução do problema da infecção associada aos cuidados de saúde, tendo como mensagem principal *Clean Care is Safer Care* (PNCI, 2007). A OMS reconhece que a IACS dificulta o tratamento de doentes em todo o mundo contribuindo para o aumento das taxas de morbilidade e mortalidade, bem como para o consumo acrescido de recursos, ao nível hospitalar e comunitário. Altas taxas de IACS levam também ao aumento do tempo de internamento com a utilização concomitante de antibióticos favorecendo a selecção de microrganismos resistentes.

O programa *First Global Patient Safety Challenge* da OMS apresenta dados globais preocupantes relativos ao estado das IACS. Nos países em desenvolvimento, 5% a 19% dos pacientes internados adquirem uma IACS (Figura 1) (WHO, 2009), 4% a 56% de todas as causas de morte no período neonatal são devidas a IACS e as infecções do local cirúrgico são o tipo de infecção mais frequente e apresentam taxas entre 1% e 25% em cada 100 procedimentos cirúrgicos (WHO, 2009).

Nos países desenvolvidos e de acordo com estudos realizados entre 1995 e 2008, 5% a 12% dos pacientes internados adquiriram pelo menos uma IACS (Figura 2) e em Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) a taxa de pacientes infectados pode chegar aos 51%, notando-se uma diminuição na infecção do local cirúrgico que ronda os 2-3% (WHO, 2009).

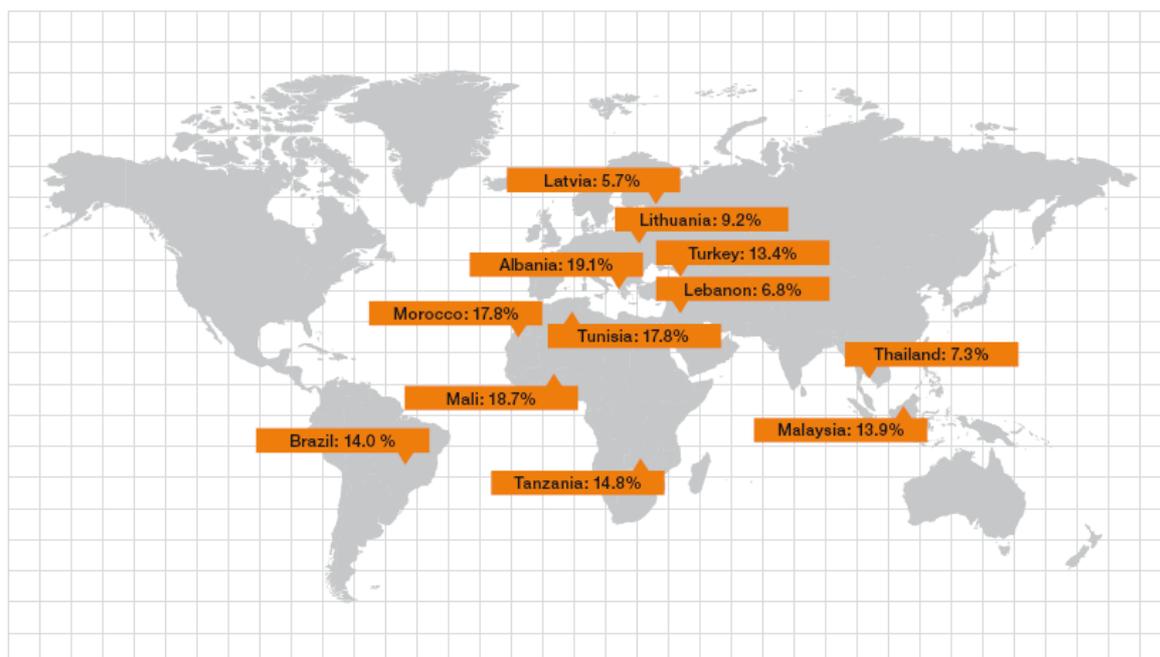


Figura 1. Prevalência de IACS em países em desenvolvimento *

* Estudo realizado pela WHO, 1995-2008

Fonte: WHO 2009 (http://www.who.int/gpsc/country_work/summary_20100430_en.pdf)

Em Portugal, segundo o inquérito nacional de prevalência de 2003, envolvendo 67 hospitais e 1673 doentes, identificou-se uma prevalência de 8,4% de doentes com IACS e uma prevalência de 22,7% de doentes com infecção adquirida na comunidade (PNCI, 2007). Em 2009, um novo inquérito de prevalência foi realizado com a participação de 114 hospitais, o que corresponde a 80% dos hospitais públicos e 34% dos hospitais privados. Obteve-se uma prevalência de 9,8% de doentes com infecções associadas aos cuidados de saúde e uma taxa de 20,3% de doentes com infecções adquiridas na comunidade (Costa *et al.*, 2009). É especialmente relevante a taxa de infecção comunitária (52.2%) em doentes provenientes de unidades de cuidados continuados (Costa *et al.*, 2009).

A circulação de doentes entre unidades de saúde e o uso indiscriminado de antibióticos a nível hospitalar e na comunidade assumem uma importância cada vez maior na transmissão inter-institucional de microrganismos multiresistentes e no aumento de resistência aos antibióticos, favorecendo o aumento das IACS (PORTUGAL, 2007).

A infecção hospitalar em Portugal foi abordada pela primeira vez em 1930 pela Direcção-Geral da Saúde (DGS) e posteriormente em 1979 pela Direcção-Geral dos Hospitais através da Circular Informativa N.º6/79 de 9/2/79. Em 1986, a Direcção-Geral dos Hospitais, através da Circular Informativa N.º 8/86 de 25/3, recomenda o controlo da infecção a todas as unidades de saúde.

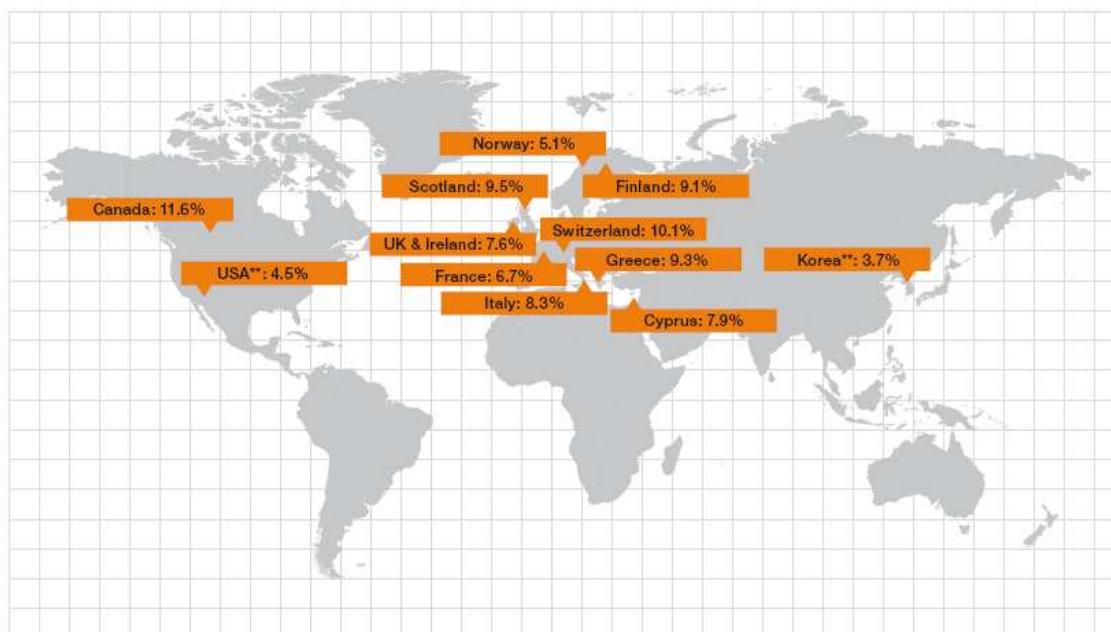


Figura 2. Prevalência de IACS em países desenvolvidos *

* Estudo realizado pela WHO, 1995-2008

** Incidência; Fonte: WHO 2009 (http://www.who.int/gpsc/country_work/summary_20100430_en.pdf)

Em 1993 mais um passo importante no controlo da infecção foi dado através da publicação da Circular Normativa N.º 4/93 de 10 de Fevereiro, que preconizava a necessidade de institucionalizar comissões de controlo de infecção nos hospitais.

A criação de Comissões de Controlo da Infecção (CCI) nas unidades de saúde públicas ou privadas, integradas na rede nacional de prestação de cuidados de saúde, foi divulgada através do Despacho do Director-Geral da Saúde de 23/10/96.

Em 1999, foi criado por Despacho do Director-Geral da saúde de 14 de Maio o Programa Nacional de Controlo da Infecção (PNCI), divulgado pela Circular Informativa da DGS N.º20/GAB/DG de 30/7/99, ficando sob a alçada do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). A 10 de Outubro de 2006 o PNCI foi transferido do INSA para a Direcção-Geral da Saúde, situação que se mantém actualmente (PNCI, 2007). O PNCI tem como missão dar a conhecer a realidade nacional e reunir esforços para que a diminuição da IACS seja promovida a longo prazo em Portugal, contribuindo assim para a segurança do doente (PORTUGAL, 2007; Costa *et al.*, 2009).

A Comissão de Controlo de Infecção Hospitalar (CCIH) com base em informações clínicas, microbiológicas e epidemiológicas, tais como microrganismos prevalentes, mecanismos de resistência, distribuição pelos sectores do hospital e principais antibióticos prescritos, pode adoptar medidas para minimizar as infecções associadas aos cuidados de saúde e a disseminação de estirpes resistentes. Algumas dessas medidas têm sido citadas pela literatura,

como a restrição do uso de antibióticos de espectro alargado, cuidados especiais com as barreiras de protecção utilizadas pelos profissionais de saúde, cuidados na manipulação de equipamentos invasivos, lavagem correcta das mãos e vigilância clínica e epidemiológica de doentes admitidos em UCI (Friedman *et al.*, 2002; Paterson e Bonomo 2005; Tragante *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2009).

Segundo dados do PNCI de 2007, 68% dos hospitais possuem um sistema de vigilância de infecção hospitalar mas apenas 38% têm protocolo de utilização de antibióticos e apenas 59% consegue que os planos da CCIH sejam aprovados pelos respectivos Conselhos de Administração.

A preocupação mundial com as taxas de infecção, com a resistência aos antibióticos, com o controlo da proliferação de espécies resistentes e a necessidade de conhecer a evolução e mudança das sensibilidades dos microrganismos, levou ao surgimento de vários programas de controlo epidemiológico nacionais e internacionais desde a década de 90, entre os quais se destacam: SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program*, desde 1997; MYSTIC *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*, desde 1997; EARSS *European Antimicrobial Resistance Surveillance System*, desde 1998; ICARE *Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology*, projecto conjunto da Emory University e do *Center for Diseases Control (CDC)*, desde 1995; NNISS *National Nosocomial Infections Surveillance*, do CDC desde 1992; ECO.SENS *Project International Survey of the Antimicrobial Susceptibility of Urinary Pathogens*, entre 1999 e 2000; HELICS *Hospitals in Europe Link for Infection Control Surveillance*, desde 2002; GEIH-BLEE *Grupo para el Estudio de las Infecciones Hospitalarias por BetaLactamasas de Espectro Extendido*, desde 2000 (Espanha) e o SMART *Study Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*, desde 2002, realizado pela Merck & Co., Inc. (Hanberger *et al.*, 1999; Bradford, 2001; Sader *et al.*, 2001; Kahlmeter, 2003; Hageman *et al.*, 2003; Nijssen *et al.*, 2004; Hernández Bello *et al.*, 2004; Denton, 2007; Hoban *et al.*, 2010).

As bactérias produtoras de β -lactamases de espectro alargado (ESBL) são segundo os dados apresentados pelos programas citados, as que apresentam uma maior responsabilidade na disseminação mundial de resistência em ambientes hospitalares, demonstrando igualmente uma rápida evolução e uma grande capacidade de proliferação mundial (Hanberg *et al.*, 1999; Endimiani e Bonomo, 2008). Factores como o aumento da permanência hospitalar, a inserção de cateteres ou algaliação, execução de procedimentos invasivos ou intervenções cirúrgicas, a administração de terapia de substituição renal ou de suporte ventilatório mecânico têm sido associados ao isolamento de organismos produtores de ESBL em pacientes hospitalizados (Pitout *et al.*, 2005; Falagas e Karageorgopoulos, 2009). Em unidades de cuidados neonatais, factores como prematuridade e baixo peso à nascença, presença de cateter venoso central,

utilização de nutrição parental e de antibióticos de espectro alargado também estão incluídos (Tragante *et al.*, 2008; Paterson e Bonomo, 2005; Arnoni *et al.*, 2007).

As CCIH devem implementar nas instituições medidas específicas de controlo e prevenção para *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL. O foco deve ser orientado na prevenção da transmissão paciente-paciente de microrganismos produtores de ESBL, evitando a colonização do meio ambiente, das mãos do pessoal de saúde e do equipamento médico (Castro *et al.*, 2009).

1.1.2 Família *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por mais de 30 géneros e 130 espécies. Os géneros mais frequentemente isolados de amostras biológicas são *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, *Providencia* e *Yersinia* (Spanu *et al.*, 2002).

Estes microrganismos caracterizam-se por possuírem uma parede celular do tipo Gram negativo, serem aeróbios ou anaeróbios facultativos, móveis ou imóveis e não formadores de esporos. Geralmente são catalase positiva e oxidase negativa. Bioquimicamente caracterizam-se pela capacidade de reduzir nitratos a nitritos e fermentar a glicose com produção de ácido e/ou gás (INSA, 2004).

São bactérias pouco exigentes encontrando-se amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas na água, solo, plantas e na flora intestinal normal de vários animais, incluindo o Homem. Podem ser encontradas na pele, na orofaringe e nas vias respiratórias superiores de indivíduos hospitalizados. Estão frequentemente associadas a infecções oportunistas em doentes com as defesas naturais comprometidas (Branger *et al.*, 2005; EARSS, 2009).

Possuem diversos factores de virulência e são frequentemente agentes etiológicos de processos infecciosos (quer ao nível hospitalar quer comunitário) tais como: infecções do tracto urinário (ITU), infecção de ferida cirúrgica, infecções respiratórias e infecções da corrente sanguínea. Também podem estar implicados como agentes etiológicos em abscessos abdominais e peritonites.

Espécies da família *Enterobacteriaceae* são responsáveis por cerca de 50% das septicemias, 70% a 90% das ITUs (hospitalares e comunitárias) e uma significativa percentagem das infecções intestinais (Almeida *et al.*, 2007; Correia *et al.*, 2007).

A *Escherichia coli* é o agente mais comum nas infecções urinárias, no entanto a posse de fímbrias e adesinas actua como factor de virulência (infecção e/ou colonização) e relaciona-a também com infecções de feridas, infecções intestinais, pneumonias em doentes imunocomprometidos, septicemias (Resende da Silva *et al.*, 2009) e meningite neonatal (Desimoni *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2007).

Outros géneros, como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* e *Serratia*, que podem ser encontrados como habitantes normais do intestino grosso, incluem bactérias que são essencialmente oportunistas e normalmente nosocomiais. Isolados de *Klebsiella pneumoniae* são com frequência responsáveis por infecções do tracto urinário, pneumopatias e septicemias nosocomiais (Pujol e Peña, 2003).

Enterobacter aerogenes e *Enterobacter cloacae* são frequentemente isolados em amostras clínicas, estando associados a infecções oportunistas que afectam o tracto urinário, as vias respiratórias e também a corrente sanguínea. A mortalidade em doentes com septicemia por *K. pneumoniae* e *E. cloacae* é duas vezes superior à de doentes com septicemia por Gram positivo (Tragante *et al.*, 2008).

Espécies da família *Enterobacteriaceae* são isoladas com muita frequência em todos os tipos de amostras clínicas. Dados de vários estudos indicam que o isolamento de *E. coli* em hemoculturas varia entre o primeiro e o segundo lugar (34.4% e 18.8% respectivamente) (Pfaller *et al.*, 1998; Decousser *et al.*, 2003) e *Klebsiella* spp. ocupa o quinto lugar em isolamentos (7.2%) (Pfaller *et al.*, 1998). As infecções urinárias têm como agente etiológico mais comum a *E. coli* (68.4%), seguido pelo género *Klebsiella* (7.9%) e em quarto lugar, por *Proteus mirabilis* (5.2%) (Correia *et al.*, 2007). Em infecções da pele e tecidos moles a *E. coli* é o quarto microrganismo mais isolado (7.0%), seguido por *Enterobacter* spp. (5.8%) e *Klebsiella* (5.1%) (Rennie *et al.*, 2003).

Realizado entre 2002 e 2007, o estudo SMART isolou de infecções intra-abdominais, *E. coli* (11%), *E. cloacae* (3.3%), *K. pneumoniae* (3.2%), *Citrobacter freundii* (1.2%) e *E. aerogenes* (0.9%) (Hoban *et al.*, 2010).

Dados do Relatório Nacional de Prevalência de Infecção de 2009 em Portugal, mostram a *E. coli* como principal agente etiológico de infecções nosocomiais (IN) (14.5%) e de infecções comunitárias (IC) (24.1%). A *K. pneumoniae* está mais associada a IN (7.9%) do que a IC (6.1%). O *P. mirabilis* está presente em 4.2% das IN e apenas em 2.6% das IC (Costa *et al.*, 2009).

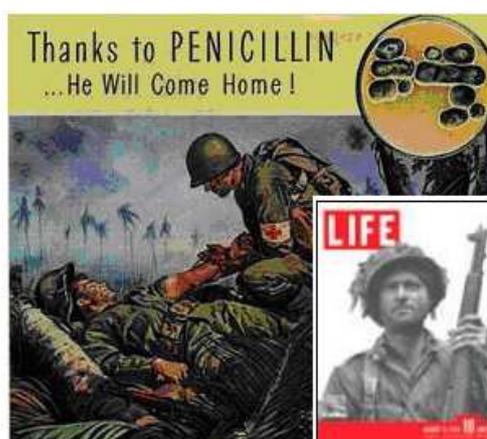
O Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (ECDC) (www.ecdc.europa.eu) publicou em 2009 um estudo epidemiológico que coloca a *E. coli* e os géneros *Klebsiella* e *Proteus* no lote dos 15 microrganismos mais isolados em pneumonias adquiridas em UCIs e em infecções da corrente sanguínea.

O uso excessivo, e muitas vezes indiscriminado de diversos antibióticos no tratamento destas infecções, leva ao aparecimento de determinado tipo de resistências. Actualmente, a resistência elevada destes microrganismos, através de diversos mecanismos, é responsável, principalmente a nível hospitalar, pela falência das opções terapêuticas, ocasionando o insucesso da terapêutica empírica, o prolongamento dos internamentos e o aumento dos custos hospitalares e sociais (Souli *et al.*, 2008; Coque *et al.*, 2008).

1.1.3 Resistência aos Antibióticos

A descoberta dos antibióticos e a sua utilização em terapia anti-infecciosa constituiu um progresso inquestionável da medicina do século XX. No entanto, a eficácia destes agentes foi rapidamente superada pela capacidade que as bactérias possuem de se oporem à sua acção (Santos, 2004; INSA, 2010).

Em 1928 Fleming¹ descobriu o primeiro antibiótico natural, a penicilina. Foi isolado a partir de culturas de fungos do género *Penicillium* e posteriormente, em finais dos anos 30, produzido em larga escala por Chain & Florey². Durante a Segunda Guerra Mundial a eficácia da penicilina no combate às infecções bacterianas foi colocada à prova, permitindo salvar muitas vidas (Figura 3). A partir desse momento numerosos antibióticos foram isolados de seres vivos e produzidos em larga escala (Sousa, 2006).



anúncio na revista LIFE de 14 de Agosto de 1944

Figura 3. Propaganda à penicilina durante a Segunda guerra Mundial

Fonte: www.comciencia.br/reportagens/guerra/liliane_popup.htm (acesso 15/07/2010)

¹ Sir Alexander Fleming (1881-1955) _ Prémio Nobel da Fisiologia e Medicina em 1945, pela descoberta da penicilina

² Ernst Chain (1906-1979) & Sir Howard Florey (1898-1968) _ Prémio Nobel da Fisiologia e Medicina em 1945, pela descoberta da penicilina

A utilização dos antibióticos, em conjunto com melhorias nas áreas sanitárias, nutrição e habitação, em paralelo com o desenvolvimento dos programas de vacinação, levou a uma diminuição dramática das doenças anteriormente prevalentes que dizimaram populações, como a peste e a poliomielite (Machado Sequeira, 2004).

A resistência aos antibióticos desenvolve-se como consequência natural da adaptabilidade da população bacteriana a modificações ambientais. O uso intensivo de antibióticos na medicina, na produção de alimentos para animais e na agricultura tem contribuído para um aumento mundial de resistências a estes compostos (Santos, 2004; Machado Sequeira, 2004).

A aquisição e transferência de genes de resistência aos antibióticos, associados à selecção exercida pelo uso intensivo destas substâncias, explicam a situação alarmante em medicina humana à escala mundial. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) ou com sensibilidade diminuída à vancomicina (VISA), enterococos resistentes à vancomicina (VRE), estirpes multirresistentes de pneumococos, meningococos com susceptibilidade diminuída à penicilina e bactérias de Gram negativo produtoras de ESBL, são alguns dos exemplos de bactérias resistentes que colocam diariamente desafios às equipas de controlo de infecção (INSA, 2010; Alanis, 2005).

Os reservatórios de genes de resistência são as populações bacterianas submetidas à pressão de selecção exercida pelos antibióticos. Estão portanto presentes onde existem estes agentes antimicrobianos, quer de forma natural (presença dos microrganismos produtores de antibiótico), quer devido à sua utilização pelo homem, podendo encontrar-se em três compartimentos (Machado Sequeira, 2004; Mesa *et al.*, 2006; Carattoli, 2008): O Meio Ambiente (solo e águas - influenciado ou não pela presença do homem ou animais), O Homem (particularmente em meio hospitalar, mas ultimamente com aumento da importância no meio comunitário, como reservatório de bactérias comensais) e Outros Animais (nos quais os antibióticos são utilizados com fim terapêutico mas também como profilaxia e como promotores de crescimento, além de serem também reservatórios de bactérias comensais).

A importância destes compartimentos como reservatórios de genes de resistência foi enfatizada por Mesa *et al.*, em 2004, numa pesquisa sobre a presença de enterobactérias produtoras de ESBL em diferentes ambientes: amostras fecais de pacientes com infecção indeterminada, amostras fecais de pacientes com infecção de origem alimentar, alimentos crus e processados, instalações pecuárias e esgotos humanos. Prevalências de 100% e 80% foram encontradas para a presença de ESBL em amostras de esgoto e pocilgas respectivamente, sugerindo que a comunidade funciona como reservatório para estas estirpes. Este estudo também reportou pela primeira vez uma *K. pneumoniae* produtora de ESBL em alimentos,

mostrando que estes também podem contribuir para a disseminação na comunidade de *Enterobacteriaceae* resistentes.

Em 1887, cientistas descobriram a capacidade de adaptação dos microrganismos e a sua resistência a modificações ambientais e a agentes anti-sépticos (Machado Sequeira, 2004). Em meados de 1940, 2 anos após a introdução da penicilina no mercado, os cientistas observaram a emergência de uma estirpe de *S. aureus* resistente à penicilina (Sousa *et al.*, 1998). Ernst Chain foi o primeiro a descrever a penicilinase, enzima produzida pelas bactérias para destruir a penicilina (Sousa, 2006).

O problema da resistência do *S. aureus* à meticilina foi descrito pela primeira vez nos anos 60, tornando-se prevalente desde 1980. São endémicos em alguns países e mesmo epidémicos noutros. Em Portugal, mais de 50% dos *S. aureus* isolados são MRSA (EARSS, 2009).

Durante os anos de 1960 e 1980, as bactérias Gram negativo emergiram como importantes agentes causadores de infecção hospitalar (Santos, 2004; Rice, 2009).

O aumento da resistência antimicrobiana de bactérias patogénicas observado nos últimos 20-30 anos é considerado um dos maiores problemas da medicina humana. Alguns aspectos desta situação são especialmente preocupantes. Há mecanismos de resistência que eliminam o uso da última opção terapêutica para o tratamento de vários tipos de infecção. Alguns destes mecanismos possuem um espectro de acção alargado, o que compromete todas ou a maioria das drogas pertencentes a um dado grupo terapêutico (Alanis, 2005; Tragante *et al.*, 2008; Rice, 2009).

Dados de pacientes admitidos em UCIs da Europa mostram que 37% das bactérias que causam infecções hospitalares com mais frequência são resistentes ao antibiótico de escolha para o tratamento (Hanberger *et al.*, 1999).

Um estudo internacional realizado com o objectivo de avaliar a etiologia das infecções urinárias adquiridas na comunidade mostrou a *E. coli* como o agente etiológico mais predominante (53.3%) apresentando resistências na ordem dos 40% à ampicilina e ao sulfametoxazol e 20% ao trimetoprim, indicando que é tempo de reconsiderar seriamente o uso empírico destes antibióticos em alguns países (Kahlmeter, 2003).

Todos os organismos vivos possuem mecanismos de adaptação às mudanças do meio ambiente a fim de garantir a sua sobrevivência. Parte deste processo inclui ajustes de alimentação, água, oxigénio e também a presença de agentes potencialmente perigosos ou mesmo letais. Por isso, não nos deveria surpreender que as bactérias apresentem uma notável capacidade de suportar grandes alterações do meio circundante, fazendo uso de mecanismos de defesa natural, sofrendo mutações que originam a sua resistência ou adquirindo genes de

resistência de outras células aos agentes antigos e aos novos antibióticos (Alanis, 2005; Machado Sequeira, 2004).

A resistência bacteriana aos antibióticos ocorre devido a características codificadas geneticamente, podendo ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é resultante da genética, estrutura e fisiologia normal do microrganismo, por exemplo o microrganismo pode não possuir o alvo apropriado para o antibiótico ou possuir barreiras que impedem a ligação do antibiótico ao alvo. Ocorre em grupos específicos e o seu conhecimento é útil na escolha dos antibióticos a serem incluídos nos testes de sensibilidade de cada microrganismo. A resistência adquirida reflecte uma verdadeira modificação na informação genética de um microrganismo, que faz com que um antibiótico antes eficaz deixe de ser activo (Machado Sequeira, 2004; Alanis, 2005). Ao contrário da resistência intrínseca ocorre apenas em algumas estirpes de uma espécie de microrganismos.

McGowan e Tenover resumiram as vias através das quais a resistência pode ser introduzida, seleccionada, mantida e disseminada em Instituições de Saúde, descrevendo seis mecanismos básicos (Machado Sequeira, 2004):

- Introdução de alguns microrganismos resistentes numa população “naive” (por transferência de outro sistema de saúde, mas também da comunidade);
- Aquisição de resistência em estirpes anteriormente susceptíveis, por mutação genética, particularmente em reservatórios com alta concentração de microrganismos (ex: abscessos);
- Aquisição de resistência através de transferência de material genético;
- Emergência de resistência induzida, presente em algumas estirpes da população bacteriana (geralmente por selecção directa através da prescrição antibiótica);
- Selecção de uma subpopulação resistente de microrganismos;
- Disseminação local de microrganismos com resistência adquirida (devido a procedimentos ineficazes de controlo da infecção).

A estratégia de resistência bacteriana pode ser codificada por um ou mais genes, que podem estar presentes nos genomas de estirpes relacionadas ou pertencendo a géneros diferentes. Essa mesma resistência poderá disseminar-se para várias bactérias clinicamente significativas e/ou uma única estirpe pode adquirir resistência múltipla.

Os genes de resistência bacteriana aparecem muitas vezes associados a elementos móveis, como os plasmídeos (elementos extracromossomais, geralmente circulares, com capacidade para replicarem independentemente do cromossoma bacteriano e muitos deles com capacidade para conjugarem e transferirem uma cópia para uma célula hospedeira), os

transposões (sequências de ADN que se podem mover dentro do genoma e alguns dos quais com capacidade de se conjugarem), os integrões (elementos do ADN que adquirem e mobilizam genes contidos em cassetes, garantindo a sua correcta expressão) e os bacteriófagos (vírus que infectam células bacterianas) (Alanis, 2005; Caratolli, 2009).

A forma mais comum de adquirir resistência aos antibióticos é através da aquisição de ADN exógeno, a que se chama transferência horizontal de genes. Os mecanismos são (Sousa *et al.*, 1998; Alanis, 2005) (Figura 4):

- ▶ Transformação, em que bactéria adquire ADN do meio-ambiente;
- ▶ Transdução, processo mediado por bacteriófagos que ao recombinar o seu material genético com o ADN bacteriano, adquirem genes de resistência bacterianos, transportando-os no seu genoma e transferindo-os para outras bactérias quando as infectam;
- ▶ Conjugação, transferência de plasmídeos ou outros elementos conjugativos entre células de estirpes ou espécies bacterianas diferentes.

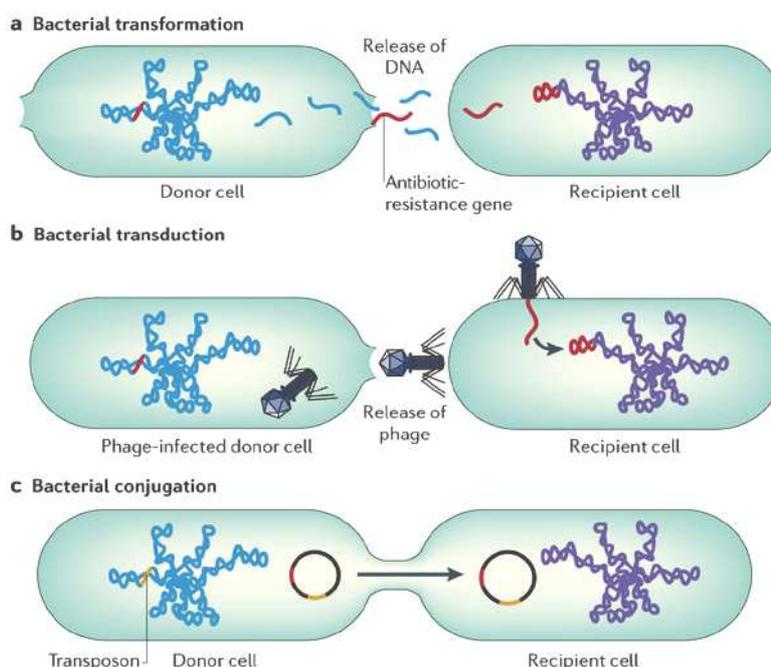


Figura 4. Mecanismos gerais de aquisição de ADN exógeno por parte das células bacterianas

Fonte: Furuya e Lowy, 2006

Os plasmídeos podem integrar outros elementos móveis como integrões e/ou transposões contendo genes de resistência. Estes elementos ocorrem também no cromossoma. Com estes elementos é possível que genes contidos em plasmídeos possam ser transferidos para o cromossoma e definitivamente integrados no ADN cromossómico bacteriano, e vice-

versa, além de terem a capacidade de integrar novos genes de resistência. A mobilidade genética é um assunto complexo mas deveras interessante para se compreender como ocorre a selecção de diversos genes. Estes elementos genéticos móveis contêm normalmente genes que codificam a resistência a diversos grupos de antibióticos. Este facto pode significar que a restrição do uso de um dado antibiótico nem sempre leva à erradicação da estirpe resistente, se no mesmo elemento móvel existirem outros genes de resistência a outras classes de antibióticos (Perci, 1994; Carattoli, 2009).

A resistência aos antibióticos, que estava confinada primariamente aos hospitais, tem vindo a assumir uma cada vez maior prevalência na prática comunitária, tornando as decisões terapêuticas mais complexas (Machado Sequeira, 2004; Sousa, 2006).

São múltiplos os mecanismos de resistência através dos quais a célula bacteriana pode impedir a acção dos antibióticos. Na Figura 5 estão esquematizados alguns desses mecanismos (Wilke *et al.*, 2005; Sousa, 2006):

- ▶ Perda de Porinas_ proteínas localizadas na membrana externa responsáveis pelo transporte de substâncias para o interior da célula (p. ex: uma forma de resistência aos carbapenemos é a perda ou expressão deficiente da porina específica OprD2, impossibilitando a entrada do antibiótico na célula);
- ▶ Presença de β -lactamases_ proteínas com actividade enzimática e capacidade de inactivar ligações químicas dos compostos β -lactâmicos. Nas bactérias Gram negativo encontram-se no espaço periplasmático e inactivam o antibiótico antes de este atingir a membrana citoplasmática;
- ▶ Expressão de bombas de efluxo_ proteínas de transporte responsáveis pela expulsão de substratos tóxicos do interior da célula para o exterior. Estão presentes em Gram positivo e Gram negativo. Podem ser específicas de um determinado antibiótico ou transportarem compostos estruturalmente diferentes;
- ▶ Modificação/Inactivação do antibiótico_ a presença de enzimas que modificam a estrutura química do antibiótico evitando a sua ligação ao local de acção.
- ▶ Alteração do local alvo_ alterações no local de acção que impedem a ligação e/ou o seu reconhecimento pelo antibiótico (p.ex: alterações nas enzimas ADN-girase e topoisomerase IV impedem a acção das quinolonas);
- ▶ Mecanismos de desvio metabólico_ as sulfonamidas inibem a actividade de algumas enzimas importantes para o crescimento celular, como a dihidropteroato sintetase (DHPS), enzima essencial na síntese do ácido fólico necessário na divisão celular. No entanto a mudança da enzima pode alterar o percurso do antibiótico dentro da célula, tornando-a resistente.

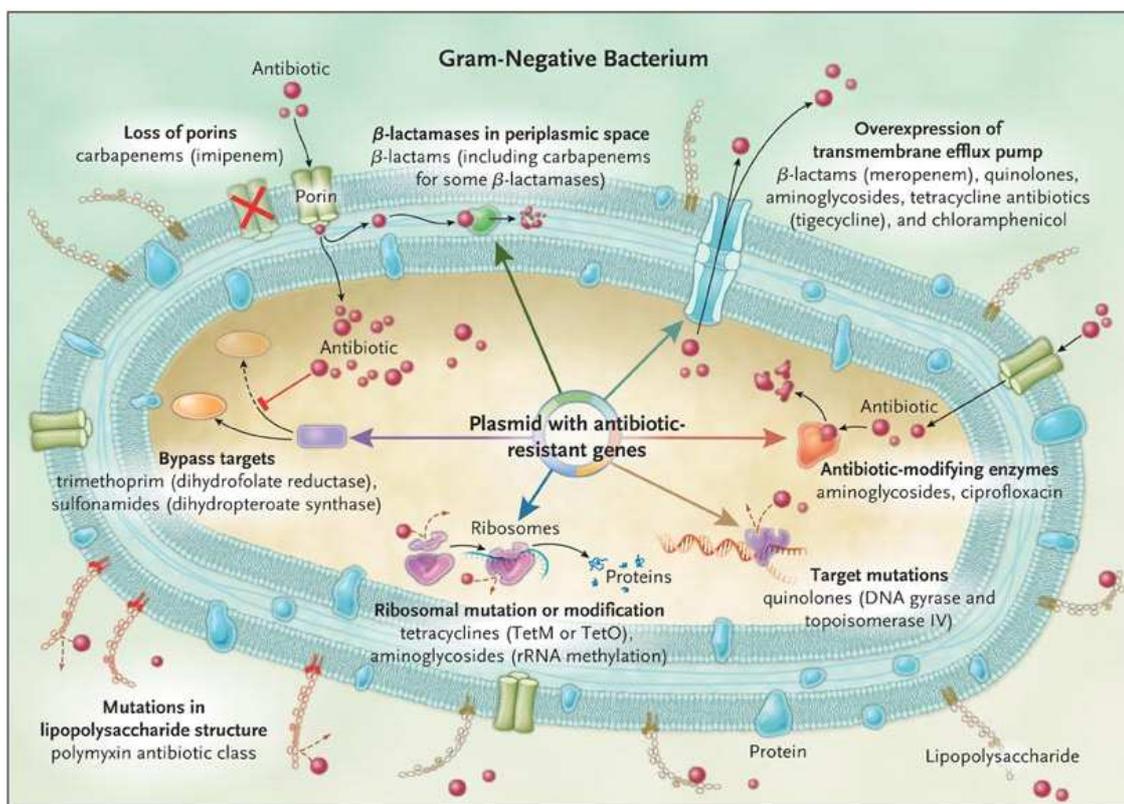


Figura 5. Diferentes mecanismos de resistência aos antibióticos presentes em bactérias Gram negativo.

As esferas vermelhas representam antibióticos; De salientar a presença de plasmídeos contendo os genes de resistência. Alguns destes mecanismos podem estar activos ao mesmo tempo, dependendo da exposição aos antibióticos. Fonte: Peleg, AY et al., 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *The New England Journal of Medicine*, vol 362:1804-1813

1.1.4 Antibióticos β-lactâmicos

Os β-lactâmicos constituem a família mais numerosa de antibióticos e a mais utilizada na prática clínica. Trata-se de compostos de acção bactericida lenta, relativamente independente da concentração plasmática, que apresentam baixa toxicidade e possuem uma ampla margem terapêutica (Marín e Gudiol, 2003).

O grupo dos β-lactâmicos não é uma colecção de substâncias perfeitamente homogénea ao nível da sua química, farmacocinética ou indicação terapêutica, sendo no entanto um grupo que possui a característica comum de possuir um anel β-lactâmico constituído por três átomos de carbono e um de nitrogénio com radicais alteráveis. O anel β-lactâmico encontra-se fundido com um anel tiazolidina nas penicilinas ou com um anel dihidrotiazina nas cefalosporinas (Figura 6). Nos antibióticos monobactâmicos mantém-se apenas o anel β-lactâmico e nos

carbapenemos observa-se a presença de C em substituição de S no anel tiazolidina (Figura 7) (Sousa, 2006).

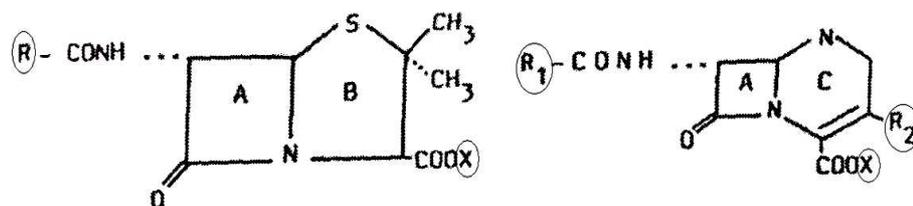


Figura 6. Estrutura química das penicilinas e das cefalosporinas

A – anel β -lactâmico; B – anel tiazolidina; C – anel dihidrotiazina

Fonte: Adaptado de Sousa, 2006

A presença de radicais diversos nas penicilinas (R) e nas cefalosporinas (R1 e R2), e a possibilidade de substituição de X no grupo carboxílico, quer por metais ou radicais orgânicos, pode atribuir ao composto particularidades e dinâmicas específicas, melhorando o seu espectro bacteriano (Figura 6). Os antibióticos β -lactâmicos agrupam cinco classes (Figura 7): penicilinas, cefalosporinas [de primeira geração (cefalotina), de segunda (cefotaxima), de terceira (ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona) e de quarta geração (cefepima)], monobactams (aztreonam), carbapenemos (imipenem e meropenem) e inibidores das β -lactamases (ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam).

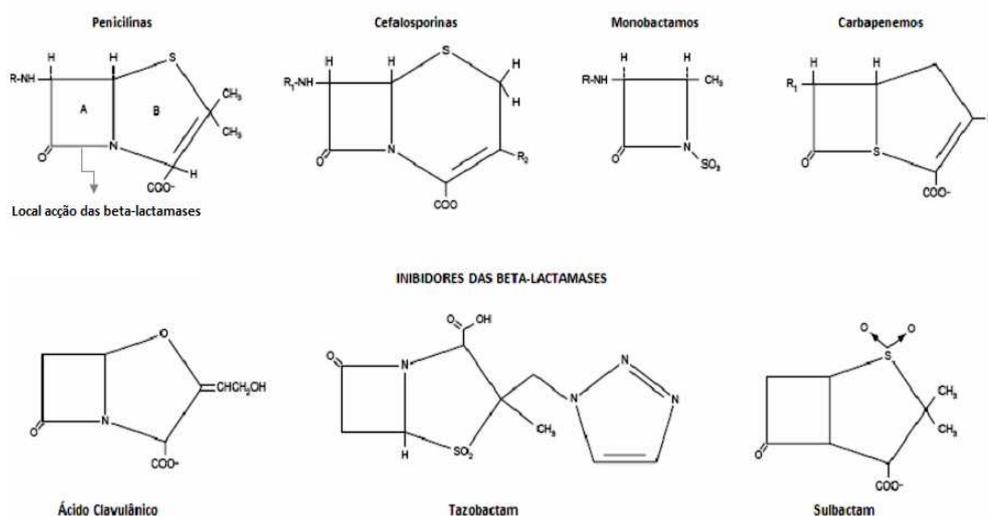


Figura 7. Estrutura química dos β -lactâmicos

Fonte: Adaptado de Marín e Gudiol, 2003

Estes antibióticos são conhecidos como antibióticos antiparietais, actuando na fase final da biosíntese do peptidoglicano (heteropolímero rígido e insolúvel na água, constituído por cadeias lineares de dois açúcares aminados: NAG (ácido n-acetilglucosamina) e NAM (ácido n-

acetilmurâmico), ligados entre si por ligações glicosídicas. As cadeias lineares ligam-se entre si através de cadeias de quatro aminoácidos). O peptidoglicano é um constituinte fundamental da parede celular das bactérias e essencial à sua sobrevivência. Os componentes do peptidoglicano são sintetizados no citoplasma e transportados através da membrana citoplasmática para o espaço que existe entre esta e a parede celular (espaço periplasmático). Neste nível existem proteínas com actividade enzimática (transpeptidases e carboxipeptidases), responsáveis pelo estabelecimento de pontes interpeptídicas entre cadeias vizinhas de peptidoglicano em crescimento, denominadas de *Penicilin Binding Proteins (PBPs)*. Os antibióticos ligam-se às PBPs e impedem a síntese do peptidoglicano (Marín e Gudiol, 2003; Sousa, 2006; Babic *et al.*, 2006; Gonçalves, 2008).

O espectro de acção dos β -lactâmicos inclui bactérias Gram positivo, Gram negativo e espiroquetas. Não são activos contra micoplasmas porque estes não apresentam parede celular, nem contra bactérias intracelulares (Babic *et al.*, 2006). Os antibióticos têm de atravessar a parede celular para acilar as PBPs. Os mecanismos de entrada são diferentes entre Gram negativo e Gram positivo (Figura 8).

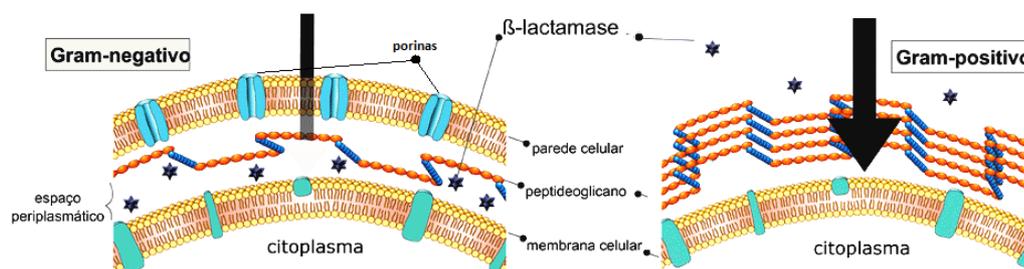


Figura 8. Constituição da parede celular das bactérias Gram negativo e Gram positivo, e respectiva localização das β -lactamases

Fonte: adaptado de ANVISA and OPAS, 2007 (http://www.rmcontrole.org.br/modulo3/gramn_lacta2.htm) (acesso 01/08/2010)

A parede celular das bactérias Gram positivo é composta por várias camadas de peptidoglicano, que na maioria dos casos é permeável a macromoléculas e geralmente não oferece resistência à difusão dos antibióticos para exercerem as suas propriedades de antibiose, por interacção com os alvos presentes na célula bacteriana. Do mesmo modo substâncias de alto peso molecular elaboradas no citoplasma são excretadas para o meio ambiente sem a resistência da parede celular, caso das β -lactamases (enzimas hidrolíticas dos β -lactâmicos) (Wilke *et al.*, 2005). A parede celular das bactérias Gram negativo é muito mais complexa quanto à composição química e quanto à ultra-estrutura. O peptidoglicano dos bacilos Gram

negativo está disposto em monocamada e funciona como estrutura de suporte à lise celular. A parede celular (formada por lípidos e proteínas) nos Gram negativo constitui uma barreira à penetração de compostos hidrofóbicos e hidrófilos, podendo ser responsável pela resistência aos antibióticos. Estes maioritariamente permeiam a membrana externa por difusão através dos canais de porina (proteínas que organizam canais hidrófilos permitindo a permeação da membrana externa a compostos hidrofílicos com peso molecular inferior a 650 daltons) e terão de enfrentar, se for caso disso, as enzimas degradativas desses antibióticos retidas no espaço periplasmático (Figura 8) (Sousa, 2006).

As bactérias podem desenvolver resistência aos β -lactâmicos por vários mecanismos, podendo estes ocorrer em simultâneo no mesmo organismo. Os mecanismos implicados são (Figura 5):

1. *Alterações de permeabilidade.* A presença de membrana externa nos bacilos Gram negativo dificulta a penetração de substância hidrofílicas, que é o caso dos β -lactâmicos. No entanto, a maioria dos antibióticos β -lactâmicos apresenta um peso molecular e uma hidrofília compatível com a natureza dos canais de porina, atingindo assim o seu local de acção. Alterações de expressão de porinas ou a sua ausência justificam a resistência a alguns antibióticos (Wilke *et al.*, 2005; Sousa, 2006).
2. *Modificação das PBPs.* Os β -lactâmicos precisam unir-se às PBP para exercer o seu efeito bactericida. Mutações dos genes que codificam as PBPs, recombinações homólogas entre genes de PBPs ou a síntese de novas PBPs sem grande afinidade para os β -lactâmicos conferem aos microrganismos resistência a estes antibióticos. Este mecanismo é mais comum em cocos Gram positivo mas também está presente em bacilos Gram negativo (p. ex: a *E. coli* possui 7 PBPs com diferentes afinidades para os β -lactâmicos) (Pitout *et al.*, 1997; Marín e Gudíol, 2003).
3. *Produção de enzimas.* Actualmente constitui o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos, sobretudo em bactérias Gram negativo. As β -lactamases são enzimas plasmídicas ou cromossómicas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico (ligação CO-N) (), inactivando o antibiótico. As β -lactamases são produzidas por bactérias Gram positivo sendo excretadas para o meio ambiente e por bactérias Gram negativo ficando retidas no periplasma, produzindo resistência clinicamente significativa a antibióticos. A produção de β -lactamases pode ser constitutiva (produz-se sempre) ou indutiva (só ocorre na presença de um β -lactâmico).

4. *Bombas de efluxo*. Mecanismos de expulsão activa, dependentes de energia, que bombeiam o antibiótico para o exterior, impedindo que o antibiótico atinja a concentração intracelular necessária para exercer a sua função (Sousa *et al.*, 1998).

Os compostos β -lactâmicos são utilizados como antibióticos de primeira linha no tratamento de patologias diversas. Otites, amigdalites, faringites, infecções da pele e tecidos moles, septicemias, infecções articulares, cardíacas, biliares, pulmonares e brônquicas têm sido tratadas com estes antibióticos, devendo a sua escolha ser feita em função do agente infeccioso (Sousa, 2006).

Uma vez que a resposta normal das bactérias à exposição aos antibióticos é o desenvolvimento de alguma variação genética que lhes confere resistência aos efeitos do fármaco, e que a flora normal do homem alberga espécies resistentes a cada e a qualquer antibiótico, é inevitável a emergência de resistências. No entanto devemos manter a esperança de conseguir alcançar a limitação dos danos (Machado Sequeira, 2004).

1.1.5 β -lactamases

A utilização indiscriminada de antibióticos β -lactâmicos, quer em clínica hospitalar bem como na comunidade, contribui para a pressão selectiva levando ao aparecimento de bactérias produtoras de β -lactamases, particularmente bacilos Gram negativo (Sousa 2006; Bradford 2001). As β -lactamases (EC 3.5.2.6) são designadas pelo *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry* como “enzimas que hidrolisam amidas, amidinas e outras ligações C – N, (...) com base no substrato (...) em amidas cíclicas”, inactivando assim a capacidade antibacteriana do antibiótico (Bush *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 2003; Wilke *et al.*, 2005; Falagas e Karageorgopoulos 2009).

De entre os vários mecanismos de resistência antimicrobiana já referidos, a produção de β -lactamases constitui o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em bacilos Gram negativo (Pitout *et al.*, 1997; Pitout e Laupland, 2008).

A propagação dos genes que codificam a produção de β -lactamases tem sido exacerbada pela sua integração em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposões, facilitando a rápida transferência de material genético entre microrganismos (Medeiros, 1984; Pitout *et al.*, 1997). As β -lactamases podem ter origem cromossómica ou plasmídica, podem ser encontradas no espaço periplasmático da parede celular das bactérias Gram negativo, e excretadas para o meio exterior nas bactérias Gram positivo (Figura 8) (Sousa, 2006). Cerca de 700 β -lactamases foram descritas até à data, tendo sido criado uma página na

internet organizada por Karen Bush e George Jacoby, de modo a monitorizar e documentar todos os desenvolvimentos sobre os tipos mais comuns de β -lactamases com relevância clínica (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>) (Pitout *et al.*, 2005; Paterson e Bonomo, 2005; Perez *et al.*, 2007).

As β -lactamases apresentam afinidades diferentes para os vários substratos: algumas hidrolisam preferencialmente as penicilinas (penicilinases), outras têm atracção pelas cefalosporinas (cefalosporinases), pelos carbapenemos (carbapenemases), e algumas inactivam várias classes de antibióticos (Sousa Junior *et al.*, 2004; Sousa, 2006; Perez *et al.*, 2007).

Muitos géneros de bactérias Gram negativo possuem a capacidade natural de produzir β -lactamases cromossómicas. Estas enzimas evoluíram provavelmente das PBPs, com as quais partilham homologia em termos de sequências de aminoácidos (Bradford, 2001).

A primeira β -lactamase identificada, mediada por plasmídeo em Gram negativo, foi a TEM-1, descoberta na Grécia em 1960 a partir de uma amostra clínica de *E. coli* isolada de uma doente chamada Temoniera, daí a designação TEM (Bradford, 2001; Sousa, 2006). Estas enzimas hidrolisam as penicilinas (ampicilina) e cefalosporinas de 1ª geração (cefalotina e cefazolina), mas não apresentam actividade contra cefalosporinas de largo espectro com cadeia lateral oximino (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima ou cefepima) (Picão e Gales, 2007). Actualmente, as TEM podem ser encontradas em enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (Bradford, 2001).

Outra β -lactamase comum é a SHV-1 (variável sulfidril) codificada em plasmídeos em *E. coli* e no cromossoma em *K. pneumoniae* (Bradford, 2001; Paterson e Bonomo, 2005).

Nos últimos 30 anos, foram desenvolvidos novos compostos β -lactâmicos, especificamente desenhados para resistir à acção hidrolítica das β -lactamases, contribuindo no entanto para o surgimento de novas variantes (por mutação da estrutura clássica) das β -lactamases já existentes, como consequência da pressão exercida pelo uso destes novos β -lactâmicos. Estas novas β -lactamases denominadas ESBLs apresentam actividade contra as cefalosporinas de espectro alargado (Pitout *et al.*, 1997; Bradford, 2001; Sousa, 2006; Dalmarco *et al.*, 2006). A denominação um pouco anárquica das β -lactamases, de acordo com o nome do doente (TEM); de acordo com o substrato (OXA_ actividade contra oxacilina); pelas suas propriedades bioquímicas (CTX_ actividade contra cefotaxima), ou com o nome do hospital em que foi isolado (MIR_ Miriam Hospital), levou à necessidade de classificar as β -lactamases existentes (Sousa, 2006).

Vários foram os sistemas propostos para a classificação das β -lactamases. A primeira classificação proposta em 1970, por Jack e Richmond, e alargada em 1973 por Richmond e Sykes, era baseada no tipo de substrato e no perfil frente aos inibidores (Sanders, 1992;

Bradford, 2001). Mais tarde, em 1980, Ambler propôs uma classificação molecular, com base na similaridade dos aminoácidos das β -lactamases, agrupando-as em quatro grandes classes (A a D) (Paterson e Bonomo, 2005), sendo que as de classe A, C e D englobam as serino- β -lactamases (presença de um grupo serina no centro activo da enzima), as de classe B englobam as metalo- β -lactamases (dependentes do zinco), e as classe C e D incluem respectivamente as β -lactamases cromossómicas e as oxacilinasas (Ambler, 1980; Bradford, 2001).

Mais recentemente, o sistema de classificação sofreu nova revisão, desta vez em 1995 por Bush, Jacob e Medeiros, que classificam as β -lactamases com base no perfil de substratos, resposta aos inibidores, estrutura molecular, propriedades bioquímicas e ponto isoeléctrico (Bush *et al.*, 1995; Bradford, 2001). Este sistema de classificação funcional caracteriza-se por quatro grandes grupos (1-4) e vários subgrupos (a-f) (Bush *et al.*, 1995; Dalmarco, 2006), sendo de extrema importância para os clínicos e microbiologistas no diagnóstico laboratorial, já que considera os inibidores das β -lactamases e os substratos β -lactâmicos clinicamente relevantes (Paterson e Bonomo, 2005). A classificação molecular de Ambler e a classificação funcional de Bush-Jacoby Medeiros são as mais frequentemente utilizadas (Tabela I) (Bush *et al.*, 1995; Pitout *et al.*, 1997; Pitout *et al.*, 2005; Bradford 2001; Babic *et al.*, 2006).

Estas classificações são mundialmente aceites, sendo no entanto adaptadas às necessidades dos investigadores, tornando a sua complexidade mais acessível aos clínicos, equipas de controlo de infecção e administração hospitalar. Com este intuito, recentemente, Giske *et al.*, (2009) publicou um artigo onde propõe um sistema de classificação mais simplificado (Tabela II) e que inclui as mais importantes diferenças entre várias categorias de enzimas. Assim, a classe funcional de β -lactamases 2be passaria a designar-se “ESBLs classe A” (ESBL_A), as AmpC mediadas por plasmídeos e OXA-ESBLs seriam denominadas “ESBLs Miscelânea” (ESBL_M) e as ESBL que têm actividade hidrolítica contra carbapenemos seriam denominadas ESBL_{CARBA}.

Tabela 1. Características das β -lactamases segundo Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros

Bush-Jacoby e Medeiros	Sub grupo	Classe Ambler	Inibido por:		Substrato Preferencial	Características
			Ác. Clav.	EDTA		
Grupo 1 Cefalosporinas	—	C	-	-	Cefalosporinas	Cefalosporinas cromossómicas de bacilos Gram negativo (AmpC), resistentes a todos os β -lactâmicos, excepto carbapenemos. Não são inibidas pelo ácido clavulânico
	2a	A	+	-	Penicilinas	Penicilinas clássicas de bactérias Gram positivo
	2b	A	+	-	Penicilinas e cefalosporinas	β -lactamases de largo espectro: TEM-1, TEM-2 e SHV-1. β -lactamases cromossómicas de <i>Klebsiella</i> spp.
	2be	A	+	-	Penicilinas, oximino-cefalosporinas e monobactâmicos	Compreende as β -lactamases plasmídicas (ESBL) Enzimas que hidrolisam as penicilinas e cefalosporinas clássicas, bem como cefotaxima, ceftazidima e aztreonam (TEM-3 a TEM-160, SHV-2 a SHV-101). Inibidas pelo ácido clavulânico
Grupo 2 Penicilinas (sensíveis ao ácido clavulânico)	2br	A	+/-	-	Penicilinas	β -lactamases derivadas de TEM (TEM-30 a TEM-36), resistentes aos inibidores (IRTs)
	2c	A	+	-	Penicilinas e cefalosporinas	Carbenicilinas (PSE-1, CARB-3) inibidas pelo ácido clavulânico
	2d	D	+/-	-	Penicilinas e cefalosporinas	Oxacilinas (OXA-1 a OXA-11, PSE-1) que inactivam a cloxacilina e são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico
	2e	A	+	-	Penicilinas e cloxacilina	Cefalosporinas induzíveis de <i>Proteus vulgaris</i> . Sensível ao ácido clavulânico
	2f	A	+	-	Penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos	Carbapenemas (serino- β -lactamases) que não são metaloenzimas (Sme-1 de <i>Serratia marcescens</i> ; KPC-1 e -2 de <i>K. pneumoniae</i> ; GES-2 de <i>P. aeruginosa</i>)
Grupo 3 Metallo- β -lactamases	3a	B	-	+		Carbapenemas dependentes do Zinco que inactivam penicilinas e cefalosporinas. Hidrolisam rapidamente o imipenemo (IMP-1) e são resistentes ao ácido clavulânico
	3b	B	-	+	Maioria dos β -lactâmicos (incluindo carbapenemos), excepto monobactâmicos	Enzimas das espécies de <i>Aeromonas</i> , consideradas as verdadeiras carbapenemas. Elevada especificidade para hidrolisar os carbapenemos
	3c	B	-	+		Metallo- β -lactamase de <i>Legionella gormanii</i> , apresenta elevada actividade sobre cefalosporinas e ampicilina
Grupo 4	—	ND	-	?	Penicilinas	Miscelânea de enzimas Penicilinas resistentes ao ácido clavulânico sem grupo molecular definido

Fonte: adaptado de Bush et al., 1995; Sousa, 2006; Perez et al., 2007; Dalmarco, 2006; Ambler, 1980; Gonçalves, 2008 ND. Não determinado; Ác. Clav.: Ácido clavulânico; EDTA: ácido etilendiaminotetracético

Tabela II. Proposta de classificação das β -lactamases segundo Giske et al.

Acquired β -lactamases with hydrolytic activity against extended-spectrum cephalosporins and/or carbapenems			
	ESBL _A	ESBL _M	ESBL _{CARBA}
β -Lactamase classes	High prevalent ESBL _A CTX-M TEM-ESBLs SHV-ESBLs VEB PER	ESBL _{M-C} (Plasmid-mediated AmpC) CMY FOX MIR MOX DHA LAT BIL ACT ACC	ESBL _{CARBA-A} KPC GES-2, -4, -5, -6, -8 NMC SME IMI-1, -2
	Low prevalent ESBL _A GES-1, -3, -7, -9 SFO-1 BES-1 BEL-1 TLA IBC CMT ^a	ESBL _{M-D} (OXA-ESBL) OXA-10-group OXA-13-group OXA-2-group OXA-18 OXA-45	ESBL _{CARBA-B} (MBL) IMP VIM SPM-1 GIM-1 SIM-1 AIM-1 ESBL _{CARBA-D} (OXA-carbapenemases) OXA-23-group OXA-24-group OXA-48 ^b OXA-58-group
Operational definition	Non-susceptibility to extended-spectrum cephalosporins AND clavulanate synergy	Non-susceptibility to extended-spectrum cephalosporins AND phenotypic detection (ESBL _{M-C}) OR genotypic detection (ESBL _{M-D})	Non-susceptibility to extended-spectrum cephalosporins and at least one carbapenem AND ESBL _{CARBA} detected with phenotypic and/or genotypic methods

^a Resistente à inibição pelo ácido clavulânico ^b isolados produtores de OXA-48 apresentam susceptibilidade in vitro às cefalosporinas. Fonte: Giske et al., 2009a

Com o intuito de complementar e não de substituir os sistemas anteriores, a proposta de Giske *et al.*, não reuniu consenso, sendo imediatamente revogada por Bush e colegas (2009a), que defendem que esta proposta acarreta alguns inconvenientes na definição das ESBL já que engloba β -lactamases não classicamente reconhecidas como ESBL, caso das carbapenemases serínicas e metalo- β -lactamases que apresentam mecanismos de hidrólise e de inativação distintos (Bush *et al.*, 2009). A discussão mantém-se com o autor a afirmar que a sua proposta é tão ou mais válida que as anteriores, na medida em que é baseada na perspectiva clínica, e enfatiza a necessidade de comunicação entre os vários grupos de profissionais da saúde (Giske *et al.*, 2009b).

1.2 β -lactamases de espectro alargado

A introdução das cefalosporinas de terceira geração (C3G) na prática clínica nos anos 80, foi encarada como a maior conquista na batalha contra a resistência bacteriana mediada por β -lactamases (Paterson e Bonomo, 2005). As C3G foram desenvolvidas em resposta ao aumento de prevalência de β -lactamases em alguns organismos (por exemplo, hidrólise da ampicilina por β -lactamases TEM-1 e SHV-1 em *E. coli* e *K. pneumoniae*) e disseminação destas β -lactamases a outros organismos (p.ex: *H. influenza* e *N. gonorrhoeae*), não sendo no entanto os únicos antibióticos com espectro contra os organismos produtores de β -lactamases mas sim os menos nefrotóxicos para o humano (Paterson e Bonomo, 2005).

Sem surpresas, a resistência a estes antibióticos β -lactâmicos de espectro alargado emergiu rapidamente. A primeira enzima capaz de hidrolisar estes compostos foi isolada por Knothe *et al.*, em 1983 na cidade de Frankfurt, na Alemanha (Dalmarco, 2006), uma SHV-2, encontrada num isolado de *Klebsiella ozaenae*. Devido ao alargamento do espectro de actividade, especialmente contra oximino-cefalosporinas, estas enzimas foram chamadas de ESBLs (Extended-Spectrum β -lactamases) (Babic *et al.*, 2006; Coque *et al.*, 2008). Posteriormente outros isolamentos foram feitos em França (Dalmarco, 2006) e nos Estados Unidos (Colodner, 2005). Comprovando a sua capacidade de adaptação e de dispersão, novas variantes de ESBLs foram identificadas, tendo vindo a aumentar consideravelmente por todo o mundo (Falagas e Karageorgopoulos, 2009).

Na sua maioria, as ESBL derivam de mutações simples e pontuais (substituição de um único aminoácido) no centro activo das β -lactamases clássicas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 (Paterson e Bonomo, 2005).

Em 2001, um artigo de revisão publicado por Patrícia Bradford no *Clinical Microbiology Reviews*, dá conta de mais de 150 tipos de ESBL identificadas, com disseminação mundial e em diferentes géneros da família *Enterobacteriaceae* e da espécie *Pseudomonas aeruginosa* (Bradford, 2001). Desde então numerosos artigos foram publicados (Figura 9) com origem em mais de 30 países diferentes, reflectindo a verdadeira distribuição mundial dos organismos produtores de β -lactamases (Paterson e Bonomo, 2005). Uma pesquisa na PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) utilizando as palavras-chave “extended-spectrum β -lactamase” revela mais de 3000 artigos relevantes e mais de 2500 desde a revisão de Bradford.

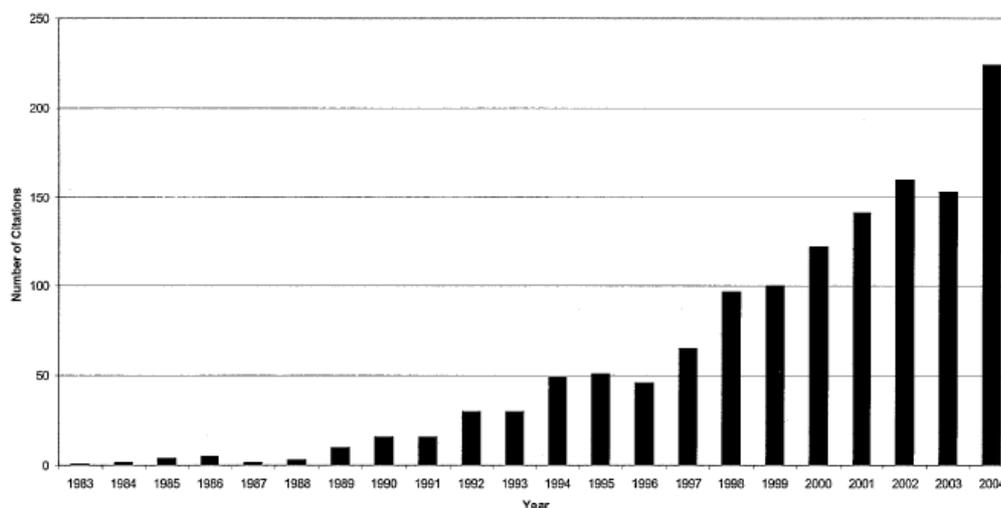


Figura 9. Explosão de referências a ESBL

Fonte: Paterson e Bonomo, 2005

1.2.1 Definição e Histórico

As β -lactamases são na maioria das vezes classificadas de acordo com duas classificações: classificação molecular de Ambler e classificação funcional de Bush-Jacoby e Medeiros (Tabela I). As ESBL são por definição, enzimas da classe A ou D (classificação de Ambler), ou do subgrupo 2be ou 2d (classificação de Bush-Jacoby e Medeiros), capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de 1ª, 2ª, 3ª (ex: cefotaxima, ceftazidima) e 4ª Geração (C4G) (ex: cefepima) (10% a mais do que hidrolisam as benzilpenicilinas) e monobactams (ex: aztreonam). As ESBL são inibidas pelas cefamicinas (ex: cefoxitina), pelos carbapenems (ex: imipenem) e também por inibidores clássicos das β -lactamases, caso do ácido clavulânico, sulbactam e/ou tazobactam, particularidade utilizada na detecção laboratorial (Bradford, 2001; Paterson e Bonomo, 2005; Perez *et al.*, 2007; Cattoir, 2008).

Esta característica diferencia as ESBLs das β -lactamases tipo AmpC (grupo 1), produzidas por organismos como *Enterobacter cloacae*, que têm as C3G como substrato mas não são inibidas pelo ácido clavulânico. Existem outros grupos de β -lactamases (2e e 2f) que hidrolisam as cefalosporinas e são inibidas pelo ácido clavulânico apresentando no entanto afinidades diferentes para o aztreonam (subgrupo 2e) ou sendo fracamente inibidas pelo ácido clavulânico (subgrupo 2f).

AS ESBLs derivadas de β -lactamases clássicas TEM-1, TEM-2 ou SHV-1 diferem das suas precursoras em alguns ou apenas num único aminoácido, resultando numa profunda alteração da sua actividade enzimática, passando a conseguir hidrolisar as C3G e o aztreonam (alargamento de espectro em relação às enzimas maternas) (Paterson e Bonomo, 2005),

mantendo a capacidade de hidrolisar as penicilinas mas não sendo tão eficientes como as suas precursoras (Bradford, 2001).

Diferentes grupos de ESBLs, classificados de acordo com as suas sequências de aminoácidos e com a sua origem têm sido descritas, e a maioria delas descobertas na Europa (Tabela III) (Cantón *et al.*, 2008).

Tabela III. Diferentes famílias e grupos de ESBL (tipo de ESBL e país de origem)

ESBL	Progenitor β -lactamase	Country of emergence	Bacterial species in which these enzymes were first detected
<i>High prevalence</i>			
SHV	SHV-1/LEN (>90%) ^a	Germany (1983) ^b	Enterobacteriaceae
TEM	TEM-1, -2 (>90%) ^a	France (1985) ^b	Enterobacteriaceae
CTX-M-1 group	KLUC <i>Kluyvera cryocrescens</i> (85%) ^a	Germany (1989) ^c	<i>Escherichia coli</i>
CTX-M-2 group	KLUA <i>Kluyvera ascorbata</i> (80-100%) ^a	Japan (1986) ^c /Argentina (1989) ^c	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp.
CTX-M-8 group	KLUG <i>Kluyvera georgiana</i> (95%) ^a	Brazil (1996-1997) ^c	<i>Citrobacter amalonaticus</i> , <i>Enterobacter</i> spp.
CTX-M-9 group	KLUG <i>K. georgiana</i> (80%) ^a	Spain (1994) ^c	<i>E. coli</i>
CTX-M-25 group	ND	Canada (2000) ^c	<i>E. coli</i>
OXA	OXA-10 (PSE-2) (>90%) ^a	Turkey (1991) ^c	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PER	PER (39%) ^a	France (1991) ^c	<i>P. aeruginosa</i>
VEB	PER (39%) ^a	France (Vietnam ^d) (1996) ^c	<i>E. coli</i>
<i>Low prevalence</i>			
SFO	AmpA <i>Serratia fonticola</i> (96%) ^a	Japan (1988) ^c	<i>Enterobacter cloacae</i>
TLA	CME-1 (50%) ^a <i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	Mexico (1991) ^c	<i>E. coli</i>
BES	YENT (51%) ^a <i>Yersinia enterocolitica</i>	Brazil (1996) ^c	<i>Serratia marcescens</i>
GES-1	YENT (36%) ^a <i>Y. enterocolitica</i>	France (French Guyana ^d) (1998) ^c	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
IBC	YENT (40%) ^a <i>Y. enterocolitica</i>	Greece (1999) ^c	<i>E. cloacae</i>
BEL	GES-1 (50%) ^a	Belgium (2004) ^c	<i>P. aeruginosa</i>

ND: não determinado; ^a homologia da sequência de aminoácido (%); ^b Data da publicação; ^c Data de isolamento; ^d Origem do paciente onde a enzima correspondente foi primeiramente detectada. Fonte: Cantón *et al.*, 2008

Até ao final da década de 90: (i) a maioria das ESBLs detectadas era do tipo TEM e SHV; (ii) os isolados produtores destas enzimas estavam na maioria dos casos relacionados com surtos nosocomiais (principalmente UCIs e raríssimas vezes associados a infecções adquiridas na comunidade); (iii) a prevalência de produtores de ESBL era mais elevada em *K. pneumoniae* do que em *E. coli* (Spanu *et al.*, 2002; Cattoir, 2008; Cantón *et al.*, 2008; Rodríguez-Baño e Navarro, 2008).

Atualmente a maioria dos isolados produtores de ESBL pertencem à espécie *E. coli* e expressam β -lactamases de tipo CTX-M (Mendonça *et al.*, 2007), sendo estes isolados

responsáveis principalmente por infecções urinárias de origem comunitária (Rodríguez-Baño *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2007; Denton, 2007; EARSS, 2009).

A detecção de ESBLs principalmente tipo CTX-M em isolados de *Enterobacteriaceae* mudou o cenário epidemiológico global. Associadas maioritariamente a infecções nosocomiais, as ESBLs tipo CTX-M têm aparecido muitas vezes associadas com infecções adquiridas na comunidade. O número de estirpes produtoras de ESBL aumentou dentro dos serviços hospitalares (caso das UCIs) bem como em serviços de saúde de médio e longo termo (Denton, 2007). Contrariamente às ESBL de tipo TEM/SHV, os mecanismos de difusão de CTX-M são complexos, com difusão simultânea de plasmídeos e outros elementos genéticos móveis (Cattoir, 2008; Amaral *et al.*, 2009; EARSS, 2009). A ESBL tipo CTX-M é considerada actualmente a ESBL mais prevalente a nível mundial (Bradford, 2001; Ho *et al.*, 2008; Peirano e Pitout, 2010).

1.2.2 Classificação

Todas as ESBLs derivam de outras β -lactamases por ocorrência de uma ou mais mutações genéticas pontuais no seu centro activo. As substituições de aminoácidos ocorridas alargam o sítio de acção permitindo novas interações enzima-substrato com as oximinocefalosporinas (Bradford, 2001; Babic *et al.*, 2006).

A maioria das ESBLs deriva das β -lactamases tipo TEM-1, TEM-2 e SHV-1. De momento existem mais de 180 β -lactamases tipo TEM e 130 tipo SHV identificadas (sequências de aminoácidos das enzimas TEM e SHV podem ser consultadas em www.lahey.org/studies/webt.htm [acesso em 02-09-2010]) (Bradford, 2001; Paterson e Bonomo, 2005).

Outras degradam mais eficazmente a cefotaxima em comparação com as restantes cefalosporinas e pertencem à família CTX-M (mais de 80 alelos, divididos em 5 grupos filogenéticos) (Ho *et al.*, 2008; Peirano e Pitout, 2010).

A família OXA, pertencente ao grupo D de Ambler, difere das ESBLs tipo TEM e SHV por apresentar actividade hidrolítica contra oxacilina e cloxacilina e ser fracamente inibida pelo ácido clavulânico. A maioria das OXA confere resistência à ceftazidima e encontra-se em enterobactérias e em *P. aeruginosa* (Sousa, 2006).

Outras famílias de ESBLs com menor incidência têm sido reportadas, como as enzimas PER encontradas em *P. aeruginosa*, VEB e GES em *P. aeruginosa* e *Enterobacteriaceae* e ainda alguns tipos raros de enzimas como SFO, TLA, BEL, BES e IBC (Paterson e Bonomo, 2005; Sousa, 2006; Cantón *et al.*, 2008).

1.2.2.1 β -lactamases TEM

A TEM-1, de espectro restrito, representa o principal mecanismo de resistência à ampicilina em cerca de 90% dos bacilos Gram negativo (principalmente *E. coli*) (Medeiros, 1984; Bradford, 2001; EARSS, 2009). Apresenta um espectro restrito pois confere resistência às penicilinas e às cefalosporinas de 1ª Geração mas não tem actividade contra as oximino-cefalosporinas (Medeiros, 1984; Paterson e Bonomo, 2005).

TEM-2, a primeira enzima derivada de TEM-1, apresenta apenas uma única substituição de aminoácido em relação à β -lactamase original. Esta alteração provoca uma mudança no ponto isoeléctrico mas não modifica o perfil de substrato (Bush *et al.*, 1995; Paterson e Bonomo, 2005).

Reportada pela primeira vez em 1984, a TEM-3, originalmente chamada de CTX-1 devido à sua actividade reforçada contra a cefotaxima, foi a primeira β -lactamase do tipo TEM mediada por plasmídeos que apresenta fenótipo ESBL (Cantón *et al.*, 2008; Bradford, 2001; Paterson e Bonomo, 2005). No entanto a análise posterior de uma estirpe de *K. oxytoca* isolada numa unidade neonatal em 1982 na Irlanda, caracteriza a β -lactamase desta bactéria como ESBL, denominando-a de TEM-12. De notar que estes doentes infectados foram tratados com ceftazidima, bom exemplo da emergência das ESBLs na resposta à pressão selectiva induzida pelas cefalosporinas de espectro alargado (Paterson e Bonomo, 2005).

As mutações responsáveis pela extensão de espectro ocorrem geralmente ao nível de 4 “hot spots” da proteína: substituição de glutamato por lisina na posição 104, arginina por serina na posição 164, glicina por serina na posição 238 e glutamato por serina na posição 240 (Bradford, 2001; Cattoir, 2008). Outra enzima TEM descrita é a TEM-AQ, de ocorrência natural, que apresenta uma deleção de aminoácido, característica que ainda não tinha sido verificada noutras enzimas TEM (Bradford, 2001).

Na Europa as ESBL de tipo TEM mais frequentes são a TEM-24 em *E. aerogenes*, TEM-3 e -4 em *K. pneumoniae* e TEM-52 associada com *Salmonella enterica* serovar Enteritidis e mais recentemente com *E. coli* isolada de infecções urinárias (Machado *et al.*, 2007; Cattoir, 2008; Cantón *et al.*, 2008; EARSS, 2009).

Altamente disseminadas pela Europa, as β -lactamases tipo TEM já foram descritas em Portugal. Entre 1995-1996 surgiu a primeira evidência de β -lactamase tipo TEM-10 em isolados de *K. pneumoniae* num hospital português (Barroso *et al.*, 2000). Mais tarde, em 1999, um grupo de estudo da Unidade de Resistências aos Antibióticos do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge identificaram 9 isolados provenientes de hospitais de três zonas geográficas

distintas (Norte, Centro e Lisboa) com genes bla_{TEM} (bla_{TEM-3} , bla_{TEM-10} e bla_{TEM-24}). Num segundo período, em 2006, a mesma equipa detectou β -lactamases tipo TEM-52 (região Norte) e TEM-10 (região Centro) (Mendonça *et al.*, 2009). Também Fernandes *et al.* (2009) detectaram anos mais tarde a presença destas β -lactamases em doentes hospitalizados e não hospitalizados na região do Minho em Portugal. Neste estudo foram identificadas 4 tipos de β -lactamases TEM: TEM-52, TEM-24, TEM-10 e TEM-116.

1.2.2.2 β -lactamases SHV

A β -lactamase SHV-1 partilha 68% de homologia de aminoácidos com a β -lactamase TEM-1, tendo uma estrutura global semelhante (Bradford, 2001). Frequentemente tem sido identificada em *K. pneumoniae*, em que o gene bla_{SHV-1} ou outro gene relacionado está integrado no cromossoma bacteriano. A hipótese do gene que codifica a SHV-1 existir como parte de um elemento transponível (transposição) nunca foi demonstrada. É responsável por mais de 20% da resistência à ampicilina nesta espécie (Cantón *et al.*, 2008).

A maioria das variantes de SHV-1 possui fenótipo ESBL e são caracterizadas pela substituição de uma glicina por serina na posição 238 (Gli238Ser) na variante SHV-2 (β -lactamase plasmídica) e glutamato por lisina na posição 240 (Glu240Lis) na variante SHV-5, assemelhando-se às substituições ocorridas em ESBL tipo TEM (Bradford, 2001; Paterson *et al.*, 2003; Paterson e Bonomo, 2005; Goviden *et al.*, 2007). O resíduo de serina é responsável pela hidrólise da ceftazidima e o resíduo de lisina na posição 240 é crítico para a hidrólise da cefotaxima (Bradford, 2001; Paterson e Bonomo, 2005).

São conhecidas mais de 100 variantes de SHV reconhecidas unicamente pelas substituições de aminoácidos (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>). ESBL de tipo SHV são as mais predominantes em estudos de resistência efectuados na Europa e nos Estados Unidos. A maioria está presente em *K. pneumoniae*, podendo também ser mediada por plasmídeos em *E. coli* e *P. aeruginosa*. Os membros mais comuns são SHV-5 e SHV-12 (Bradford, 2001; Paterson *et al.*, 2003; Jacoby e Munoz-Price, 2005). Em Portugal já foram reportadas em vários trabalhos as β -lactamases tipo SHV-2, -5, -12 e SHV-55, detectadas em isolados de *K. pneumoniae* (Fernandes *et al.*, 2009). Para além destas enzimas, Mendonça *et al.* (2009) detectou três novas enzimas SHV (SHV-106, SHV-107 e SHV-108) num estudo realizado em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de unidades hospitalares portuguesas.

1.2.2.3 β -lactamases CTX-M

A β -lactamase CTX-M (activa contra CefoTaXima) foi reportada pela primeira vez no Japão em 1986, e foi inicialmente chamada de TOHO-1. Estas enzimas bacterianas, mediadas por plasmídeos, apresentam elevada actividade hidrolítica frente à cefotaxima comparativamente à ceftazidima, com concentrações mínimas inibitórias (CMI) superiores às observadas em outras ESBLs (Paterson e Bonomo, 2005). Foi sugerido que o resíduo de serina na posição 237, presente na estrutura de todas as enzimas CTX-M, seja fundamental na actividade de espectro alargado destas enzimas (Bradford, 2001). No entanto, existem algumas excepções, caso das CTX-M-15, CTX-M-32 e CTX-M-19, que devido a mutações pontuais na posição 240 (Asp240Gly), apresentam uma actividade catalítica superior frente à ceftazidima (Oteo *et al.*, 2006; Govinden *et al.*, 2007).

A Família CTX-M compreende mais de 80 enzimas provenientes de vários países, e são classificadas segundo as suas semelhanças na sequência de aminoácidos. Estudos filogenéticos revelaram 5 grandes grupos de enzimas CTX-M: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25. Os grupos partilham entre si cerca de 90% de homologia e dentro do mesmo grupo as enzimas apresentam 99% de identidade (Babic *et al.*, 2006; Govinden *et al.*, 2007; Pitout e Laupland, 2008; Cantón *et al.*, 2008; Peirano e Pitout, 2010).

As β -lactamases CTX-M são codificadas por genes presentes em elementos móveis (caso da sequência de inserção *ISEcp1*) e provenientes dos cromossomas de bactérias ambientais como a *Kluyvera* spp. A associação dos genes *bla*_{CTX-M} com elementos genéticos móveis facilita a expressão e disseminação destas β -lactamases (Dutour, 2002; Pitout e Laupland, 2008; Peirano e Pitout, 2010).

A epidemiologia dos organismos produtores de enzimas CTX-M não está limitada a infecções nosocomiais por *Klebsiella* spp. e o seu potencial de propagação para além do ambiente hospitalar aumenta as preocupações com a saúde pública (Mendonça *et al.*, 2007; Pitout e Laupland, 2008).

Estirpes produtoras de CTX-M foram inicialmente reportadas de forma esporádica no fim dos anos 80 no Japão (FEC-1), na Europa (MEN-1, CTX-M-1) e na Argentina (CTX-M-2). No início dos anos 90, uma difusão massiva desses produtores de CTX-M (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *C. freundii*, *Enterobacter* spp. e *S. marcescens*) foi descrita em alguns países da América do Sul, com grande predominância de enzimas CTX-M do grupo 2 (Babic *et al.*, 2006; Mendonça *et al.*, 2007; Cattoir, 2008).

As β -lactamases tipo CTX-M são no momento endémicas em muitos países, tendo origem nosocomial e comunitária. Extremo Oriente, Este e Oeste da Europa apresentam uma grande diversidade de tipos de CTX-M (Govinden *et al.*, 2007). Actualmente, a enzima que apresenta uma dispersão global é a CTX-M-15, detectada inicialmente numa estirpe de *E. coli* isolada em 2001 na Índia. Pertence ao grupo CTX-M-1 e deriva da CTX-M-3 por substituição de um aminoácido na posição 240 (Asp240Gly) (Peirano e Pitout, 2010). Esta β -lactamase foi recentemente reportada no nosso país num isolado de *K. pneumoniae* recolhido no Hospital de Santa Maria, Lisboa (Conceição *et al.*, 2005). Posteriormente foi encontrada uma *E. coli* produtora de ESBL CTX-M-15 nos Hospitais da Universidade de Coimbra (Simões *et al.*, 2006).

Vários tipos de β -lactamases do tipo CTX-M foram detectados nos últimos anos em Portugal. Entre 2004-2006, um estudo de 181 isolados de *E. coli* provenientes de hospitais Portugueses revelou que 119 deles expressavam uma ESBL tipo CTX-M, e as mais frequentes foram CTX-M-15 (92%), CTX-M-14 (8%) e CTX-M-32 (1%) (Mendonça *et al.*, 2007).

A generalização do uso de ceftriaxona e cefotaxima associada aos factores de virulência intrínsecos de alguns microrganismos são algumas das causas para o crescimento exponencial das β -lactamases CTX-M (Jacoby e Munoz-Price, 2005; Govinden *et al.*, 2007; Denton, 2007). O aumento de relatórios sobre identificação de β -lactamases tipo CTX-M demonstra a preocupação global com a problemática das ESBLs (Coque *et al.*, 2008; Cantón *et al.*, 2008; EARSS, 2009; Peirano e Pitout, 2010).

1.2.2.4 β -lactamases OXA

As enzimas tipo OXA são outra família de ESBLs em crescimento. Diferem das β -lactamases clássicas TEM e SHV por pertencerem à classe D e grupo funcional 2d do sistema de classificação de Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros respectivamente (Bradford, 2001; Cattoir, 2008).

Frequentemente encontradas em *P. aeruginosa* e raramente em *Enterobacteriaceae*, as β -lactamases tipo OXA conferem resistência à ampicilina e à cefalotina, e são caracterizadas pela sua actividade hidrolítica contra a oxacilina e a cloxacilina e pelo facto de serem fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, com excepção da β -lactamase OXA-18 (Jacoby e Munoz-Price, 2005; Bradford, 2001; Paterson e Bonomo, 2005).

As β -lactamases tipo OXA representam uma família filogeneticamente muito heterogénea e as ESBL do tipo OXA derivam de OXA-10, de OXA-13, de OXA-2 ou não estão relacionadas (OXA-18, OXA-25). As OXA que derivam de OXA-10 apresentam uma ou duas

substituições de aminoácidos: asparagina por serina na posição 73 (Asp73Ser) ou aspartato por glicina na posição 157 (Asp157Gly), esta última necessária para o alto nível de resistência à ceftazidima (Bradford, 2001; Cattoir, 2008).

De forma geral, as β -lactamases do tipo OXA apresentam elevada resistência à ceftazidima, no entanto a OXA-17 apresenta-se como exceção, visto conferir maior resistência à cefotaxima e ceftriaxona, comparativamente com a ceftazidima (Bradford, 2001; Paterson e Bonomo, 2005).

A OXA-21 foi isolada de estirpes de *Acinetobacter baumannii*, sendo a primeira enzima deste tipo encontrada neste organismo que expressa outros dois tipos de β -lactamases, permanecendo pouco claro se esta é uma ESBL ou uma enzima de espectro original (Bradford, 2001).

1.2.2.5 Outros tipos de ESBL

A maioria das ESBLs deriva das β -lactamases TEM ou SHV e são por isso agrupadas nestes grupos ou em novas famílias de ESBLs, no entanto existe uma variedade de β -lactamases não-TEM e não-SHV, de classe A, mediadas por plasmídeos ou integrões (Paterson e Bonomo, 2005; Bradford, 2001).

A β -lactamase PER-1 (*Pseudomonas Extended Resistance*), descoberta em 1993 em isolados de *P. aeruginosa*, na Turquia, foi posteriormente encontrada em estirpes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *A. baumannii*, *Providencia* spp. e *Proteus mirabilis* (Paterson et al., 2003; Cattoir, 2008). Hidrolisa eficientemente penicilinas, oximino-cefalosporinas (principalmente ceftazidima), aztreonamo e é inibida pelo ácido clavulânico. Na Turquia, 46% dos isolados de *A. baumannii* e 11% dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes à ceftazidima produzem β -lactamases de tipo PER-1 (Paterson e Bonomo 2001; Paterson et al., 2003). Apresentando 86% de homologia com a PER-1, a β -lactamase PER-2, foi posteriormente isolada em estirpes de *S. typhimurium*, na Argentina (Bradford, 2001; Paterson e Bonomo, 2005; Cattoir, 2008).

A β -lactamase tipo VEB-1 (*Vietnam Extended-Spectrum Beta-lactamase*), que apresenta 38% de homologia com o tipo PER-1, foi identificada em 1996 num isolado de *E. coli* num doente vietnamita, e mais tarde encontrada em *P. aeruginosa* na Tailândia. Seis variantes de VEB-1 estão descritas até à data: VEB-2, VEB-3, VEB-4, VEB-5, VEB-6 e VEB-7 (Zong et al., 2009; www.lahey.org/studies/other.asp#table1), estando dispersas por países de vários continentes: França, Bélgica, Coreia do Sul, China, Índia, Bangladesh, Argentina e Canadá. De notar que o

gene que codifica para VEB-1 está localizado num integrão, podendo estar associado a outros genes de resistência, caso do *qnrA*, determinante plasmídico na resistência às quinolonas (Bradford, 2001; Cattoir, 2008).

As ESBLs do tipo GES-1, identificadas em 1998 num isolado de *K. pneumoniae*, na Guiana Francesa, sendo denominadas de **Guiana Extended-Spectrum β -lactamase (GES-1)**, foram posteriormente encontradas na Argentina, Brasil, Portugal e Países Baixos. São conhecidas quinze variantes de GES-1 (GES-2 a GES-16) (Mourabeck *et al.*, 2009; Kotsakis *et al.*, 2010; www.lahey.org/studies/other.asp#table1), sendo que ao contrário da maioria das ESBLs, a β -lactamase GES-1 não hidrolisa o aztreonamo, e a GES-2 hidrolisa os carbapenemos e é menos sensível aos inibidores das β -lactamases (Cattoir, 2008). São ESBLs incomuns, pois não estão relacionadas com nenhum outro tipo de β -lactamases mediadas por plasmídeo, apresentando apenas 36% de homologia com a carbenecilinase de *Proteus mirabilis* (Bradford, 2001).

A enzima SFO-1 isolada em *E. cloacae* é uma β -lactamase de classe A, apresenta capacidade de hidrolisar as cefamicinas e é inibida pelo ácido clavulânico (Bradford, 2001).

CME-1 isolada em *Chryseobacterium meningosepticum* e TLA-1 isolada em *E. coli*, no México, são duas ESBLs que apresentam alguma homologia com as enzimas PER e VEB e conferem resistência às oximino-cefalosporinas (especialmente ceftazidima) e ao aztreonamo (Bradford, 2001).

1.3 Outros tipos de β -lactamases

1.3.1 β -lactamases resistentes aos inibidores

AS β -lactamases resistentes aos inibidores não são ESBLs, no entanto são discutidas juntamente com as ESBLs pois derivam de mutações das enzimas clássicas TEM e SHV. Descoberta nos anos 90, a primeira β -lactamase resistente aos inibidores era uma variante de TEM-1 e foi denominada de “*Inhibitor-Resistant TEMs*” ou IRTs (grupo 2br de Bush) (Babic *et al.*, 2006). As IRTs caracterizam-se pela resistência aos inibidores como o ácido clavulânico e o sulbactam, e pela resistência às combinações de β -lactâmico/Inibidor β -lactamase (I β L) utilizadas frequentemente na clínica. As IRTs mantêm no entanto susceptibilidade ao tazobactam e conseqüentemente à combinação tazobactam/piperacilina (Bradford, 2001; Babic *et al.*, 2006). São geralmente encontradas em bacilos Gram negativo como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*, *C. freundii* e *E. aerogenes* (Bradford, 2001; Babic *et al.*,

2006;). Recentemente foram descobertos isolados que contêm mutações de IRTs e de ESBLs, denominados “Mutantes Complexos de TEM” (CMTs). Foram encontradas variantes de TEM com fenótipo CMT (TEM-89, TEM-50, TEM-68, TEM-109, TEM-121 e TEM-125), resistentes ao ácido clavulânico, e em menor grau às cefalosporinas de largo espectro, sugerindo o aparecimento de um novo grupo de β -lactamases que conferem um fenótipo mais complexo (Bradford, 2001).

1.3.2 β -lactamases não ESBLs

Existem algumas β -lactamases que não sendo ESBLs, partilham com estas algumas características podendo a sua expressão ocorrer simultaneamente às das ESBLs, caso das β -lactamases AmpC e carbapenemases (Jacoby e Munoz-Price, 2005; Pitout e Laupland, 2008).

As β -lactamases do tipo AmpC, normalmente de localização cromossômica, emergiram em finais dos anos 70 como um dos mediadores da resistência dos bacilos Gram negativo aos antibióticos. Caracterizam-se pela resistência à ampicilina, amoxicilina, susceptibilidade aos carbapenemos e inibição pelos I β L (ácido clavulânico e sulbactam). Apresentam capacidade de hidrolisar todos os β -lactâmicos podendo ser de mediação plasmídica e cromossômica ou indutíveis. A sua detecção em microrganismos conhecidos como não portadores de genes *bla*_{AmpC} (como *Klebsiella*, *Proteus* e *Salmonella*), corrobora a tese de que as β -lactamases AmpC podem ser transferidas entre bactérias, através de plasmídeos, coexistindo com ESBLs no mesmo organismo e dificultando a detecção destas no laboratório (Babic *et al.*, 2003; Denton, 2007).

As carbapenemases são um grupo muito versátil de β -lactamases. Estas enzimas têm a característica comum de hidrolisar, total ou parcialmente, imipenemo e meropenemo juntamente com penicilinas e em diferentes graus cefalosporinas e aztreonamo. Dividem-se em duas grandes famílias: as carbapenemases serínicas (carbapenemases_ grupo A de Ambler e oxacilinases_ grupo D de Ambler) e as metalo- β -lactamases (MBLs_ grupo B de Ambler), distinguindo-se entre si pelo mecanismo de hidrólise que apresentam. As carbapenemases serínicas são inibidas pelo ácido clavulânico (excepção feita à oxacilinase OXA-23) e as MBLs são inibidas pelo ácido etilnodiaminotetracético (EDTA). São vários os microrganismos onde podem estar presentes. Carbapenemases serínicas podem ser encontradas em *K. pneumoniae* (KPC-1, -2, -3) e *A. baumannii* (OXA-23) e as MBLs podem ser encontradas em *Enterobacter* spp. (IMI-1), *A. baumannii* (IMP-2, -5) e em *P. aeruginosa* (VIM-1, -2, -3) entre outros. Novas carbapenemases foram descobertas recentemente: a CMI-1 (primeira carbapenemase de classe C), descrita em

2006, é codificada por plasmídeos e foi encontrada em estirpes virulentas de *E. aerogenes*; a NDM-1, descrita em Nova Deli em 2009 e disseminada em *E. coli* e *K. pneumoniae* provenientes da Índia e do Paquistão, foi apelidada de “superbug” por ser resistente a todos os antibióticos intravenosos normalmente utilizados em infecções graves, e por possuir capacidade de se transferir de uma estirpe para outra completamente distinta por transferência horizontal de genes (Struelens *et al.*, 2010)

1.4 Epidemiologia das *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL

A produção de β -lactamases de espectro alargado é actualmente, uma das maiores causas de resistência às cefalosporinas de espectro alargado em *Enterobacteriaceae*. Este fenómeno teve início na Europa muito provavelmente devido ao pioneirismo no uso clínico destas drogas. Este fenómeno rapidamente se espalhou a outros continentes, sendo actualmente considerado um problema mundial e de saúde pública. A nível mundial, a incidência de produtores de ESBLs é muito difícil de determinar, principalmente devido às diferenças entre os métodos de detecção e interpretação utilizados por cada um dos países e instituições de saúde envolvidos, sendo por isso subestimada a sua ocorrência (Dalmarco *et al.*, 2006). Não obstante, em avaliações recentes, o aumento significativo de ESBLs tem sido reportada em todas as partes do mundo incluindo países ocidentais e orientais (Spanu *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2006; Puerto *et al.*, 2006; Dalmarco *et al.*, 2006).

As ESBLs estão geralmente localizadas em plasmídeos que contém genes de resistência a outras classes de antibióticos. Os microrganismos que as expressam apresentam não raras vezes um fenótipo “multidrug-resistance” (MDR), incluindo resistência a aminoglicosídeos, trimetoprim-sulfametoxazole e quinolonas (Branger *et al.*, 2005; Peirano e Pitout, 2010).

Até ao final dos anos 90 as ESBL do tipo TEM e SHV estavam amplamente distribuídas por todo o Mundo. A maioria dos surtos epidémicos ocorria em ambiente hospitalar por β -lactamases clássicas, TEM e SHV, com elevada prevalência em *K. pneumoniae* comparativamente a *E. coli* (Cantón *et al.*, 2008). Com o passar do tempo, procedimentos inadequados de controlo de infecção, conjuntamente com a pressão selectiva exercida pelos antibióticos levaram ao aparecimento de novas β -lactamases, caso da CTX-M que é actualmente a mais prevalente a nível mundial, particularmente em *E. coli*, seguida de outras espécies de *Enterobacteriaceae* como *K. pneumoniae* (Paterson *et al.*, 2003; Perez *et al.*, 2007; Mendonça *et*

al., 2007; Ho *et al.*, 2008; Endimiani e Bonomo, 2008; Cantón *et al.*, 2008). Estas β -lactamases ocupam uma posição de destaque na incidência e disseminação na Europa e noutros continentes a nível hospitalar e na comunidade (Desimoni *et al.*, 2004; Mesa *et al.*, 2006; Oteo *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2007).

Dados recentes, indicam que as infecções causadas por microrganismos produtores de ESBL estão a emergir como problema em doentes não-hospitalizados, em várias partes do mundo. Na Irlanda, em 1998, foi isolada uma *E. coli* produtora de ESBL na urina de uma idosa sem história recente de hospitalização mas submetida a tratamento múltiplo com antibióticos (Pitout *et al.*, 2005).

Um estudo realizado em Espanha em 2002 isolou *E. coli* produtora de ESBL tipo CTX-M-14 em urinas de 70 doentes sem um único episódio de admissão hospitalar, demonstrando por análise genética que o gene *bla*_{CTX-M-14} associado à sequência de inserção *ISEcp1* poderá ser responsável pela mobilização e pela alta expressão do gene codificante para a β -lactamase, levantando assim a hipótese de aquisição de estirpes produtoras de ESBL da comunidade (Pitout *et al.*, 2005).

Desde 2000, a *E. coli* emergiu como organismo responsável pela produção de ESBLs. Enquanto a *Klebsiella* spp. está geralmente envolvida em casos de infecções nosocomiais, a *E. coli* está implicada maioritariamente em infecções comunitárias (Pitout, 2010). As *Enterobacteriaceae*, colonizadoras do tracto intestinal, apresentam um enorme potencial de disseminação a outros ambientes para além do hospital, como por exemplo à comunidade e ao meio ambiente (Mesa *et al.*, 2006; Rodríguez-Baño e Navarro, 2008).

A identificação de estirpes produtoras de ESBLs do tipo CTX-M, relacionadas com ITU na comunidade, surgiu principalmente após o ano de 2000 (Babic *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2007).

Em estudos realizados na Argentina sobre colonização fecal por *K. pneumoniae* ESBLs_{pos} em doentes internados em Unidades Neonatais de Cuidados Intensivos, 54.3% da totalidade das amostras estudadas expressavam uma β -lactamase compatível com o tipo CTX-M (Desimoni *et al.*, 2004).

A β -lactamase tipo CTX-M-15, descrita pela primeira vez na Índia em 2001, é actualmente a mais prevalente em todo o Mundo (Figura 10) (Oteo *et al.*, 2006; Cantón *et al.*, 2008). Em Portugal, Espanha, Inglaterra, França, Itália, Áustria, Tunísia, Coreia do Sul e Canadá, registou-se a disseminação de um clone de *E. coli* produtora de CTX-M-15 na comunidade com consequente passagem para o meio hospitalar e lares de idosos (Govinden *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2008; Peirano e Pitout, 2009).

No continente Americano, a presença de β -lactamases CTX-M-14 (Canadá), CTX-M-2 (Argentina Brasil) e CTX-M-12 (Colômbia), foram descritas em vários trabalhos (Govinden *et al.*,

2007). No Japão, a investigação molecular de 1397 isolados de bacilos Gram negativo revelou a presença de β -lactamases pertencentes ao grupo CTX-M-1, -2 e -9 (Pitout, 2010).

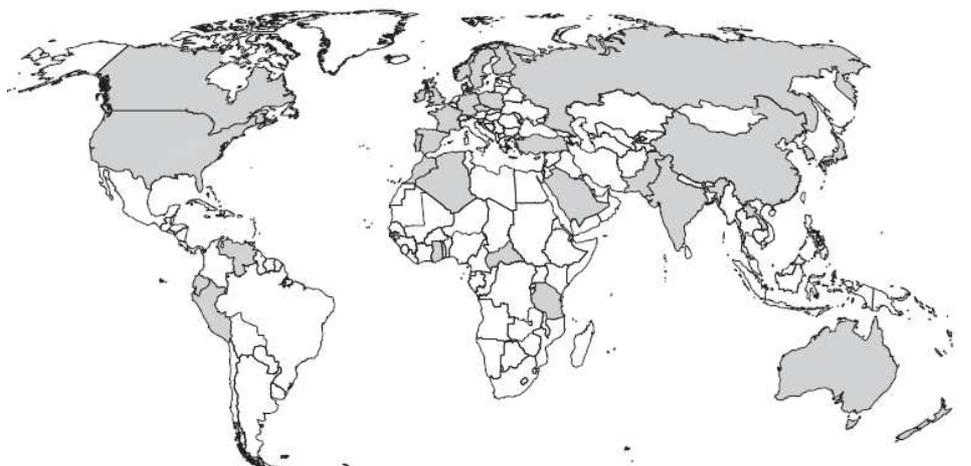


Figura 10. Distribuição mundial de *Escherichia coli* produtora de β -lactamase CTX-M-15*

* Sombreado cinza; Fonte: Pitout, 2010

Em Taiwan as ESBLs mais prevalentes são as de tipo CTX-M-3, -9, -14, -15, -17, -19 e -38, e na Coreia e na China, bem como no Vietname, a β -Lactamase CTX-M-14 é frequentemente observada em *K. pneumoniae* e *E. coli*, bem como em *Shigella sonnei* (espécies implicadas em surtos urinários e gastrointestinais) (Pitout *et al.*, 2005; Govinden *et al.*, 2007; Ko *et al.*, 2008).

Alguns dos relatórios descrevem similaridade entre os clones produtores de CTX-M-15 especialmente naqueles provenientes da Rússia, Itália, Espanha, Portugal, França, Suécia, Reino Unido e Canadá (Pitout, 2010).

Outras variantes de CTX-M foram amplificadas localmente, caso das CTX-M-9 e -10 na Espanha, CTX-M-14 em Portugal e Espanha, CTX-M-3 nos países orientais e CTX-M-5 na Rússia (Coque *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2009). Na Polónia, entre 2000 e 2007, Dzierzanowska *et al.* (2010) encontraram 64 isolados de *K. pneumoniae* que expressavam simultaneamente genes para duas ou três ESBLs diferentes ($bla_{\text{CTX-M-3}}$ com $bla_{\text{TEM-48}}$ e $bla_{\text{SHV-5}}$; $bla_{\text{CTX-M-15}}$ com $bla_{\text{TEM-48}}$ ou $bla_{\text{TEM-47}}$). Em 2006 em Nova Iorque, a análise molecular de uma *K. pneumoniae* isolada numa amostra de expectoração, revelou a produção de oito β -lactamases diferentes na mesma estirpe (Moland, 2007).

A maioria das espécies produtoras de ESBLs do tipo CTX-M expressa normalmente resistência associada a outros antibióticos não β -lactâmicos tais como aminoglicosídeos, tetraciclina e quinolonas (Branger, 2005; Sánchez *et al.*, 2006; Denton, 2007; Mendonça *et al.*, 2009), e provêm de indivíduos hospitalizados ou residentes em unidades de prestação de cuidados de saúde (Oteo *et al.*, 2006).

No entanto, a utilização excessiva de antibióticos β -lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos e glicopeptídeos na indústria agrícola, pecuária e aquacultura, seja com fins terapêuticos, profiláticos ou como promotores de crescimento, contribuiu para o aparecimento de β -lactamases em animais e no meio ambiente. Os animais constituem importantes reservatórios de genes de resistência, particularmente de ESBL, contribuindo para a entrada e disseminação destes determinantes genéticos na cadeia alimentar e no meio ambiente (Paterson e Bonomo, 2005; Mesa *et al.*, 2006; Mendonça *et al.*, 2007; Carattoli, 2008; Carattoli, 2009).

1.5 Origem das ESBL: Hospital, Comunidade e Meio Ambiente

1.5.1 Factores de risco

Alguns estudos têm avaliado os factores de risco de colonização e/ou infecção por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs. Indivíduos com maior susceptibilidade de colonização e/ou infecção por bactérias produtoras de ESBLs, apresentam geralmente os seguintes factores de risco: a presença de dispositivos médicos e técnicas invasivas (como cateteres arteriais, venosos, urinários, de drenagem biliar e tubos endotraqueais, nasogástricos, de gastrostomia e jejunostomia); antibioterapia múltipla particularmente por oximino- β -lactâmicos; hospitalizações recentes; períodos prolongados de hospitalização (principalmente em unidades de cuidados intensivos); estadia em unidades geriátricas; ventilação mecânica; úlceras de decúbito; administração de alimentação parental; doenças malignas e colonização gastrointestinal (Pitout *et al.*, 1997; Colodner, 2005; Pitout *et al.*, 2005; Denton, 2007; Coque *et al.*, 2008; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008; Rodríguez-Baño e Navarro, 2008; Castro *et al.*, 2009). Em pediatria e/ou neonatologia factores como baixo peso à nascença, presença de cateter venoso central, sépsis precoce e prematuridade são factores de risco para infecção por enterobactérias produtoras de ESBL (Jacoby e Munoz-Price, 2005; Paterson e Bonomo, 2005; Arnoni *et al.*, 2007; Endimiani e Bonomo, 2008; Tragante *et al.*, 2008).

Um estudo realizado por Rodríguez-Baño *et al.* (2004), em Sevilha, Espanha, conclui que a diabetes mellitus, o uso preferencial de quinolonas, as infecções do tracto urinário recorrentes, admissões hospitalares anteriores, género feminino e idade superior a 65 anos eram factores de risco independentes para as infecções por *Escherichia coli* produtora de ESBL, em doentes não hospitalizados.

A utilização excessiva de antibióticos é um dos factores de risco mais relevantes, estando já estudada a sua relação com a aquisição de estirpes produtoras de ESBL quer em doentes hospitalizados, quer em residentes em unidades de cuidados de saúde (Friedman *et al.*, 2002; Paterson e Bonomo, 2005; Arnoni *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2008). Os residentes em lares de idosos, apresentam um risco adicional de infecção por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, por causa da utilização indiscriminada de antibióticos de administração oral (ciprofloxacina e/ou trimetoprim-sulfametoxazol) e pela exposição à flora microbiana de outros residentes, especialmente os incontinentes, que requerem contacto frequente com o pessoal de saúde (Rodríguez-Baño, 2004; Dalmarco, 2006). É importante referir que o limiar entre comunidade e hospital se encontra cada vez mais ténue, pois muitos dos indivíduos com estados de saúde precários e vulneráveis à infecção encontram-se internados em instituições não hospitalares, levando a que muitas infecções hospitalares só se manifestem após o regresso do doente à comunidade, daí a dificuldade em catalogar como nosocomiais ou comunitárias muitas das infecções existentes, optando-se ultimamente pelo termo generalista “infecções associadas aos cuidados de saúde”.

1.5.2 Medidas de Controlo

A ampla e rápida distribuição geográfica das ESBLs é uma ameaça com que os hospitais do mundo inteiro se deparam desde o início dos anos 80. As formas usuais de transmissão incluem a disseminação clonal de estirpes produtoras de ESBLs ou a disseminação de plasmídeos (Perci, 1994; Falagas e Karageorgopoulos, 2009) que contém genes para a produção de ESBL entre diferentes géneros de enterobactérias. A propagação e expressão de genes que codificam para ESBL são facilitadas pela associação com sequências de inserção (Medeiros, 1984; Coque *et al.*, 2008; Carattoli, 2009).

A implementação de medidas de controlo para evitar a disseminação de estirpes produtoras de ESBLs assenta sobretudo em quatro ramos: a vigilância microbiológica, a racionalização do consumo de antibióticos, a vigilância epidemiológica e as medidas de controlo de infecção (Machado Sequeira, 2004). A confirmação e interpretação do fenótipo de resistência bacteriano, a vigilância de áreas de risco como as unidades de cuidados intensivos e unidades de cuidados de saúde na comunidade, a restrição e/ou redução e a reeducação na prescrição de antibióticos (especialmente oximino- β -lactâmicos) e a implementação de medidas eficazes de controlo de infecção em unidades de cuidados de saúde, são algumas das medidas

que se devem observar na luta contra as *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs (Paterson e Bonomo, 2005; Dalmarco, 2006).

As principais medidas a implementar nas instituições de prestação de cuidados de saúde e nos hospitais, bem como em centros de reabilitação e casas de repouso (lares de idosos), de modo a minimizar a colonização e/ou infecção por bactérias produtoras de ESBLs são: (i) racionalização da prescrição e consumo de antibióticos, principalmente em bacteriúrias assintomáticas e em colonização do tracto respiratório; (ii) minimizar a transferência de doentes colonizados e/ou infectados entre o hospital e a comunidade; (iii) campanha de higienização das mãos; (iv) utilização de barreiras de protecção pelos prestadores de cuidados de saúde; (v) avaliação da presença de fontes de contaminação ambiental; (vi) realização de uma zaragatoa rectal a todos os doentes colonizados mas não infectados com produtores de ESBL e (vii) implementação da regra de isolamento dos doentes colonizados/infectados (Machado Sequeira, 2004; Rodríguez-Baño *et al.*, 2004; Paterson e Bonomo, 2005; Rodríguez-Baño e Navarro, 2008; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008; Coque *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2009).

A educação e sensibilização dos prestadores de cuidados de saúde, quer a nível hospitalar, quer na comunidade, para a problemática das ESBL, é fundamental para minimizar a colonização e/ou infecção por bactérias produtoras de ESBL e consequente disseminação entre os residentes e outros ambientes (Machado Sequeira, 2004; Kuo *et al.*, 2007; Gonçalves, 2008).

1.5.3 Ambiente Hospitalar vs Comunidade vs Meio ambiente

A problemática das *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, passou nos últimos anos a abranger não só as infecções nosocomiais, mas também as infecções adquiridas na comunidade, representando actualmente um problema de saúde pública mundial (Babic *et al.*, 2006).

Continua ainda por esclarecer, a origem das estirpes bacterianas produtoras de ESBLs. Vários relatos apontam para o meio hospitalar, outros para a comunidade e mais recentemente alguns estudos valorizam o meio ambiente como uma fonte de microrganismos produtores de ESBLs (Pitout *et al.*, 2005; Perez *et al.*, 2007). No entanto a elevada incidência de estirpes produtoras de ESBL na comunidade, inclusive em indivíduos saudáveis sem contacto prévio com o ambiente hospitalar, enfatiza a importância da comunidade na disseminação destas estirpes, particularmente ao ambiente hospitalar (Mendonça *et al.*, 2007).

A entrada no ambiente hospitalar de estirpes produtoras de ESBL ocorre aquando da admissão hospitalar de indivíduos provenientes da comunidade e colonizados com as referidas

estirpes. Durante a hospitalização, os genes que conferem resistência aos oximo- β -lactâmicos podem ser transferidos para bactérias susceptíveis através de plasmídeos conjugativos e/ou transposições (Bradford, 2001; Mendonça *et al.*, 2007; Govinden *et al.*, 2007; Gonçalves, 2008). A disseminação das bactérias produtoras de ESBL a outros indivíduos hospitalizados ocorre através do contacto doente-doente, através das mãos/pele colonizada dos prestadores de cuidados de saúde ou pelo uso de materiais contaminados de uso comum (sabão, banheiras de bebés, cremes hidratantes) (Paterson e Bonomo, 2005).

A disseminação em residências geriátricas ocorre normalmente aquando do retorno ao lar de um idoso colonizado com estirpes resistentes aos antibióticos com hospitalização recente, podendo inclusive dar origem a surtos infecciosos por bactérias multiresistentes aos antibióticos (Paterson e Bonomo, 2005; Oteo *et al.*, 2006; Falagas e Karageorgopoulos, 2009).

O tracto intestinal, reservatório de bactérias produtoras de ESBL, permite a rápida difusão destes agentes a outros ambientes e a transferência das ESBL a outras espécies e/ou géneros bacterianos. A transmissão de organismos ESBLs de origem animal para os seres humanos através da cadeia alimentar ou a transmissão pela água contaminada, também contribui para a disseminação de ESBLs na comunidade (Pitout *et al.*, 2005; Mendonça *et al.*, 2007).

O aumento significativo da incidência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs, em indivíduos da comunidade está patente em vários estudos. Em Barcelona, a incidência de enterobactérias colonizadoras do tracto intestinal produtoras de ESBL, em doentes de ambulatório, passou de 2.1% no período de Fevereiro a Maio de 2001, para 3.8% entre Abril e Junho de 2002 e aumentou para 7.5% em Outubro do mesmo ano (Rodríguez-Baño e Navarro, 2008). Em Israel, após a análise de 241 indivíduos aquando da admissão hospitalar, 11% apresentavam colonização fecal por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs (Rodríguez-Baño e Navarro, 2008). Em Buenos Aires, Argentina, numa maternidade, foram encontradas 52.6% de estirpes produtoras de ESBLs colonizadoras do tracto intestinal de recém-nascidos (Desimoni *et al.*, 2004).

Vários relatórios têm surgido sobre infecção e/ou colonização por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL com foco em doentes hospitalizados ou residentes em unidades geriátricas. Contudo, estes microrganismos também têm sido encontrados em animais e em indivíduos sem contacto prévio com o hospital. Um estudo realizado em Barcelona pesquisou estirpes produtoras de ESBLs em diferentes ambientes: infecções humanas, portadores fecais no contexto de surtos gastrointestinais, alimentos crus e processados, empresas de agro-pecuária para a produção de alimentos e esgoto humano. As prevalências encontradas foram: 0.4% nos alimentos, 1.9% nas infecções humanas; 6.6% nos portadores fecais; 20% a 100% nas quintas

agro-pecuária e 100% nos esgotos humanos. De notar neste estudo que, em 5 amostras de esgoto bruto afluyente urbano, todas expressavam ESBLs, sendo detectadas 32 estirpes diferentes, sugerindo que a comunidade age como reservatório destas estirpes. A *E. coli* foi a enterobactéria mais isolada, no entanto foi reportada pela primeira vez uma *K. pneumoniae* em alimentos processados (Mesa *et al.*, 2006).

A presença de produtores de ESBLs em animais, inicialmente sem evidência directa na transmissão de patogéneos zoonóticos para os humanos através da cadeia alimentar, ganhou interesse nos últimos anos, por causa da detecção em animais de β -lactamases relevantes na medicina humana, caso da CTX-M-15 detectada em *E. coli* isolada de cães portugueses e da CTX-M-14 detectada no Japão, Reino Unido e Espanha em coelhos, galinhas, cães e porcos (Carattoli, 2008).

O aumento da incidência de indivíduos portadores de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL na comunidade aumenta o risco da transmissão da resistência bacteriana a outras espécies e disseminação ao meio circundante tal como hospitais, residências geriátricas, águas marítimas e pluviais e animais (Mesa *et al.*, 2006; Oteo *et al.*, 2006).

Medidas importantes de prevenção da infecção nosocomial devem ser implementadas nas unidades hospitalares, com incidência na detecção e isolamento dos indivíduos colonizados com estirpes produtoras de ESBLs na admissão hospitalar, importante passo na selecção da terapêutica antimicrobiana (Desimoni *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2007).

1.6 Detecção Laboratorial de ESBLs

O laboratório clínico age como um sistema de alarme precoce, alertando a comunidade médica para a presença de um novo mecanismo de resistência em bactérias clinicamente importantes. A detecção de bactérias produtoras de ESBLs no laboratório é um requisito essencial no tratamento dos doentes, no controlo e prevenção da infecção bem como no acompanhamento em programas de vigilância destes microrganismos (Pitout *et al.*, 2005).

A detecção laboratorial das ESBLs é muito problemática, devido à baixa expressão em alguns casos, pela coexistência de outros mecanismos de resistência (AmpC e alteração de porinas) ou pela alta percentagem de ESBLs sensíveis a cefotaxima e ceftriaxona *in vitro*, mas com falência terapêutica *in vivo* (Sanders *et al.*, 1996; Sousa, 2006). Também nos deparamos com a prática de redução de custos, com o desconhecimento de *guidelines* pertinentes de instituições como o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Pitout *et al.*, 2005) e com a falta de sensibilização para a problemática das ESBLs, podendo tudo isto levar a terapêuticas

inadequadas com efeitos adversos tais como a falência terapêutica ou a selecção de clones multiresistentes (Bradford, 2001; Sousa Junior, 2004; Colodner, 2005; Paterson e Bonomo, 2005).

Os métodos laboratoriais utilizados na detecção de estirpes produtoras de ESBLs variam de país para país, bem como a sua interpretação (*breakpoints* recomendados) (Kahlmeter, 2008). Os métodos de detecção de produtores de ESBLs podem ser divididos em dois grupos: métodos fenotípicos, baseados em técnicas não moleculares que detectam a afinidade das enzimas ESBLs para hidrolisar diferentes oximino- β -lactâmicos e a sua inibição pelo ácido clavulânico; métodos genotípicos que, através de técnicas moleculares, detectam e caracterizam os genes responsáveis pela produção dessas ESBLs (Bradford, 2001; Sousa Junior, 2004; Pitout *et al.*, 2005; Paterson e Bonomo, 2005; Pitout e Laupland, 2008).

Segundo o CLSI, estirpes de *K. pneumoniae* e *E. coli* apresentando no método de difusão de agar halos de sensibilidade inferiores a 22mm, 27mm, 27mm, 25mm e 17mm, para ceftazidima (CAZ), aztreonamo (ATM), cefotaxima (CTX), ceftriaxona (CRO) e cefpodoxima (CPD) respectivamente, são sugestivas de produzirem ESBLs (Sousa, 2006; Paterson e Bonomo, 2006; CLSI, 2009), bem como as que em testes de diluição apresentem CMI ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ para CAZ, ATM, CTX ou CRO e CMI ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ para CPD (Schwaber *et al.*, 2004; CLSI, 2009). A utilização de ceftriaxona (sensível às enzimas CTX-M) e de ceftazidima (excelente substrato para as variantes TEM e SHV) é recomendado. A utilização da cefoxitina nestes testes também pode ser válida, uma vez que permite distinguir as estirpes produtoras de ESBL (sensíveis) das que expressam uma β -lactamase plasmídica do tipo AmpC (resistentes).

A confirmação da presença de ESBL pode ser feita através do teste de adição de ácido clavulânico a discos de oximino- β -lactâmicos (Figura 11)

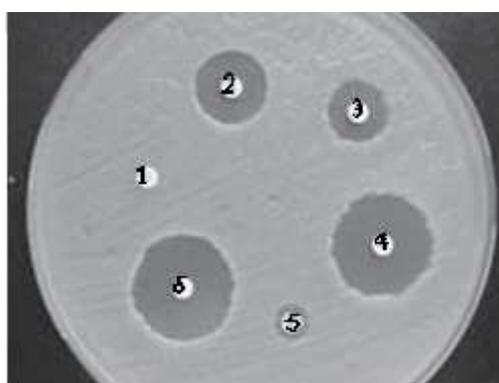


Figura 11. Teste de adição de ácido clavulânico

1= cefpodoxima; 2= cefpodoxima+ácido clavulânico; 3= ceftazidima; 4= ceftazidima+ácido clavulânico;
5= cefotaxima; 6= cefotaxima+ácido clavulânico; Fonte: Pereira *et al.*, 2003

Utilizando discos mistos, cefotaxima e/ou ceftazidima (30 µg) com e sem ácido clavulânico (10 µg), um aumento do diâmetro dos halos de inibição ≥ 5 mm com inibidor, em comparação com os halos dos discos de cefalosporina sem adição de ácido clavulânico, comprova presuntivamente a produção de ESBLs (Figura 11) (Bradford, 2001; Steward *et al.*, 2001; CLSI, 2009).

O teste de sinergismo de duplo-disco, consiste na detecção de sinergia entre discos de β -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima e/ou ceftriaxona e aztreonamo) e discos de amoxicilina/ácido clavulânico (20 µg/10 µg respectivamente) (AMC), colocados a 30 mm de distância centro a centro, numa placa de agar Muller Hinton inoculada com uma suspensão 0.5 na escala de McFarland, da estirpe a estudar. Uma extensão clara do limite da zona de inibição dos oximino- β -lactâmicos e/ou aztreonamo em direcção ao disco AMC é interpretada como sinergia positiva, indicando a presença de uma ESBL. A avaliação de estirpes produtoras de ESBL com este teste, revelou taxas de sensibilidade de 79% a 97% e especificidade de 94% a 100% (Schwaber *et al.*, 2004; Paterson and Bonomo, 2005). Em isolados com suspeita de produção de ESBL mas com resultado negativo neste teste, recomenda-se a alteração das distâncias entre discos para 20 mm ou 40 mm (Sousa Junior, 2004). É um teste de fácil execução no entanto de interpretação subjectiva, podendo a sua sensibilidade estar reduzida quando a ESBL presente apresentar baixa actividade (Paterson e Bonomo, 2005).

O método quantitativo E-test[®] permite a sua utilização conjuntamente com métodos de determinação de CMI já implementados na rotina laboratorial (Nijssen *et al.*, 2004). As tiras de E-test[®] ESBL (AB Biodisk, Solna, Sweden) consistem em tiras de plástico com dois lados, impregnadas com antibióticos (Baker *et al.*, 1991). Um dos lados contém um gradiente de ceftazidima (TZ_CMI entre 0.5 a 32 µg/ml) e o outro ceftazidima+ácido clavulânico (TZL_0.064 a 4 µg/ml). Tiras similares contendo cefotaxima (CT_ 0.25 a 16 µg/ml) e cefotaxima mais ácido clavulânico (CTL_ 0.016 a 1.0 µg/ml) também estão disponíveis (Perez *et al.*, 2007).

A bactéria será considerada produtora de ESBL (Figura 12) quando a leitura apresentar uma diminuição ≥ 3 diluições (ou ≥ 8 µg/ml) na CMI da cefalosporina/ácido clavulânico em relação à CMI da cefalosporina sozinha (Babic *et al.*, 2006). Este teste apresenta uma sensibilidade entre 87 e 100% e uma especificidade entre 95 e 100%, dependendo ambas do *ratio* (razão) das CMIs da cefalosporina versus cefalosporina/ácido clavulânico utilizado (Pitout e Laupland, 2008). A utilização de tiras de cefotaxima e de ceftazidima melhora a capacidade de detecção de ESBL tipo CTX-M, que têm a cefotaxima como substrato preferencial (Bradford, 2001; Pereira *et al.*, 2003; Truppia *et al.*, 2005; Paterson e Bonomo, 2005; Treviño *et al.*, 2009).

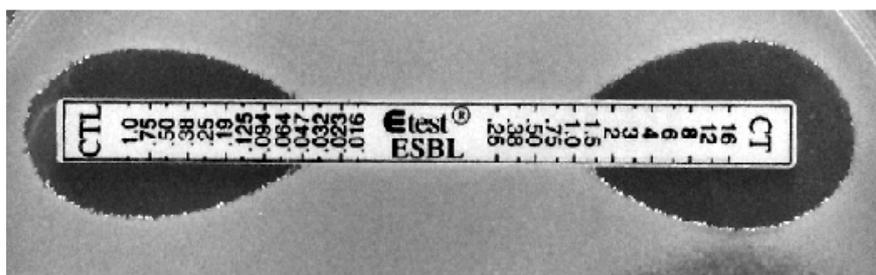


Figura 12. Tira Etest® ESBL positiva

CT: cefotaxima; CTL: cefotaxima+ácido clavulânico; CMI CT/CTL = $1.5/0.047 = 32 \mu\text{g/ml}$; Fonte: AB BIODISK

O teste confirmatório VITEK®2 ESBL (BioMérieux, Marcy L'Étoile, França) consiste em painéis de microdiluição ou “cartas” (AST-N060 ou AST-N151) de seis poços contendo cefepima, cefotaxima e ceftazidima em concentrações individuais de 1.0, 0.5 e 0.5 $\mu\text{g/ml}$ e em associação com 10, 4 e 4 $\mu\text{g/ml}$ de ácido clavulânico respectivamente. O inoculo e a carta ESBL associada são introduzidos no sistema VITEK®2 Compact sem necessidade de qualquer outro manuseamento. No equipamento, as cartas após inoculação por vácuo e selagem automática são colocadas num leitor/incubador. Leituras cinéticas são feitas de 15 em 15 minutos, para otimização do tempo de resposta média que varia entre 6 a 8 horas (Spanu *et al.*, 2006). Uma redução predeterminada do crescimento bacteriano nos poços contendo ácido clavulânico, e a sua comparação com os poços contendo a droga individual, é um indicador da presença de ESBL (Sanders *et al.*, 1996). A utilização simultânea do *software Advanced Expert System™* (AES) assegura a confiança dos resultados (Livermore *et al.*, 2002; Treviño *et al.*, 2009). Este sistema categoriza as β -lactamases baseando-se no padrão fenotípico de susceptibilidade das *Enterobacteriaceae* a vários β -lactâmicos, permite a validação automática de resultados através da verificação da consistência entre a identificação e o antibiograma e a orientação para a detecção do mecanismo de resistência e de fenótipos irregulares (Livermore *et al.*, 2002; Paterson e Bonomo, 2005). A introdução de sistemas automáticos na caracterização fenotípica de ESBLs simplificou e agilizou a tarefa, bem como elevou o nível de sensibilidade e especificidade para valores entre 95 e 100% (Ferreira, 2007).

Num estudo de avaliação do teste VITEK®2 ESBL como método de detecção de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBL realizado por Spanu *et al.*, em 2006, a classificação fornecida pelo VITEK 2 ESBL foi concordante com o método molecular em 99.3% dos 1129 isolados avaliados, demonstrando uma sensibilidade de 98.1% (valor preditivo positivo de 99.3%) e uma especificidade de 99.7% (valor preditivo negativo de 99.3%). A avaliação da

precisão do software VITEK AES na identificação e susceptibilidade de isolados produtores de ESBL foi de 98.3% e 98% respectivamente (Nakasone *et al.*, 2007).

A detecção do ponto isoeléctrico (pI) também pode ser utilizada na detecção de ESBLs, pois as ESBLs tipo TEM têm pI entre 5,2-6,5; as derivadas de SHV têm pI 7,0-8,2 e as CTX-M têm pI entre 7,6-9,0 (Sousa, 2006; Gonçalves, 2008).

Em estudos epidemiológicos efectuados a nível hospitalar e comunitário, a identificação fenotípica presuntiva é complementada com a caracterização genotípica para a identificação do tipo de ESBL presente. *Polimerase Chain Reaction* (PCR), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e técnica de *Microarray* são métodos moleculares disponíveis para a detecção genotípica e caracterização das variantes ESBLs presentes (Bradford, 2001; Sousa, 2006; Sousa Junior, 2004; Pitout e Laupland, 2008).

1.6.1 Significado clínico

A falência da terapêutica com antibióticos β -lactâmicos em infecções causadas por microrganismos produtores de ESBLs é recorrente. Por isso, o CLSI recomenda que todos os isolados com teste ESBL confirmatório positivo sejam reportados como resistentes (R) a todas as penicilinas, cefalosporinas (excepto cefamicinas, cefoxitina e cefotetam) e aztreonamo independentemente dos resultados de sensibilidade (sensível [S] ou intermédio [I]) obtidos. Os resultados das combinações β -lactâmico/I β L não são afectados por esta regra, sendo reportados de acordo com o obtido no teste de susceptibilidade (Perez *et al.*, 2007). Enquanto algumas estirpes são 100% resistentes aos β -lactâmicos de espectro alargado, outras há que apresentam fenótipo I ou S para alguns destes antibióticos (Bradford, 2001).

O aumento da prevalência a nível mundial, a sua localização em plasmídeos que facilitam a sua transmissibilidade e a mortalidade/morbilidade inerente às infecções por microrganismos ESBLpos, são motivos a favor da sua detecção no laboratório de microbiologia (Colodner, 2005; Perez *et al.*, 2007). Por isso a utilização de cefalosporinas de 3ª geração, particularmente cefotaxima e ceftazidima, deve ser encarada com algum cuidado, já que as opções terapêuticas de opção se resumem praticamente a carbapenemos e/ou terapia associada com inibidores das β -lactamases.

O diagnóstico laboratorial deve ser rigoroso e se possível deve utilizar-se mais do que uma metodologia de detecção de ESBL, pois muitas estirpes apresentam susceptibilidade reduzida às oximinicefalosporinas, que não sendo considerada uma resistência sugerem a presença de ESBLs.

A prescrição de um β -lactâmico a doentes com infecções por ESBL promove não só a falência terapêutica, mas também a diminuição da flora bacteriana normal em doentes portadores de ESBLs, levando ao aparecimento espontâneo de uma ESBL “adormecida”, fazendo com que o doente deixe de responder ao tratamento instituído e causando uma recidiva da infecção (Sousa Júnior, 2004; Araújo *et al.*, 2007).

A detecção de ESBL deve fazer parte da rotina diária de todos os laboratórios de microbiologia, quer hospitalares quer comunitários, e deve ser aplicada a todos os isolados (Coque *et al.*, 2008). Tendo em conta que a disseminação de ESBL tem muita importância no triângulo hospital/lar de idosos/meio ambiente, todos os isolados de *Enterobacteriaceae* devem ser testados para a presença de ESBL (Pereira *et al.*, 2003; Pitout *et al.*, 2005).

Os doentes pediátricos revestem-se de uma enorme importância na problemática das ESBLs pela indisponibilidade de utilização pediátrica de alguns antibióticos, pelo potencial de transmissão dinâmica de ESBL em ambiente de creche bem como pela colonização ao longo da sua vida, aumentando assim a carga de bactérias produtoras de ESBL na sociedade (Endimiani e Bonomo, 2008).

1.6.2 Terapêutica

As infecções provocadas por microrganismos produtores de ESBLs requerem uma escolha minuciosa dos antibióticos aplicados no seu tratamento. A susceptibilidade *in vitro*, os resultados dos seus efeitos em animais, os estudos observacionais e a análise de grupos randomizados devem ser tidos em conta antes da escolha de um antibiótico. A colonização por ESBLs não requer tratamento antibiótico, mas caso evolua para infecção é importante estabelecer uma terapêutica adequada (Rodríguez-Baño *et al.*, 2004).

As opções terapêuticas para o tratamento de infecções por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs assentam nos: carbapenemos, cefamicinas, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tigeciclina e poliximinas (Paterson e Bonomo, 2005; Dalmarco, 2006 Falagas e Karageorgopoulos, 2009). A utilização de β -lactâmicos em associação com inibidores de β -lactamases é também outra alternativa para o tratamento de infecções por enterobactérias produtoras de ESBLs (Spanu *et al.*, 2002; Marín e Gudiol, 2003; Paterson e Bonomo, 2005; Denton, 2007).

No entanto, vários estudos realizados têm demonstrado falência de tratamento com vários antibióticos. Um estudo comparando a cefepima com o imipenemo, mostrou uma resposta clínica em 100% dos doentes tratados com imipenemo e em apenas 64% dos doentes

tratados com cefepima (Paterson e Bonomo, 2005). Doentes infectados com produtores de ESBL apresentam rácios (*ratios*) de mortalidade entre 42% e 100% quando tratados com cefalosporinas de 3ª geração (Colodner, 2005). Em Portugal, na região do Minho, Fernandes *et al.*, encontraram altas taxas de resistências em produtores de ESBLs para cefepima (98.9%) e para quinolonas (85.4%), com maior expressão em membros da família CTX-M (98.1%) do que TEM e SHV (80.8% e 72.1% respectivamente). No entanto verificaram-se altas sensibilidades para carbapenemos e amicacina (100% e 99.5% respectivamente) (Fernandes *et al.*, 2009).

As cefamicinas (incluindo cefoxitina e cefotetam) são estáveis à hidrólise por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL. No entanto, existe uma certa relutância na utilização destes agentes devido à relativa facilidade que alguns isolados apresentam de diminuir a expressão de proteínas de membrana externa, criando resistência a estes agentes durante a terapia (Pitout, 2010).

A escolha do antibiótico depende igualmente da patologia a tratar. Infecções do tracto urinário têm como primeira escolha as quinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina) e como 2ª escolha a associação amoxicilina/ácido clavulânico (Denton, 2007). Os carbapenemos são o antibiótico de primeira escolha em septicemias, pneumonias adquiridas no hospital e infecções intra-abdominais (Paterson e Bonomo, 2005). Contudo, os carbapenemos (imipenemo, meropenemo, doripenemo e ertapenemo) apresentam algumas desvantagens: custo elevado, administração via parentérica e um espectro de acção alargado que pode promover infecções por fungos e/ou bactérias com potencial para expressão de carbapenemases, tais como as KPC e as metalo- β -lactamases, comprometendo a terapêutica a longo prazo com este antibiótico (Paterson e Bonomo 2005; Augusti *et al.*, 2007; Hoban *et al.*, 2010; Pitout, 2010).

Agentes como a nitrofurantoína e fosfomicina mostram boa actividade *in vitro* contra bactérias produtoras de ESBL e são opções para o tratamento de infecções do trato urinário não complicadas devidas a estas bactérias multirresistentes (Pitout, 2010).

Por estas evidências, torna-se claro que os agentes envolvidos no controlo de infecção devem adoptar rapidamente medidas que previnam a disseminação deste fenótipo de resistência (Pujol e Peña, 2003; Denton, 2007; Peirano e Pitout, 2010)

OBJECTIVOS

Este estudo tem como objectivo determinar a frequência de bacilos Gram negativo da família *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs, isolados de amostras clínicas hospitalares e comunitárias, provenientes dos vários serviços do Centro Hospitalar Póvoa de Varzim/Vila do Conde bem como analisar o respectivo perfil de susceptibilidade antimicrobiano.

São objectivos específicos deste trabalho:

- Determinar a taxa de prevalência de produção de ESBLs em diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae*;
- Analisar o perfil de susceptibilidade antimicrobiano das estirpes produtoras de ESBLs;
- Comparar o perfil global de sensibilidade dos isolados produtores de ESBL com o dos isolados não produtores;
- Determinar a frequência de microrganismos produtores de ESBLs, quanto à proveniência (internamento/ambatório), tipo de amostra biológica, género e faixa etária dos pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de recolha

O estudo foi realizado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Póvoa Varzim/Vila Conde (CHPVVC). O CHPVVC integra duas unidades de prestação de cuidados de saúde que distam aproximadamente 3Km, uma na cidade da Póvoa de Varzim e outra em Vila do Conde. Tem como hospitais de referência, o Hospital Pedro Hispano, o Hospital de São João, o Instituto Português de Oncologia, o Hospital Magalhães Lemos e o Hospital Geral de Santo António. O CHPVVC, em 2009 apresentava uma lotação de 138 camas, das quais 95 na Unidade da Póvoa de Varzim e 45 na Unidade de Vila do Conde.

O CHPVVC serve uma população de cerca de 175 000 habitantes dos referidos municípios e limítrofes. O Centro Hospitalar apresenta várias valências de internamento: Medicina Interna, Cirurgia Geral, Ortopedia, Pediatria/Neonatologia e Obstetrícia/Ginecologia. O serviço de urgência da Unidade da Póvoa é um serviço de urgência médico-cirúrgica, abrangendo também especialidades como Anestesia, Radiologia, Patologia Clínica e Imuno-hemoterapia, em funcionamento 24 horas por dia, todos os dias da semana.

O Serviço de Patologia Clínica é composto pelos seguintes sectores: Hematologia e Hemostase, Imunoquímica (Bióquímica geral, Imunologia, Alergologia), Serologia Infecciosa, Microbiologia geral e Micobacteriologia. Funciona 24 horas por dia e dá apoio ao internamento, consulta externa, bloco operatório, cirurgia de ambulatório, hospital de dia e serviço de urgência. Responde ainda a pedidos da Consulta Aberta de Vila do Conde bem como de outros

subsistemas de saúde (p. ex: ARS, ADSE, SAMS). No período de Janeiro de 2009 a Março de 2010 o laboratório de patologia recebeu 81 247 requisições de análises, das quais 13 023 eram pedidos de exame bacteriológico. Amostras de urina, expectoração e sangue estão entre os principais produtos biológicos enviados para análise microbiológica.

O laboratório é composto por um quadro de pessoal multidisciplinar do qual fazem parte, patologistas clínicos, técnicos superiores de saúde, técnicos de análises clínicas, assistentes técnicos e assistentes operacionais.

3.2 Amostra

Foi incluída neste estudo toda e qualquer amostra clínica, proveniente dos vários serviços hospitalares, que deu entrada no serviço de microbiologia entre Janeiro de 2009 e Março de 2010, e na qual foi utilizada a carta de identificação de Gram negativo (GN) (ANEXO I) e a respectiva carta de sensibilidade aos antibióticos, AST-N060 (ANEXO II) ou AST-N151 (ANEXO III) (BioMérieux®, Marcy L'Étoile, França) utilizadas em conjunto com o sistema automático VITEK®2 Compact e o *software* VITEK®2 AES (BioMérieux®, Marcy L'Étoile, França).

A delimitação temporal da amostragem prende-se com o facto de que anteriormente a Janeiro de 2009 a escolha da carta AST-N60 para determinar o perfil de sensibilidade e a detecção da produção de ESBLs era limitada a amostras hospitalares, excluindo-se os isolados provenientes de doentes pediátricos e de amostras provenientes da consulta externa e do exterior.

Foram incluídas neste trabalho 831 estirpes bacterianas das quais 571 *E. coli*, 250 *K. pneumoniae* e 10 *K. oxytoca*, recolhidas durante um período de 15 meses (Janeiro de 2009 e Março de 2010), no sector de Microbiologia do Centro Hospitalar Póvoa Varzim/Vila Conde.

3.2.1 Identificação das espécies bacterianas

Após recepção no laboratório, todas as amostras foram semeadas em meios de cultura seleccionados de acordo com as normas do serviço de microbiologia, e incubadas durante 24h a 35°C. A identificação bacteriana dos isolados foi efectuada com recurso às características morfológicas das colónias, coloração de Gram (Figura 13) (ANEXO IV), métodos de identificação bioquímica convencionais e a carta de Identificação de Gram negativo, VITEK®2 (GN)



Figura 13. Placas agar com crescimento de *Enterobacteriaceae* e respectiva coloração de Gram

1- *Escherichia coli* em agar CLED® BioMérieux®; 2- bacilos Gram negativo; 3- *Klebsiella pneumoniae* em agar MacConkey® BioMérieux®. Fonte: 1 e 3- Serviço de Patologia Clínica CHPPV/VC;

2- Adaptado de: http://www.labtestsonline.org/understanding/analytes/gram_stain/sample.html (acesso a 26/10/2010)

A carta GN é um dispositivo de utilização única que oferece identificação automática dos mais importantes bacilos Gram negativo fermentadores e não fermentadores, de maior relevância clínica com base num conjunto de 47 testes bioquímicos (utilização de carbono, actividade enzimática e resistência). Das colónias bacterianas isoladas e recentes foram preparadas suspensões bacterianas (3,0 ml de solução salina estéril [NaCl aquoso de 0,45% a 0,50%, pH 4,5 a 7,0] num tubo de ensaio de plástico transparente [12 mm x 75 mm]), com uma densidade equivalente a um padrão McFarland entre 0,50 a 0,65 usando o calibrador de densidade DensiCHEK™ VITEK® 2 da BioMérieux. A mesma suspensão foi utilizada para a determinação da sensibilidade aos antibióticos.

3.2.2 Avaliação da Susceptibilidade aos Antibióticos

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer microrganismo que contribua para um processo infeccioso que justifique uma terapia antimicrobiana. As colónias isoladas de cada tipo de microrganismo que possa desempenhar um papel patogénico são seleccionadas da placa de gelose e testadas quanto à sensibilidade aos antibióticos. Estes testes são então examinados e a concentração mínima inibitória é determinada. As CMI têm sido tradicionalmente determinadas usando concentrações de antibiótico derivadas de diluições duplas sucessivas sendo por isso determinado a partir da concentração mais baixa em que ocorre inibição do crescimento. A atribuição de um critério interpretativo (sensível, intermédio ou resistente) à CMI pode ser bastante útil na orientação da terapêutica.

As cartas AST-N060 e AST-N151 (cartas de sensibilidade para Gram negativo) são versões miniaturizadas e abreviadas da técnica de dupla diluição. Cada carta AST apresenta 64 micropoços com antibióticos seleccionados, em concentrações variadas, desidratados e com meio de cultura (Anexo II e Anexo III). Em todas as cartas existe um poço de controlo, que contém apenas meio de cultura microbiológico, contendo os restantes poços quantidades conhecidas de um antibiótico específico combinado com um meio de cultura.

A suspensão de microrganismo a ser testada deve ser diluída numa concentração padronizada em 0,45% de solução salina antes de ser utilizada para rehidratar o meio antibiótico na carta. As cartas são em seguida, cheias, seladas e colocadas no leitor/incubadora do aparelho (Figura 14). O aparelho monitoriza o crescimento em cada um dos poços da carta durante um período de tempo definido (até 18 horas para bactérias). No fim do ciclo de incubação, os valores de CMI são determinados para cada antibiótico contido na carta (BioMérieux, Marcy- L'Étoile, França).

O resultado de CMI deve ser associado à identificação de um microrganismo de forma a determinar uma interpretação de categoria. Um resultado interpretativo (S, I ou R) será assinalado juntamente com uma CMI, de acordo com as interpretações definidas pelo CLSI.



Figura 14. Processamento de Cartas VITEK®2

1: a padronização da diluição; 2: a rastreabilidade obtida com o leitor de códigos de barras e 3: o carregamento contínuo; são vantagens deste método.

Fonte: Adaptado de: http://www.biomerieux.pt/upload/vitek2_compact_industry_workflow7251.jpg (acesso a: 20/10/10)

3.2.3 Teste VITEK®2 ESBL

O teste VITEK®2 ESBL (BioMérieux, Marcy-L'Étoile, França) é parte integrante das cartas VITEK®2 de sensibilidade aos antibióticos para Gram negativo, a AST-N060 e a AST-N151.

As estirpes em estudo foram submetidas a este método semi-automático de diluição em caldo seguindo os procedimentos do fabricante (ANEXO II). O teste ESBL é composto pelos antibióticos cefepima, cefotaxima e ceftazidima em concentrações de 1 µg/ml, 0.5 µg/ml e 0.5

µg/ml respectivamente e pela associação destes com ácido clavulânico com concentração de 10, 4 e 4 µg/ml. A suspensão de microrganismo a ser testada foi diluída numa concentração padronizada em 0,45% de solução salina antes de ser utilizada para rehidratar o meio antibiótico na carta. A carta foi em seguida, cheia, selada e colocada no leitor/incubadora do aparelho manualmente. O aparelho monitoriza o crescimento em cada um dos poços da carta durante um período de tempo definido (até 18 horas para bactérias). No fim do ciclo de incubação, os resultados do teste, são determinados para cada antibiótico contido na carta.

Os resultados foram considerados positivos quando foi detectada uma redução proporcional de crescimento nos poços contendo cefalosporina/ácido clavulânico em comparação com aqueles contendo a cefalosporina sozinha.

3.2.4 Controlo de Qualidade

Foram testadas duas estirpes de referência ATCC (*American Type Culture Collection*) como controlo de qualidade. Uma *Escherichia coli* ATCC® 25922 (ESBL Negativa) e uma *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603 (ESBL Positiva). Os resultados dos testes só foram aceites quando o resultado do controlo de qualidade se encontrava entre os limites aceitáveis, de acordo com os critérios do CLSI (Anexo V).

3.3 Tratamento Estatístico

Os resultados foram analisados recorrendo ao programa informático *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, versão 18.0 para Windows, Inc. Chicago, IL, USA). Foi utilizada na análise dos resultados estatística descritiva simples, nomeadamente média, moda, mediana, desvio padrão e frequências. Em valores qualitativos utilizou-se o teste de Qui-Quadrado (χ^2) para determinar diferenças entre proporções. O nível de significância considerada foi de $p < 0.05$. Em amostras reduzidas utilizou-se o teste de Fisher. Foram ainda utilizados, o sistema operativo OBSERVA™ vs R03.00 (BioMérieux, Marcy L'Étoile, France), software de gestão de dados e estatística em plataforma Windows XP que permite a monitorização de dados múltiplos provenientes do sistema automático de microbiologia VITEK®2 Compact (BioMérieux, Marcy L'Étoile, France) e o sistema informático SISLAB® vs 3.3.3 (Glintt SGPS, Portugal), sistema de gestão laboratorial do serviço de Patologia Clínica, facilitando a consulta de histórico de dados microbiológicos, a realização de estatísticas diversas e a gestão de doentes e requisições.

RESULTADOS

4.1 Caracterização da população em estudo

A recolha das amostras foi realizada entre Janeiro de 2009 e Março de 2010. Foram estudadas 831 amostras biológicas provenientes dos vários serviços hospitalares do CHPVVC, nomeadamente: Internamento, Urgência e Consulta.

Analisando a distribuição dos doentes estudados, observamos que 67.8% são do género feminino enquanto 32.2% são do género masculino. A distribuição das idades dos pacientes estudados revela que 62.1% apresenta idade superior a 65 anos, 22.5% apresentam idades compreendidas entre 15 e 64 anos e apenas 15.4% têm idade inferior a 15 anos (Tabela IV).

Tabela IV. Distribuição dos doentes estudados por faixa etária versus género

Faixa etária	Género				N total	%
	Feminino		Masculino			
	n	%	n	%		
<15 anos	95	11.4	33	4	128	15.4
15-64 anos	130	15.6	57	6.9	187	22.5
>65 anos	339	40.8	177	21.3	516	62.1
Total	564	67.8	267	32.2	831	100

n: número de isolados

Em termos de tendência central e dispersão, a média de idades é de 59.6 ± 29.0 (DP). Registrando-se diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2 = 43.232$; $p < 0.01$), com maior prevalência para os doentes mais velhos, sendo de referir que, para um total de 571 casos de infecção por *E. coli*, 314 foram identificados nos doentes com mais de 65 anos de idade. Assim como, para um total de 250 casos de infecção por *K. pneumoniae*, 195 foram identificados em doentes com mais de 65 anos de idade.

A distribuição dos doentes segundo a proveniência, revela que a grande maioria dos indivíduos, na altura da análise se encontrava em regime de ambulatório (51.9%), enquanto que 47.3% se encontravam em regime de internamento. Apesar de não revelar expressão estatística, em 0.8% dos indivíduos não foi possível determinar o serviço hospitalar de proveniência.

Em relação às valências de internamento, verificamos que o serviço de medicina (n=288) foi o que mais contribuiu para a composição da amostra geral, seguido pela cirurgia (n=54), pediatria (n=25), ortopedia (n=23), obstetrícia/gineconologia/berçário (n=6) e por último pela neonatologia (n=3).

As *Enterobacteriaceae* estudadas provieram de vários produtos biológicos. As amostras biológicas estudadas revelaram uma enorme diversidade: urina (76.3%), expectoração (9.5%), sangue (4.9%) e pus (3.7%) foram as mais analisadas, no entanto como se pode observar na figura 15, outros produtos foram recolhidos, no entanto com um número muito inferior de amostras e sem força expressiva em termos de incidência. Registou-se diferenças de médias estatisticamente significativas entre as amostras biológicas de urina, expectoração e aspirado brônquico ($p < 0.01$), assim como entre as amostras de expectoração e sangue ($p < 0,01$) pelo teste de Fisher.

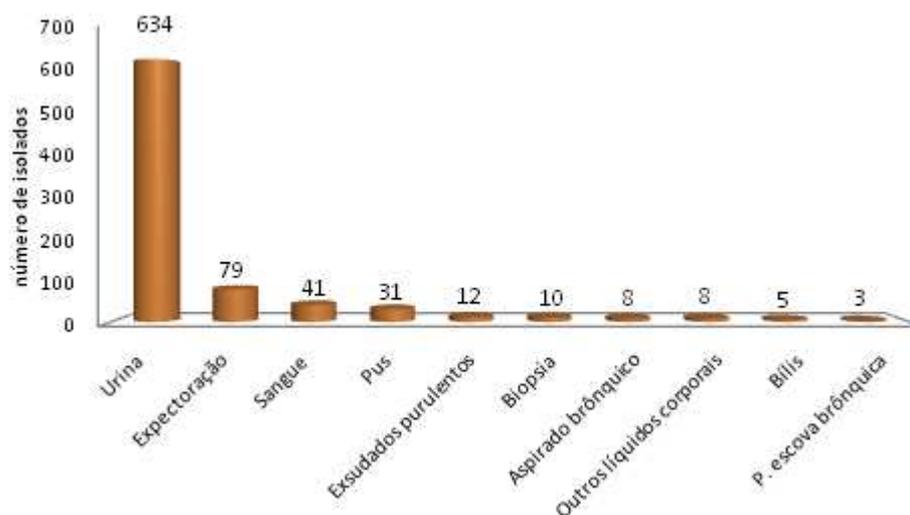


Figura 15. Distribuição dos 831 isolados em estudo por produto biológico

4.2 Caracterização dos isolados clínicos

Isolaram-se 831 bacilos Gram negativo, dos quais 571 *Escherichia coli* (68.7%), 250 *Klebsiella pneumoniae* (30.1%) e 10 *Klebsiella oxytoca* (1.2%) (Figura 16).

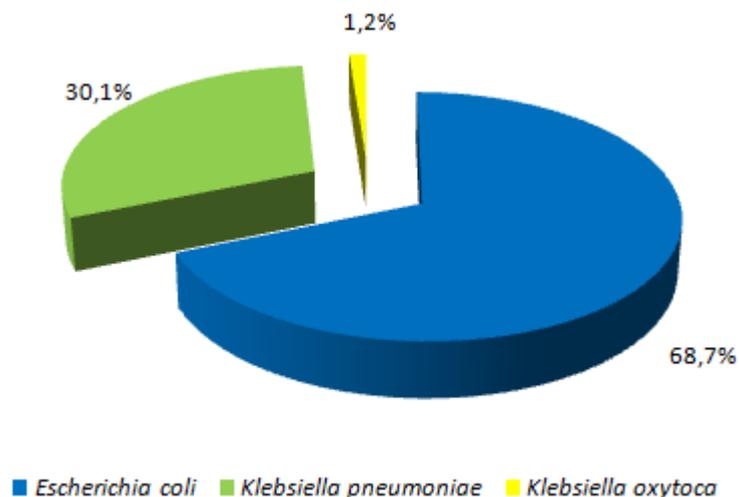


Figura 16. Incidência dos isolados de Enterobacteriaceae em termos globais

A determinação da produção de ESBL foi realizada através do teste VITEK® 2 ESBL. Um total de 831 isolados foram testados e aproximadamente um quarto (22.6%) foram classificados como produtores de ESBL (188/831 isolados). Destas, 60.1% eram *K. pneumoniae* e 39.9% eram *E. coli* (Figura 17). A diferença encontrada entre produtores foi estatisticamente significativa ($\chi^2 = 72.036$; $p < 0.01$) na prevalência entre *K. pneumoniae* e *E. coli*.

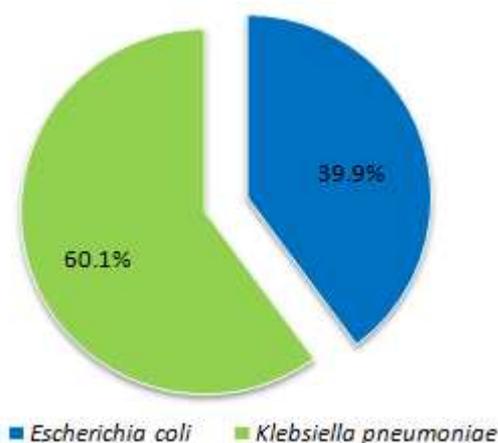


Figura 17. Incidência dos isolados no grupo dos produtores de ESBL

A produção de ESBL em *K. pneumoniae* corresponde a 13.6% (113/831 isolados) da totalidade dos isolados e em *E. coli* a 9% (75/831 isolados). Não foi encontrado nenhum isolado de *K. oxytoca* produtor de ESBL na amostra estudada (Tabela V).

Tabela V. Distribuição dos microrganismos isolados em função do resultado do teste ESBL

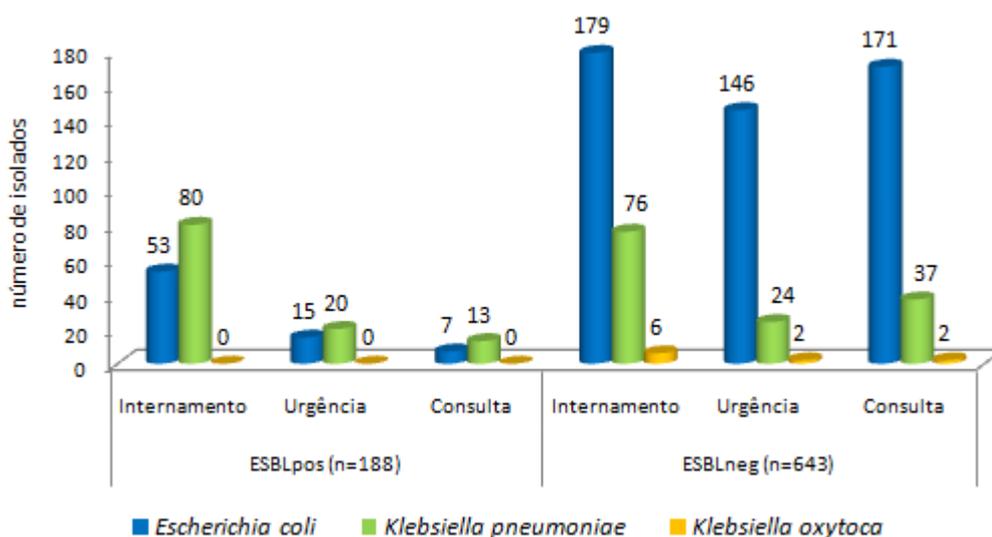
ISOLADO	ESBL POSITIVO		ESBL NEGATIVO		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
<i>Escherichia coli</i>	75	9	496	59.7	571	68.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	113	13.6	137	16.5	250	30.1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0	10	1.2	10	1.2
TOTAL	188	22.6	643	77.4	831	100

n: número de isolados

Analisando a distribuição da totalidade dos doentes estudados, observamos que 67.9% são do género feminino enquanto 32.1% são do género masculino. As diferenças estatisticamente significativas, ($\chi^2 = 32.44$; $p < 0.01$), revelam que as maiores incidências encontram-se no género feminino quer ao nível de produção de *K. pneumoniae* quer de *E. coli*.

No que se refere à condição do doente, constatou-se que a maioria dos isolados produtores de ESBL proveio do internamento (n=133) com taxas de ESBLpos de 70.6% e 70.8% para *E. coli* e *K. pneumoniae* respectivamente (Figura 18).

Foram isolados 35 enterobactérias ESBLpos do serviço de urgência e 20 da consulta externa. *K. pneumoniae* foi o microrganismo mais isolado nestes dois serviços, contudo analisando a distribuição por microrganismo dos isolados produtores de ESBL nos vários serviços, observamos que o isolamento de *E. coli* foi superior na urgência (20%) e a da *K. pneumoniae* na consulta externa (11.5%).

**Figura 18.** Distribuição dos isolados produtores de ESBL e não produtores em regime de internamento e ambulatório

As várias especialidades de internamento mostraram comportamentos díspares em relação ao número de isolados produtores de ESBL (Figura 19). O serviço de medicina interna foi a origem de 83.5% dos isolados ESBLpos (111/133 isolados) dos quais 88.7% *E. coli* (47/53 isolados) e 80% *K. pneumoniae* (64/80 isolados).

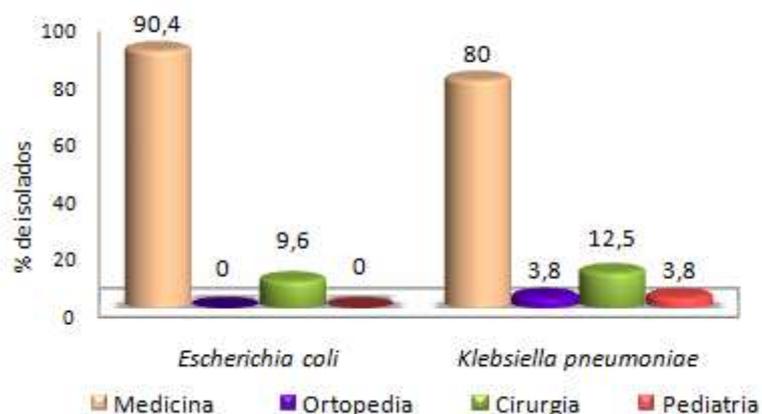


Figura 19. Distribuição dos isolados produtores de ESBL nas várias especialidades de internamento

No serviço de cirurgia as taxas de incidência de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBL mostraram-se semelhantes, com valores de 9.6% e 12.5% respectivamente. No serviço de ortopedia e de pediatria não se isolou nenhuma *E. coli* produtora de ESBL, e *K. pneumoniae* obteve valores de 3.8% (3/80 isolados) em ambos os serviços (Figura 19). Relativamente à mediana das idades, ela apresenta-se ligeiramente superior nos indivíduos cuja estirpe identificada como produtora de ESBL pertence à espécie *E. coli*. Não foram encontradas diferenças significativas em termos de idades, entre indivíduos do género masculino e feminino.

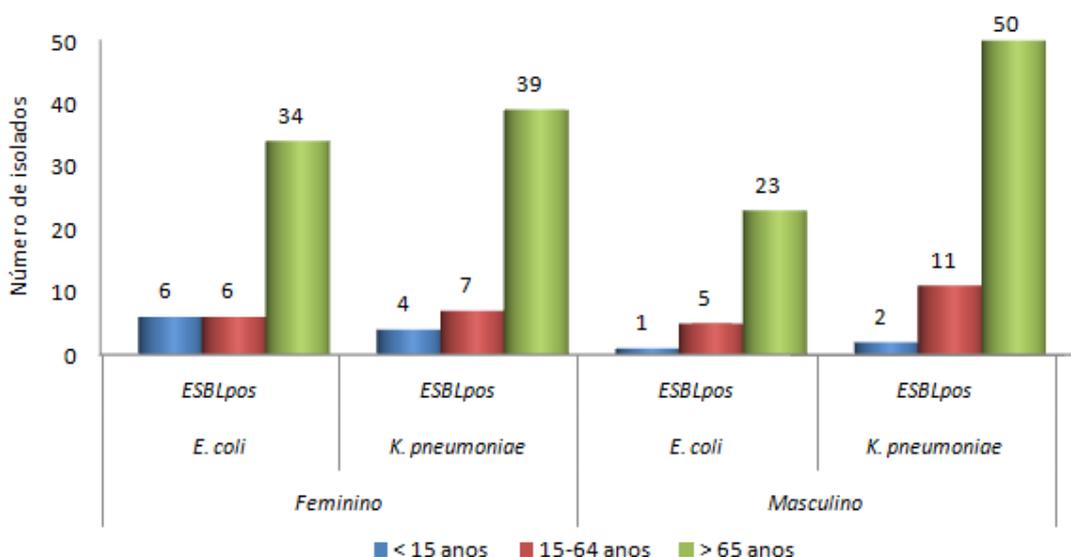


Figura 20. Número de microrganismos produtores de ESBL isolados por faixa etária e por género

Verificou-se uma tendência de aumento do isolamento de microrganismos produtores de ESBL com o avançar da idade, em ambos os géneros (Figura 20).

Com o intuito de comparar a prevalência de produção de ESBL por fonte de isolamento, agrupou-se os produtos em 10 tipos de amostras clínicas. Na totalidade das *Enterobacteriaceae* ESBLpos isoladas, as incidências mais altas de produtores de ESBL foram encontradas em urina (66.5%, 125/188 isolados) seguida de expectoração (18.1%, 34/188 isolados). Em isolados de *E. coli* produtores de ESBL, 77.3% (58 isolados) eram provenientes de urinas, seguida de hemocultura com 4.0% (4 isolados) (Figura 21). Urina foi também o primeiro produto biológico de isolamento de *K. pneumoniae* produtora de ESBL (59.3%) seguida de expectoração com 31 isolados (27.4%).

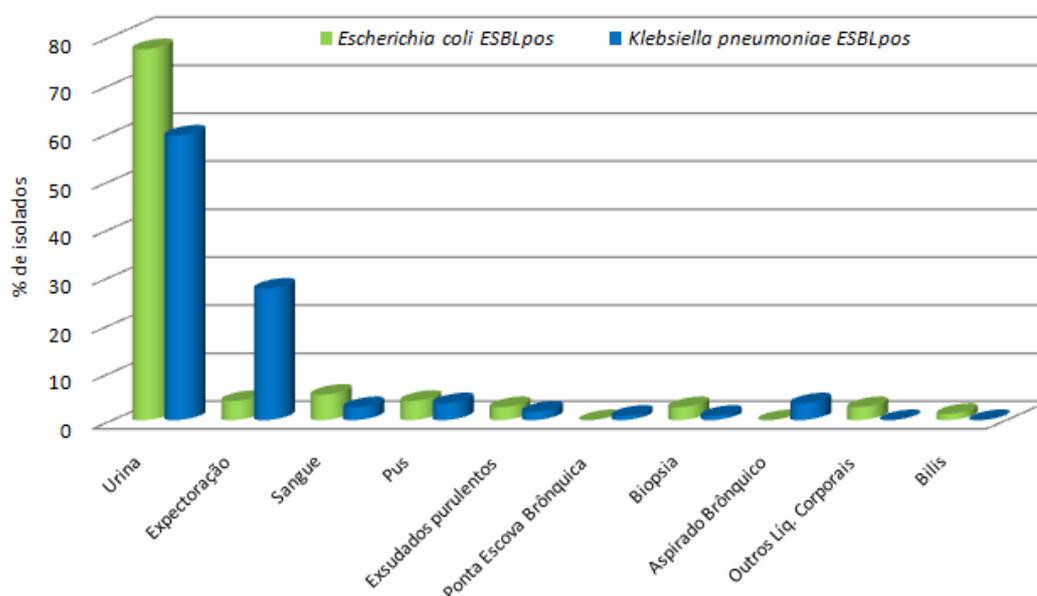


Figura 21. Distribuição dos isolados produtores de ESBL por produto de isolamento

Em relação à *K. pneumoniae* produtora de ESBL, o seu isolamento foi mais frequente em amostras de urina (59.3%, 67 isolados) e logo depois em expectoração (27.4%, 31 isolados), valor muito superior ao encontrado para *E. coli* produtora de ESBL (4%, 3 isolados). De salientar que nos produtos aspirado brônquico e ponta de escova brônquica não foi detectado nenhuma *E. coli* produtora de ESBL.

4.3 Susceptibilidade aos antibióticos

Os dados referentes à susceptibilidade da totalidade dos 188 isolados produtores de ESBL estão esquematizados na TABELA VIII.

Analisando as frequências de resistência aos antibióticos em *E. coli* produtoras de ESBL, verificou-se resistência simultânea aos β -lactâmicos estudados, às quinolonas (ciprofloxacina, 82.9%) e aos aminoglicosídeos (tobramicina, 71%) (Figura 22).

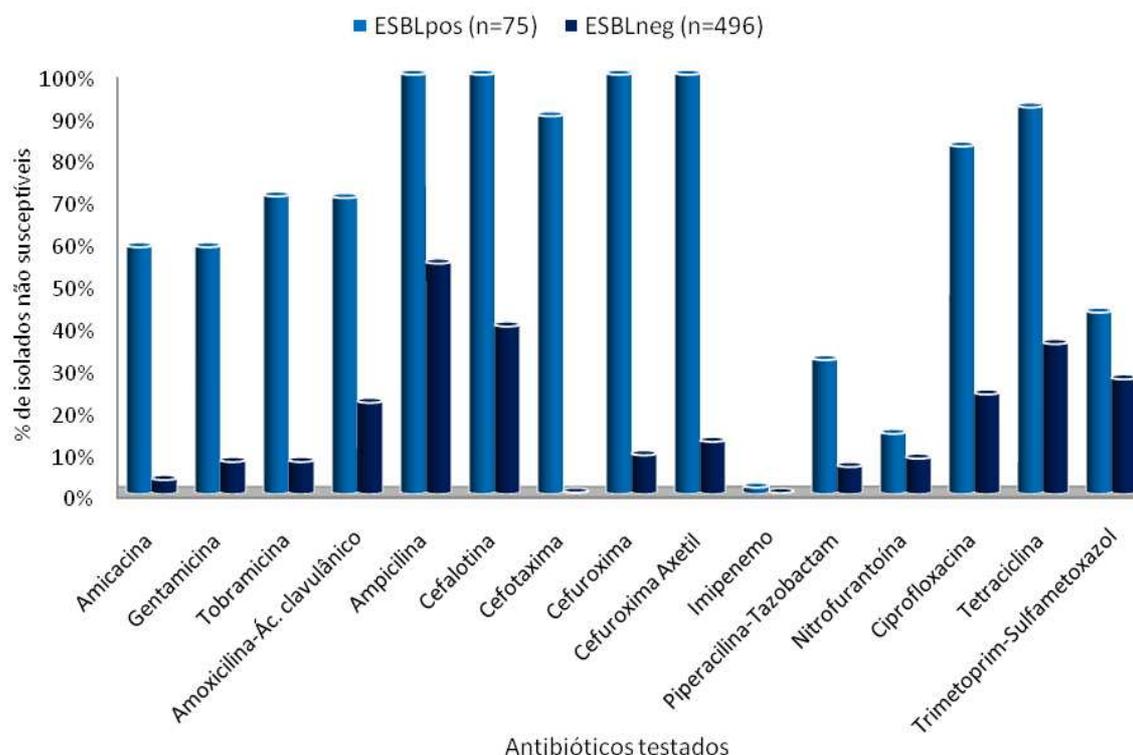


Figura 22. Comportamento dos isolados de *E. coli* frente aos antibióticos

Os antibióticos contra os quais foram expressas menores taxas de resistência entre os isolados de *E. coli* produtores de ESBL são: o imipenemo (1 isolado, 1.6%), a nitrofurantóina (11 isolados, 14.4 %) e a combinação piperacilina-tazobactam (24 isolados, 32%). De salientar que 7 isolados classificados como produtores de ESBL apresentaram sensibilidade *in vitro* à cefotaxima, no entanto o seu resultado foi modificado para resistente pelo software AES® BioMérieux. Quanto aos isolados de *E. coli* classificados como não produtores de ESBL, os aminoglicosídeos apresentaram taxas de sensibilidade entre 92% e 96%, a cefotaxima (99.6 %), a cefuroxima (90.7%), a cefuroxima axetil (87.5%), a combinação β -lactâmico/ β L (93.5%) e a nitrofurantóina (91.5%). As menores percentagens de sensibilidade foram encontradas para a ampicilina (45%), cefalotina (60%) e tetraciclina (64.2%) (Tabela VI e Figura 25).

Tabela VI. Padrão de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de *E. coli* produtores de ESBL e não produtores de ESBL

Antibióticos	<i>Escherichia coli</i> (n= 571)			
	ESBLpos (n=75)		ESBLneg (n=496)	
	No. (%) de isolados ^o		No. (%) de isolados ^o	
	R&I	S	R&I	S
Amicacina	44 (58.9)	31 (41.1)	17 (3.4)	479 (96.6)
Gentamicina	44 (58.9)	31(41.1)	38 (7.7)	458 (92.3)
Tobramicina	53 (71)	22 (29)	38 (7.7)	458 (92.3)
Amoxicilina-Ác.clavulânico	53 (71)	22 (29)	108 (21.8)	388 (78.2)
Ampicilina	75 (100)	0	273 (55)	223 (45)
Cefalotina	75 (100)	0	198 (40)	298 (60)
Cefotaxima	68 (90.1)	7 (9.9)	2 (0.4)	494 (99.6)
Cefuroxima	75 (100)	0	46 (9.3)	450 (90.7)
Cefuroxima Axetil	75 (100)	0	62 (12.5)	434 (87.5)
Imipenemo	1 (1.6)	74 (98.4)	1 (0.3)	495 (99.7)
Piperacilina-Tazobactam	24 (32)	51 (68)	32 (6.5)	464 (93.5)
Nitrofurantoína	11 (14.4)	64 (85.6)	42 (8.5)	454 (91.5)
Ciprofloxacina	62 (82.9)	13 (17.1)	118 (23.8)	378 (76.2)
Tetraciclina	69 (92.2)	6 (7.8)	178 (35.8)	318 (64.2)
Trimetoprim-Sulfametoxazol	32 (43.3)	43 (56.7)	136 (27.4)	360 (72.6)

Ác.clavulânico: Ácido clavulânico; No= número de isolados testados; ^o R&I= Resistente e Intermédio; S= Sensível

Contrariamente à *E. coli* que apresenta uma alta taxa de resistência à tetraciclina, a *K. pneumoniae* produtora de ESBL só em 19.6% dos isolados (22/113 isolados) foi resistente a este fármaco. Analisando assim o seu perfil de resistências/sensibilidades, verificamos que a *K. pneumoniae* apresenta percentagens de resistência superiores às da *E. coli* ESBLpos em 6 dos antibióticos testados. Tobramicina (91.2%), gentamicina (88.5%), nitrofurantoína (68.1%) e trimetoprim/sulfametoxazol (92.8%) estão entre os agentes com maiores taxas de resistência em *K. pneumoniae* ESBLpos (Figura 23 e Figura 24).

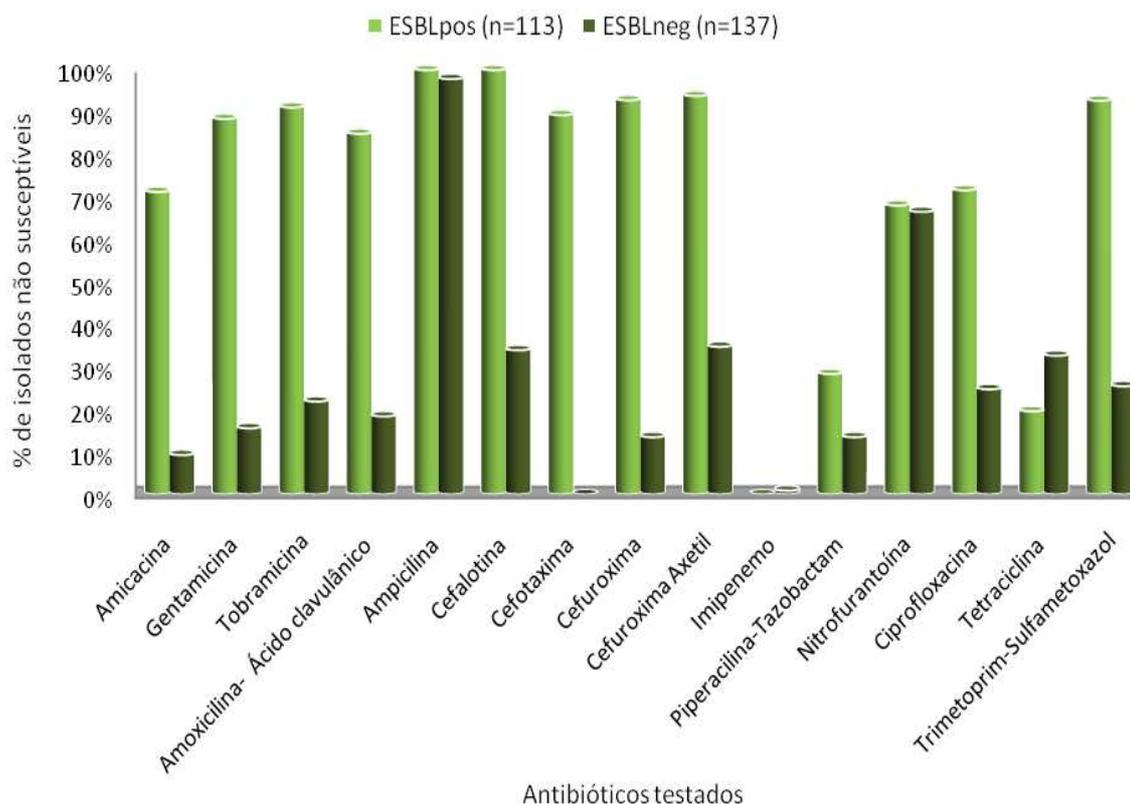


Figura 23. Comportamento dos isolados de *K. pneumoniae* frente aos vários antibióticos

Tetraciclina (19.6%) e a associação piperacilina-tazobactam (28.4%) são os antibióticos que apresentaram taxas mais baixas de resistência para *K. pneumoniae* produtora ESBL.

Os isolados de *K. pneumoniae* não produtores de ESBL apresentam taxas de resistência francamente inferiores às dos isolados produtores (Figura 24 e 25) no entanto 91 isolados são resistentes à nitrofurantoína (66.6%) e 45 isolados à tetraciclina (32.7%). A taxa de resistência à ampicilina de 97.9% é devida à resistência natural da *Klebsiella* a este antibiótico (TABELA VII).

A *K. pneumoniae* produtora de ESBL revelou alta taxa de susceptibilidade em somente três dos 15 antibióticos testados, respectivamente 100% para imipenemo (113/113 isolados), 80.4 % para tetraciclina (91/113 isolados) e 71.6% para a associação piperacilina-tazobactam (68/113 isolados) (Figura 24). Na tabela VII podemos observar no entanto que a percentagem de sensibilidade à tetraciclina nos isolados não produtores de ESBL diminuiu consideravelmente para 67.3% (92/137 isolados).

Tabela VII. Padrão de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL e não produtores de ESBL

Antibióticos	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n= 250)			
	ESBLpos (n=113)		ESBLneg (n=137)	
	No. (%) de isolados°		No. (%) de isolados°	
	R&I	S	R&I	S
Amicacina	81 (71.3)	32 (28.7)	13 (9.3)	124 (90.7)
Gentamicina	100 (88.5)	13 (11.5)	21 (15.6)	116 (84.4)
Tobramicina	103 (91.2)	10 (8.8)	20 (21.9)	117 (78.1)
Amoxicilina/Ác.clavulânico	96 (85)	17 (15)	25 (18.4)	112 (81.6)
Ampicilina	113 (100)	0	134 (97.9)	4 (2.1)
Cefalotina	113 (100)	0	47 (34)	90 (66)
Cefotaxima	101 (89.4)	12 (10.6)	0	0
Cefuroxima	105 (92.9)	8 (7.1)	18 (13.5)	119 (86.5)
Cefuroxima Axetil	106 (93.9)	7 (6.1)	48 (34.8)	89 (65.2)
Imipenemo	0	113 (100)	1 (0.9)	136 (99.1)
Piperacilina-Tazobactam	32 (28.4)	68 (71.6)	18 (13.5)	119 (86.5)
Nitrofurantoína	77 (68.1)	36 (31.9)	91 (66.6)	46 (33.4)
Ciprofloxacina	81 (71.7)	32 (28.3)	34 (24.8)	103 (75.2)
Tetraciclina	22 (19.6)	91 (80.4)	45 (32.7)	92 (67.3)
Trimetoprim-Sulfametoxazol	105 (92.8)	8 (7.2)	35 (25.5)	102 (74.5)

Ác.clavulânico: Ácido clavulânico; No.= Número de isolados testados; ° R&I= Resistente e Intermédio; S= Sensível

De entre os isolados de *K. pneumoniae* não produtores de ESBL, só a ampicilina e a nitrofurantoína demonstram valores de resistência preocupantes, com valores a ultrapassar largamente os 50% (Figura 25).

A co-resistência a outros grupos de antibióticos que não os β -lactâmicos é demonstrada na Figura 24. Além da resistência esperada aos β -lactâmicos nota-se uma resistência acentuada a outros grupos de antibióticos em associação com a produção de ESBLs.

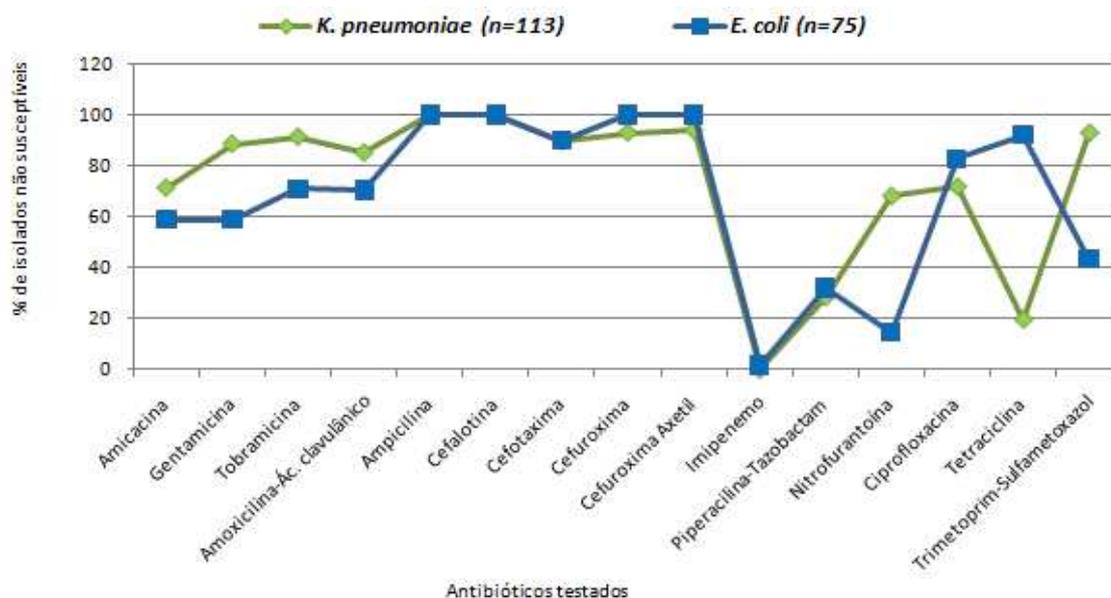


Figura 24. Perfil de susceptibilidade dos isolados produtores de ESBL

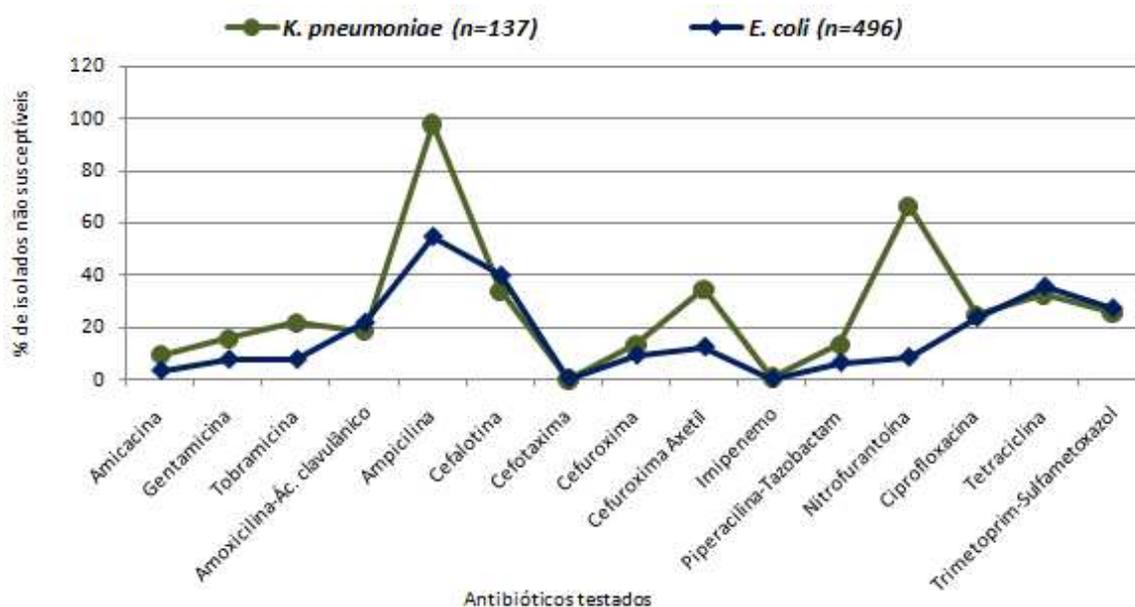


Figura 25. Perfil de susceptibilidade dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* não produtores de ESBL

Na Figura 26 estão esquematizadas as resistências globais obtidas para cada um dos antibióticos testados e para as espécies da família *Enterobacteriaceae* isoladas no estudo. Os isolados de *K. oxytoca* revelaram-se todos não produtores de ESBL com taxas de resistência entre 10% a 20%, com exceção da ampicilina, que apresentou resistência de 100%.

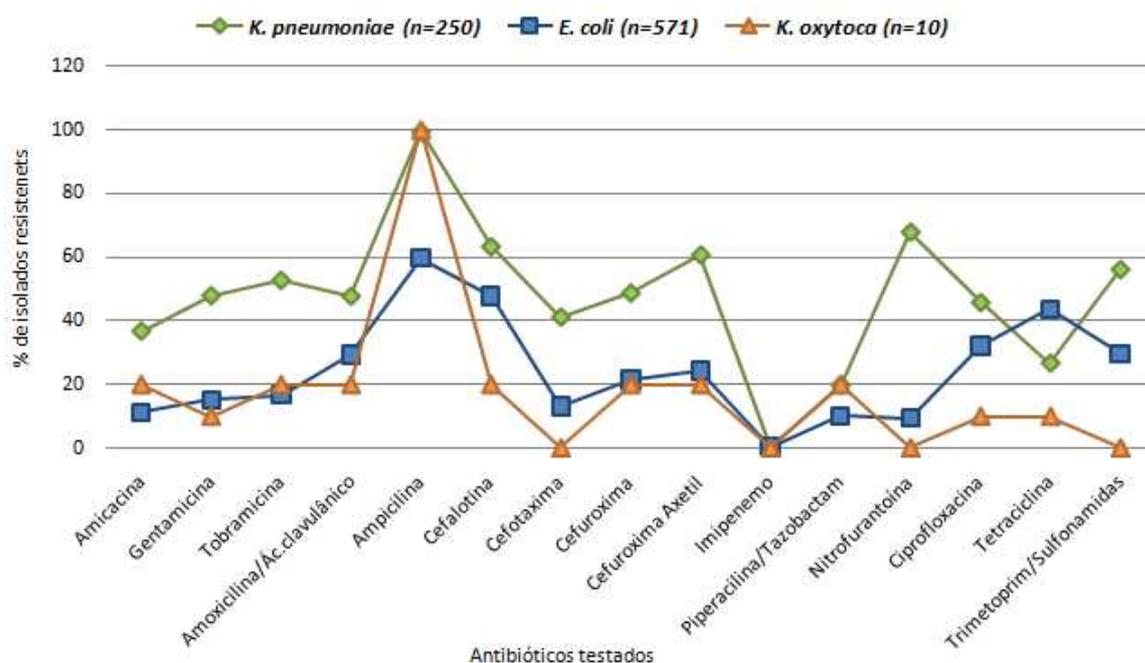


Figura 26. Distribuição dos perfis de resistência das Enterobacteriaceae estudadas entre Janeiro de 2009 e Março de 2010

De salientar que a *K. pneumoniae* apresenta em 99.9% dos fármacos testados resistências superiores às encontradas para *E. coli* e para *K. oxytoca*. A única exceção é relativa à tetraciclina, que ultrapassa a barreira dos 40% de resistência na *E. coli*, sendo por volta de 25% na *K. pneumoniae*. O antibiótico imipenemo foi o único que demonstrou altas taxas de sensibilidade em todos os isolados testados (Tabela VIII).

Tabela VIII. Comparação entre padrão global de susceptibilidade e não-susceptibilidade das *Enterobacteriaceae* testadas para ESBL

	<i>Escherichia coli</i> (n= 571)		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n= 250)		<i>Klebsiella oxytoca</i> (n= 10)	
	% R&I ^o	% S [*]	% R&I	% S	% R&I	% S
Amicacina	11.2	88.8	36.8	63.2	20	80
Gentamicina	15	85	48	52	10	90
Tobramicina	16.7	83.3	52.8	48	20	80
Amoxicilina-Ácido clavulânico	29.3	70.7	47.8	52.2	20	80
Ampicilina	59.7	40.3	99.6	0.4	100	0
Cefalotina	47.8	52.2	63.4	36.6	20	80
Cefotaxima	13.1	86.9	41.2	58.8	0	100
Cefuroxima	21.5	78.5	48.8	51.2	20	80
Cefuroxima Axetil	24.2	75.8	60.8	39.2	20	80
Imipenemo	0.5	99.5	0.5	99.5	0	100
Piperacilina-Tazobactam	10.1	89.9	19.8	80.2	20	80
Nitrofurantoína	9.4	90.6	68	32	0	100
Ciprofloxacina	32.1	67.9	45.8	54.2	10	90
Tetraciclina	43.6	56.4	26.7	73.3	10	90
Trimetoprim-Sulfametoxazol	29.7	70.3	56.2	43.8	0	100

n= número de isolados testados; ^o Percentagem de Resistentes e Intermédios; ^{*} Percentagem de Sensíveis

DISCUSSÃO

As infecções devidas a microrganismos produtores de ESBLs têm um impacto claro nas taxas de mortalidade e de custos, a nível hospitalar e comunitário (Paterson e Bonomo, 2005). As implicações clínicas das ESBLs são extremamente sérias, sendo imperativo o uso de métodos de diagnóstico sensíveis, a fim de conduzir correctamente a terapêutica, monitorizar a resistência e implementar estratégias de intervenção.

Vários estudos realizados a nível mundial mostram que a ocorrência de ESBL apresenta variações geográficas consideráveis. Num estudo sobre prevalência de ESBL em cerca de 5000 *Enterobacteriaceae* isoladas na Europa, Nijssen *et al.* (2004) encontrou valores diferentes de acordo com o país de origem dos isolados: Turquia (23.6%), Itália (11.9%), Portugal (10%), Grécia (12.6%), Espanha (1.6%).

Entre 2004 e 2005, a Turquia apresentava uma prevalência de estirpes produtoras de ESBLs de 21%, principalmente *E. coli* responsáveis por infecções do tracto urinário adquiridas na comunidade (Coque *et al.*, 2008). Similarmente, o programa MYSTIC mostrou um aumento significativo de *E. coli* produtoras de ESBL entre 1997 (2.1%) e 2004 (10.8%), bem como em *K. pneumoniae* (de 9% para 13.6% respectivamente) (Cantón *et al.*, 2008)

Estes valores são superiores aos 5.2% encontrados em 2006 num estudo espanhol que englobou 15 laboratórios de microbiologia. *E. coli* produtoras de ESBL foram responsáveis por 6.5% das bacteriemias comunitárias, enquanto *K. pneumoniae* apresentaram prevalências entre 12.9% e 26.8%, segundo estudos realizados em Espanha e Reino Unido respectivamente (Coque *et al.*, 2008).

No Brasil, o programa SENTRY de vigilância de resistências detectou alta prevalência de *K. pneumoniae* produtora de ESBL (36%) em isolados clínicos do tracto respiratório baixo de

doentes com pneumonia hospitalar (Sader *et al.*, 2001). Valores superiores foram encontrados por Kobayashi *et al.* (2009) que reportaram prevalências de 54.7% e 15.3% para *K. pneumoniae* e *E. coli* respectivamente, isolados de amostras clínicas num hospital público brasileiro.

Resultados de um estudo italiano com 8.015 isolados obtidos de 10 centros médicos indicaram que 6.3% das *Enterobacteriaceae* possuíam um gene ESBL, com diferentes prevalências e tipos de ESBL de acordo com a espécie: *Providencia stuartii* (28.1%; *bla*_{TEM}), *K. pneumoniae* (20%; *bla*_{TEM} e/ou *bla*_{SHV}), *P. mirabilis* (16.3%; *bla*_{TEM}) e *E. coli* (1.2%; *bla*_{TEM} ou *bla*_{SHV}) (Spanu *et al.*, 2002).

Em Taiwan, um estudo retrospectivo realizado durante um período de 6 anos, observou o aumento de casos de *K. pneumoniae* produtora de ESBL em infecções hospitalares. Das 274 estirpes isoladas, 28.4% eram ESBL positivas (Kuo *et al.*, 2007).

Valores mais baixos foram encontrados nos Estados Unidos, em que o programa MYSTIC (realizado em 2004) revelou que 1.4% das *E. coli* e 4.4% das *K. pneumoniae* isoladas expressavam ESBLs (Cantón *et al.*, 2008; Endimiani e Bonomo, 2008).

Tendo em consideração que a frequência de isolamento apresenta variações geográficas significativas e atendendo ao facto de não existirem muitos estudos locais sobre a epidemiologia das β -lactamases de espectro alargado, foi nosso objectivo avaliar a prevalência das enterobactérias produtoras de ESBL, numa unidade hospitalar da zona norte do país e analisar a sua susceptibilidade frente a um painel de antibióticos.

Em Portugal, Machado *et al.* (2007) num estudo sobre a produção de ESBLs em *Enterobacteriaceae* em três hospitais e dois laboratórios da zona Norte e Centro do país, encontraram 39% dos isolados (109/200 isolados) resistentes às cefalosporinas de espectro alargado, com especial destaque para a *K. pneumoniae* (42.2%) e para a *E. coli* (33.9%).

Num estudo de ecologia hospitalar, realizado entre 1999-2008 no Hospital Pedro Hispano (Matosinhos, Portugal), Soares *et al.* (2009) encontraram 8% de *E. coli* e 27% de *K. pneumoniae* resistentes às cefalosporinas de espectro alargado. Nesse mesmo estudo verificaram o aumento da incidência de *K. pneumoniae* de 15% em 2007 para 27% em 2008, demonstrando a emergência desta bactéria nas infecções hospitalares.

Freitas e colegas (2006) investigaram 131 isolados clínicos de *E. coli* provenientes do Hospital de S. Teotónio em Viseu (Portugal) e caracterizaram apenas 9 isolados (6.8%) como produtores de ESBL.

No nosso trabalho seleccionamos as enterobactérias que foram testadas para a produção de ESBL com o teste VITEK2 ESBL entre Janeiro de 2009 e Março de 2010 e encontramos valores superiores. A produção de ESBL foi detectada em 22.6% dos isolados (13.6% de *K. pneumoniae* e 9% de *E. coli*). Os valores encontrados são variáveis em função do

tipo/dimensão de instituição em estudo, de acordo com as políticas de controlo de infecção aplicadas, os protocolos de antibioterapia institucionalizados, as características dos doentes observados e do desenho do estudo (Freitas *et al.*, 2006; Rodríguez-Baño *et al.*, 2004).

Os resultados encontrados neste trabalho, relativamente à população com infecção por microrganismos produtores de ESBL, são similares aos encontrados noutros trabalhos, em que mais de 50% das *E. coli* produtoras de ESBL foram encontradas em indivíduos do género feminino e em que a maioria dos doentes apresentava idade superior a 65 anos (77.7%). A elevada frequência de *E. coli* produtora de ESBL encontrada em mulheres neste estudo e isolada de urinas, poderá estar relacionada com uma maior susceptibilidade destas à infecção urinária, devido às condições anatómicas femininas, como o comprimento da uretra e a proximidade existente entre a uretra e o ânus, que facilitam a contaminação por via ascendente (Kahlmeter, 2003; Correia *et al.*, 2007). A alta prevalência de isolados produtores de ESBL em doentes na faixa etária superior a 65 anos, encontrada no nosso estudo, está de acordo com outros estudos (Khanfar *et al.*, 2009), que identificaram vários factores de risco na aquisição de infecções nosocomiais/comunitárias por enterobactérias produtoras de ESBL (Rodríguez-Baño *et al.*, 2004). Mesmo não sendo possível afirmar através dos dados do nosso estudo, tudo indica que a idade avançada dos doentes em conjunto com hospitalizações recorrentes, uso prévio de antibióticos e a presença de dispositivos invasivos serão factores de risco para infecções por microrganismos produtores de ESBL.

No nosso trabalho o número de microrganismos produtores de ESBL, isolados de hemoculturas foi de 16.7% (7/42 hemoculturas) correspondendo a 3.7% da totalidade dos isolados produtores de ESBL, na maioria recolhidos de doentes internados (serviço de medicina), com mais de 60 anos e do género feminino. De acordo com o programa EARSS (2009), *K. pneumoniae* é o segundo microrganismo mais relevante em infecções sanguíneas por Gram negativo depois da *E. coli*.

Um estudo retrospectivo realizado entre Janeiro de 2001 e Dezembro de 2003 em Taiwan, em 54 adultos com bacteremia detectou a produção de ESBL em 17.6% das *K. pneumoniae* e 7.7% dos isolados de *E. coli* (Huang *et al.*, 2006). O uso prévio de antibióticos, cirurgia recente, procedimentos invasivos nos dias antecedentes à admissão, internamento anterior, género masculino e idade > 61 anos foram encontrados como factores de risco para aquisição de uma infecção por enterobactérias produtoras de ESBL. Apesar de não se tratarem de adultos, Tragante *et al.* (2008) relataram que 15.5% das infecções sanguíneas detectadas em recém-nascidos tinham como agente causal uma *K. pneumoniae* produtora de ESBL.

Mais de 50% das *Klebsiella* spp. isoladas de hemoculturas em doentes internados no hospital de São Paulo, no Brasil revelaram ser ESBLs (Pereira *et al.*, 2003) e num estudo

semelhante realizado na Índia numa unidade pediátrica, os autores encontraram 12% das septicemias neonatais causadas por *K. pneumoniae* e destas, 87% eram produtoras de ESBLs (Tragante *et al.*, 2008). Contrariamente aos estudos anteriores, no nosso trabalho, *E. coli* (29 isolados) foi o microrganismo mais associado com infecção sanguínea seguido de *K. pneumoniae* (10 isolados), no entanto analisando estes isolados quanto à produção de ESBL verificamos que esta é superior em *K. pneumoniae* (30%) do que em *E. coli* (13.8%), dados estes de acordo com a literatura (Huang *et al.*, 2006; Augusti *et al.*, 2007)

A *K. pneumoniae* foi isolada em 61.9% das amostras provenientes da consulta externa e *E. coli* em apenas 38.1%. Os doentes provenientes da consulta externa nos quais foi isolada uma enterobactéria produtora de ESBL eram maioritariamente do género feminino (76.2%) com idade superior a 65 anos (66.7%) e provenientes principalmente da consulta de medicina interna (52.4%). Vários trabalhos apontam para os factores de risco associados com a aquisição de microrganismos produtores de ESBL: hospitalizações prévias, ITU recorrente e idade superior a 60 anos são os mais frequentemente assinalados (Pitout *et al.*, 2005; Rodríguez-Baño *et al.*, 2004), factores que explicam os dados obtidos e estão de acordo com o observado no nosso estudo.

Entre 2004 e 2007, num estudo realizado no Hospital Geral de Santo António, EPE (Porto, Portugal), 77% das estirpes de *E. coli* produtoras de ESBL provieram do internamento e 23% do ambulatório, enquanto 86% das estirpes de *K. pneumoniae* eram provenientes do internamento e apenas 14% do ambulatório (Ferreira, 2007).

Em 2007, Mendonça *et al.* caracterizou 119 isolados de *E.coli* como produtores de β -lactamases tipo CTX-M prevalentes em infecções adquiridas na comunidade (56%), em infecções urinárias (76%) e em doentes com idade \geq 65 anos idade (76%).

Inicialmente associada a infecção nosocomial, a *K. pneumoniae* produtora de ESBL tem sido associada a infecções comunitárias pressupondo medidas de higiene ineficazes, falhas nos métodos de controlo de infecção e disseminação à comunidade de estirpes resistentes hospitalares (Souli *et al.*, 2008; Machado Sequeira, 2004).

Neste estudo, a percentagem de *K. pneumoniae* (92.3%) isolada em expectoração e outros produtos provenientes do tracto respiratório foi muito superior à encontrada para *E. coli* (7.7%), encontrada principalmente no serviço de medicina interna (84.6%) (Barroso *et al.*, 2000; Ferreira, 2007) em doentes do género masculino (76.9%) com uma média de 72 anos. As bactérias do género *Klebsiella* são frequentes colonizadoras do tracto gastrointestinal nos humanos mas também podem ser encontradas na orofaringe e nas vias respiratórias superiores de doentes hospitalizados. Os locais mais comuns de infecção por *Klebsiella spp.* são o tracto respiratório e urinário (Ko *et al.*, 2008; EARSS, 2009).

No entanto pouco se conhece sobre os mecanismos de resistência presentes em *K. pneumoniae* em Portugal. Estudos realizados entre 1999 e 2006 revelaram diferenças temporais entre os genes que codificam para ESBL presentes nestas estirpes. Em 1999 os genes presentes eram maioritariamente *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{GES}, sofrendo mudanças significativas em 2006 em que 45% dos isolados expressava uma β -lactamase tipo CTX-M, confirmando a emergência desta família de β -lactamases em *K. pneumoniae* em Portugal e noutros países (Mendonça *et al.*, 2009). No nosso estudo não foi possível proceder à caracterização dos determinantes genéticos responsáveis pela resistência. No entanto estudos de caracterização são relevantes pois permitem avaliar a disseminação destes determinantes de resistência, antecipando os riscos que podem constituir em cada unidade de saúde ou na comunidade.

Actualmente um dos principais problemas hospitalares é a resistência a antibióticos codificada em genes de localização extracromossómica, devido ao seu potencial de transferência para outras estirpes bacterianas susceptíveis que se encontram no meio ambiente hospitalar. Alguns autores têm descrito a transferência de ESBL entre espécies diferentes de enterobactérias. No Chile, um estudo conduzido por Sánchez *et al.* (2006) evidenciou a transferência de resistência a C3G e de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV} entre estirpes nosocomiais de *K. pneumoniae* e outras *Enterobacteriaceae* (*C. freundii*, *S. typhimurium*, *S. marcescens* e *E. coli*) classificadas como não produtores de ESBL e sensíveis às C3G, confirmando o papel importante que este microrganismo representa como reservatório de ESBL e de outros genes de resistência que se podem transferir para estirpes sensíveis.

Vários relatórios têm surgido nos últimos anos, indicando alguma correlação entre a produção de ESBL e a resistência a outros grupos de antibióticos (Bermejo *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2010). Os resultados obtidos no nosso estudo demonstram um aumento da resistência a aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazole em isolados produtores de ESBLs.

Rodríguez-Baño *et al.* (2004), classificou o uso prévio de fluoroquinolonas como um factor de risco para a aquisição de uma *E. coli* produtora de ESBL tipo CTX-M e o tratamento prévio com ciprofloxacina e/ou trimetoprim-sulfametoxazole como factor de risco de colonização por microrganismos produtores de ESBL em unidades geriátricas.

Em Hong-Kong, num estudo sobre colonização do tracto intestinal de crianças e adultos não hospitalizados, foram encontradas β -lactamases tipo CTX-M em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*. De notar também que estes isolados revelaram perfis de multiresistência envolvendo 3 ou mais antibióticos, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazole, ciprofloxacina, gentamicina e cloranfenicol (Ho *et al.*, 2008). Estes dados parecem indicar alguma correlação entre a produção de β -lactamases CTX-M e a resistência a outros grupos de antibióticos.

Na Argentina, a colonização fecal por *K. pneumoniae* produtora de ESBL, foi detectada em 54.3% das amostras provenientes de uma UCI neonatal com resistências à gentamicina (97.3%) e amicacina (71.4%) mantendo a susceptibilidade total ao imipenemo e cerca de 90% à ciprofloxacina e à associação piperacilina-tazobactam (Desimoni *et al.*, 2004).

Em 2010 foi detectado pela primeira vez em Portugal, um isolado de *K. pneumoniae* produtor de ESBL, resistente às quinolonas que expressava no mesmo plasmídeo genes de resistência às quinolonas (*qnrA* e *qnrB*) concomitantemente com os genes *bla*_{TEM-1} e/ou *bla*_{SHV-1} (Ferreira *et al.*, 2010). Esta associação de genes, demonstrada também por Bermejo *et al.* (2006) na Argentina, poderá explicar o fenómeno de resistência associado entre fluoroquinolonas e β -lactâmicos em *Enterobacteriaceae* e portanto a capacidade de co-selecção entre os dois tipos de resistência e os respectivos fármacos.

A co-resistência entre grupos diferentes de fármacos está descrita para os produtores de ESBL em geral, no entanto poderá ser mais vincada no caso das CTX-M (Branger *et al.*, 2005), hipótese que não foi possível verificar no nosso estudo já que não se procedeu à caracterização das β -lactamases presentes. Estudos posteriores deverão ser efectuados de modo a aumentar a escassa informação sobre os produtores de ESBL em Portugal (Machado *et al.*, 2007; Pitout, 2010).

A maioria dos protocolos de tratamento para as infecções urinárias não complicadas aconselha o tratamento empírico dos doentes com a realização de urocultura em simultâneo, baseando-se na estratégia de que, para uma determinada área geográfica, os agentes etiológicos, bem como o seu padrão de resistências aos antibióticos, são muito previsíveis. Doentes com infecções respiratórias também iniciam terapêutica empírica antes do isolamento laboratorial do agente etiológico. A necessidade desta antibioterapia empírica em diversas patologias torna absolutamente necessário o conhecimento dos principais agentes etiológicos implicados e o seu padrão de resistências em cada zona geográfica (Sader *et al.*, 2001). Por outro lado a selecção empírica de um antibiótico depende de factores clínicos e farmacológicos, devendo ser sempre individualizada. Estes estudos ainda são muito escassos e geralmente são realizados em unidades de saúde centrais, no entanto, os estudos locais em unidades periféricas, de pequena dimensão e com características muito diferentes dos hospitais centrais são importantes de modo a evidenciar a realidade local e a sustentar a terapia empírica a utilizar.

De acordo com as *guidelines* internacionais da *European Association of Urology* (EAU), a utilização empírica de um antibiotico só deve ser realizada se este não apresentar taxas de resistência local superior a 20% (Grabe *et al.*, 2010). Assim, e de acordo com a EAU, no nosso trabalho os antibióticos com menor actividade frente à *E. coli* foram as quinolonas

(ciprofloxacina), os β -lactâmicos (ampicilina, cefalotina, cefuroxima), tetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazole. Quanto a *K. pneumoniae* surgem algumas diferenças significativas, já que apenas dois antibióticos estão abaixo desse patamar, a associação piperacilina-tazobactam (19.8% R) e o imipenemo (0.5% R). Os isolados de *K. oxytoca* apresentam entre 80 e 100% de sensibilidade frente a 99.9% dos antibióticos testados, exceção feita à ampicilina.

A fraca acção das penicilinas frente à *E. coli* e à *K. pneumoniae* está associada com a prevalência de β -lactamases, pelo que se desaconselha a sua utilização quando não associado com um inibidor destas enzimas, como por exemplo a associação amoxicilina-ácido clavulânico. Este facto foi constatado neste estudo, onde se obteve maior susceptibilidade nesta associação do que na utilização dos antibióticos isoladamente. Recentemente, Rodríguez-Baño *et al.* (2004) analisou os resultados de vários episódios de bacteremias causadas por *E. coli* produtora de ESBL e encontrou rácios de mortalidade inferior nos pacientes com terapêutica de β -lactâmico/ β BL ou carbapenemo quando comparado com os que utilizaram cefalosporina ou fluoroquinolonas (9% vs 35%).

A actividade inibitória dos β BL pode variar de acordo com o tipo de inibidor seleccionado bem como com o tipo de ESBL presente. O tazobactam apresenta geralmente uma melhor actividade inibitória que o ácido clavulânico contra ESBL tipo CTX-M, e estes dois agentes são mais eficazes que o sulbactam na inibição de ESBL tipo TEM ou SHV (Falagas e Karageorgopoulos, 2009). No nosso estudo a associação piperacilina-tazobactam apresentou sensibilidades entre 80.2% e 89.9%.

A resistência encontrada às quinolonas, neste estudo, para *K. pneumoniae* e *E. coli* (45.8% e 32.1% respectivamente) pode estar relacionada com a elevada e incontrolada prescrição destes antibióticos ao longo dos anos, possibilidade sustentada pelo facto de Portugal ser o país da União Europeia com a maior taxa de utilização e resistência destes antibióticos (Kahlmeter, 2003). Esta hipótese também pode explicar o facto de nos países do norte da Europa, onde estes antibióticos são menos utilizados, as taxas de resistência serem muito mais baixas (Souli *et al.*, 2008). Comparando o estudo de resistências bacterianas realizado em 1999 no Hospital da Póvoa de Varzim (Isabel Portela, comunicação interna) com os dados obtidos no nosso trabalho verificamos que a percentagem de resistência às quinolonas (ciprofloxacina), aumentou consideravelmente tanto em isolados de *E. coli* (13.4% vs 32.1%) como em *K. pneumoniae* (6.3% vs 45.8%). Esta tendência foi confirmada também nas enterobactérias em estudo para o grupo dos aminoglicosídeos (3-16% vs 11-53%) e para a associação trimetoprim-sulfametoxazole (22-31% vs 30-56%).

O decréscimo de susceptibilidade na maioria dos bacilos Gram negativo à piperacilina-tazobactam, gentamicina e ciprofloxacina em países Europeus (Bélgica, Portugal, França e

Espanha) foi confirmado por Hanberger *et al.* em 1999, sugerindo limites no uso destes compostos na terapêutica empírica.

Analisando separadamente os isolados produtores de ESBL, várias são as diferenças encontradas. Entre os isolados de *E. coli* produtores de ESBL, as taxas de susceptibilidade são muito baixas, só atingindo valores acima de 60% em três antibióticos, piperacilina-tazobactam, nitrofurantoína e imipenemo. Comparando os isolados de *E. coli* produtores de ESBL com os não produtores, verificamos o aumento da taxa de sensibilidade dos isolados ESBLneg em todos os antibióticos testados, no entanto ainda se verificam resistências significativas frente à associação amoxicilina/ácido clavulânico, ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazole e tetraciclina.

K. pneumoniae produtora de ESBL apresenta altas taxas de resistência aos aminoglicosídeos, β -lactâmicos, furanos, quinolonas e trimetoprim-sulfametoxazole. Tetraciclina e imipenemo são os antibióticos com melhor actividade *in vivo* frente à *K. pneumoniae* ESBLpos. Nos isolados não produtores de ESBL esta tendência mantém-se com excepção da tetraciclina. As tetraciclina são antibióticos de primeira ou segunda escolha em infecções urinárias e respiratórias causadas por *K. pneumoniae*, *H. influenzae* e *E. coli*. No entanto como estes microrganismos adquirem facilmente resistência a este antibiótico não se recomenda a sua eleição para as infecções provocadas por microrganismos recorrentes (Sousa, 2006).

A nitrofurantoína é considerada um antimicrobiano de primeira linha no tratamento empírico da infecção urinária (Pitout, 2010). Neste trabalho, obteve-se uma elevada susceptibilidade da *E. coli* à nitrofurantoína (Puerto *et al.*, 2006), mas a *K. pneumoniae* apresentou uma baixa susceptibilidade a este antimicrobiano, facto também relatado em outros estudos (Simões *et al.*, 2006; Correia *et al.*, 2007). Em 2002, no âmbito da implementação no Hospital da Póvoa de Varzim do programa HELICS³-Cirurgia no serviço de Cirurgia/Ortopedia, foi realizado um levantamento de vigilância epidemiológica entre 1999 e 2002, em que 2% das *E. coli* e 16% das *K. pneumoniae* isoladas neste serviço apresentaram resistência à nitrofurantoína (Fernando Fonseca, comunicação interna). Considerando a elevada susceptibilidade da *E. coli* a este antimicrobiano e sendo esta bactéria o microrganismo mais frequentemente associado às infecções do tracto urinário, faz dele uma alternativa terapêutica a considerar (Kahlmeter, 2003). Apesar do seu uso generalizado e muitas vezes em automedicação, este antimicrobiano

³ HELICS _Hospital in Europe Link for Infection Control Trough Surveillance: protocolo europeu de vigilância epidemiológica das IACS

apresenta muitos efeitos adversos, pelo que a sua administração deve ser realizada sempre sob supervisão médica (Sousa, 2006).

Neste estudo, os antibióticos com melhor actividade contra as enterobactérias isoladas foram o imipenemo, o grupo dos aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina e tobramicina), a nitrofurantoína (em *E. coli* e *K. oxytoca*) e a associação piperacilina-tazobactam. De realçar no entanto que a resistência aos aminoglicosídeos está actualmente exacerbada devido à emergência mundial de *E. coli* produtora de ESBL CTX-M-15 na comunidade e à presença dos genes *bla*_{ESBL} em plasmídeos que conferem resistência a outras classes de antibióticos. As CTX-M-15 são muitas vezes associadas com a co-produção da enzima *aac(6')-Ib-cr* (enzima aminoglicosídica modificada) que apresenta elevada capacidade de inactivação da tobramicina e amicacina (Pitout, 2010).

A elevada actividade destes agentes pode estar relacionada com a baixa utilização no tratamento de infecções comunitárias, nomeadamente do imipenemo, já que é um antimicrobiano de uso exclusivo hospitalar e a sua utilização é limitada às infecções agudas graves (Sousa, 2006). No entanto o facto de termos encontrado estirpes resistentes ao imipenemo pode ser indicativo de uma possível e futura disseminação de resistências. No nosso trabalho foram encontrados três isolados resistentes ao imipenemo, duas *E. coli* e uma *K. pneumoniae*. Apenas um dos isolados que apresentou resistência ao imipenemo era produtor de ESBL. Estes dados sugerem a realização de estudos de prevalência e caracterização de carbapenemases em paralelo com os estudos sobre ESBL. Dados similares foram encontrados num estudo Europeu em que 5000 *Enterobacteriaceae* foram testadas frente a β -lactâmicos e uma percentagem de 99.5% de susceptibilidade foi encontrada para os carbapenemos (Nijssen *et al.*, 2004).

A produção de β -lactamases, nomeadamente metalo- β -lactamases, associada com a perda das porinas específicas de carbapenemos, pode ser o mecanismo responsável pela resistência a carbapenemos nas estirpes hospitalares (Sousa, 2006).

A resistência aos carbapenemos, apesar de rara parece estar a emergir, fazendo sentido, obter precocemente dados de forma a monitorizar a situação e tomar decisões quanto a medidas de prevenção (Pitout, 2010).

CONCLUSÃO

O aparecimento e rápida disseminação de enterobactérias produtoras de ESBL conduzem à necessidade de conhecer com exactidão a origem destas espécies: hospital ou comunidade. As unidades periféricas de cuidados de saúde são ambientes relevantes na disseminação da resistência aos antibióticos. A presença de genes que codificam para ESBLs juntamente com genes que conferem resistência a vários grupos de antibióticos diminui fortemente as opções terapêuticas. O controlo e prevenção da infecção são portanto, altamente prioritários perante doentes infectados com *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de ESBLs, devendo ser isolados dos restantes doentes de modo a evitar a ocorrência de surtos em enfermarias. A informação do laboratório também é fundamental, reportando a presença de ESBL e a resistência total aos β -lactâmicos.

Resumidamente, as principais conclusões que podemos retirar deste trabalho são as seguintes:

- Dos isolados produtores de ESBL estudados, a maior percentagem eram provenientes de indivíduos do género feminino com idade superior a 60 anos;
- A produção de ESBL foi mais comum em *K. pneumoniae* seguida da *E. coli*;
- Doentes em regime de internamento revelaram maior frequência de isolados produtores de ESBL;
- O serviço de medicina foi responsável por uma parte considerável das *E. coli* produtoras de ESBL;
- As *E. coli* em estudo apresentaram elevadas taxas de resistência aos antibióticos tradicionalmente utilizados em terapia empírica das ITU (ciprofloxacina, tetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazole, cefuroxima e cefalotina);

- Em relação às *K. pneumoniae* estudadas, os antibióticos que demonstraram menor actividade foram a nitrofurantoína, os aminoglicosídeos (gentamicina e tobramicina);
- Os antibióticos com melhor actividade frente às enterobactérias foram o imipenemo e a associação piperacilina-tazobactam;
- *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentaram sensibilidades diferentes em relação aos seguintes antibióticos: nitrofurantoína e aminoglicosídeos com boa actividade contra *E. coli* e tetraciclina contra *K. pneumoniae*;
- A resistência verificada para outros antibióticos (não β -lactâmicos) foi mais comum em isolados produtores de ESBL.

Em resumo, a prescrição de terapêutica empírica adequada bem como a profilaxia, devem ser sustentadas por uma análise periódica das susceptibilidades dos principais agentes causais presentes numa área geográfica ou numa instituição de saúde. O conhecimento dos determinantes de resistência presentes bem como a sua monitorização e/ou caracterização permitem obter dados importantes epidemiológicos que permitem estabelecer rigorosos protocolos de decisão terapêutica bem como implementar procedimentos de controlo de infecção de modo a minimizar a disseminação desses mesmos determinantes.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Em estudos futuros seria pertinente o estudo da incidência e prevalência do fenómeno ESBL entre outros isolados bacterianos, para além dos contemplados neste estudo (em espécies como *Enterobacter* spp., *Citrobacter* pp., *Serratia* spp., *Providencia* spp. e *Pseudomonas* spp., produtoras naturais de β -lactamases AmpC que podem no entanto produzir ESBL em pequenas quantidades devido à exposição aos β -lactâmicos).

Futuramente seria também uma mais-valia a caracterização genotípica dos isolados ESBL encontrados de modo a identificar os genes que codificam para as β -lactamases presentes e assim compreender melhor a epidemiologia local. Um estudo mais alargado seria necessário para estabelecer diferenças reais entre os doentes com infecções nosocomiais e infecções comunitárias, bem como estudar o consumo antimicrobiano na instituição a fim de estabelecer correspondência com as resistências obtidas. A implementação de metodologias genotípicas complementar a caracterização fenotípica bem como permitiria obter melhores ferramentas para refrear a disseminação destas estirpes.

O Serviço de Patologia Clínica deverá periodicamente divulgar dados sobre os agentes etiológicos mais frequentes e o padrão de susceptibilidades aos antibióticos, na área geográfica abrangida, permitindo desse modo que os clínicos instaurem tratamentos empíricos adequados, baseado na realidade institucional na qual o doente está inserido, diminuindo os casos de falência terapêutica e prevenindo o aparecimento e disseminação de resistências.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alanis AJ. 2005, Resistance to Antibiotic: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research*, 36:697-705
- Almeida MC, Simões MJS, Raddi MSG. 2007. Ocorrência de infecção urinária em pacientes de um hospital universitário. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28(2):215-219. ISSN 1808-4532.
- Amaral SN, Peixe LV, Machado E. 2009. Characterization of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) among *Enterobacteriaceae* from Portuguese hospital. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*. Porto: edições Universidade Fernando Pessoa. ISSN 1646-0480; 6:254-263
- Ambler RP. 1980. The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, B289:321-331
- Araújo O, da Silva CB, Diegues AR, Arkader R, Cabral EAF, Afonso MR, Louzada ME, Albertoni ACS. 2007. Cefepime Restriction Improves Gram-Negative Overall Resistance Patterns in Neonatal Intensive Care Unit. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 11(2):277-280
- Arnoni MV, Berezin EN, Martino MDV. 2007. Risk factors Nosocomial Bloodstream Infection caused by Multidrug Resistant Gram-negative Bacilli in Pediatrics. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 11(2):267-27
- Augusti GR, Superti S, Zavascki AP. 2007. Prevalência de produção de Beta-lactamases de espectro estendido em bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. *Scientia Medica*, Porto Alegre 17(4):192-196
- Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on Beta-lactamases. *Drug Resistance Updates*, 9:142-156
- Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thornsberry C. 1991. Comparison of the E test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(3):533-538

-
- Barroso H, Freitas-Vieira A, Lito LM, Melo Cristino J, Salgado MJ, Ferreira Neto H, Sousa JC, Soveral G, Moura T, Duarte A. 2000. Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases at a Portuguese hospital: TEM-10 as the endemic enzyme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45:611-616
- Bermejo J, Bencomo B, Arnesi N, Lesnaberes P, Borda N, Notario R. 2006. Alta correlación entre el consumo de ciprofloxacina y la prevalência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamasas de espectro extendido. *Revista Chilena de Infectología.*, 23 (4): 316-320
- Bradford PA. 2001. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology and Detection of this Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4):933-951
- Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV, Gouriou S, Picard B, Denamur E. 2005. Genetic background of *Escherichia coli* and Extended-spectrum β -Lactamase type. *Emerging Infectious Diseases*, 11(1):54-61
- Bush K, Jacoby GA, Amicosante G et al. 2009. Comment on: Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need.[Letters to the Editor] *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64:212-213
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. 1995. A functional classification scheme for β -Lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6):1211-1233
- Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1):144-153
- Carattoli A. 2008. Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamases producers. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1):117-123
- Carattoli A. 2009. Resistance Plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53:2227-2238
- Castro B, Montesinos I, Fuster-Jorge P, Delgado T, Miguel-Gómez A, Sierra A. 2009. Epidemiología de las enterobacterias productoras de bacteriemias en los pacientes de una unidade de cuidados intensivos neonatal. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, doi:10.1016/j.eimc.2009.05.013
- Cattoir V. 2008. Les nouvelles Beta-Lactamases a Spectre Etendu (BLSE). MAPAR_ Comunicações Científicas [acedido em: 15-01-2010], 204-209. Disponível em: <http://www.mapar.org/article/pdf/731/>
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 19th informational supplement, CLSI document M100-S19. Ed. Wayne, PA, USA
- Colodner R. 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. *American Journal of Infection Control*, 33:104-107
-

- Conceição A, Brízio A, Duarte A, Lito LM, Melo Cristino J, Salgado MJ. 2005. First description of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46:477-478
- Coque TM, Baquero F, Canton R. 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. [acedido em 05-03-2010]. *Eurosurveillance*, 13(47):pii=19044. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19044>
- Correia C, Costa E, Peres A, Alves M, Pombo G, Estevinho L. 2007. Etiologia das Infecções do Tracto Urinário e sua susceptibilidade aos Antibióticos. *Acta Médica Portuguesa*, 20:543-549
- Costa AC, Noriega E, Fonseca LF, Silva MG. 2009. Inquérito Nacional de Prevalência de Infecção (25 de Março de 2009). Relatório, Setembro de 2009. Direcção-Geral da Saúde
- Dalmarco EM, Blatt SL, Córdova CM. 2006 Identificação laboratorial de β -lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) -Revisão. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 38(3):171-177
- Denton M. 2007. *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29(3):S9-S22
- Desimoni MC, Esquivel GP, Merino LA. 2004. Colonización fecal por cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en una Unidade Neonata de Cuidados Intensivos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2(9):507-511
- Dutour C, Bonnet R, Marchandin H, Boyer M, Chanal C, Sirot D, Sirot J. 2002. CTX-M-1, CTX-M-3 and CTX-M-14 β -lactamases from *Enterobacteriaceae* isolated in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(2):534-537
- Dzierzanowska D, Kaminska W, Semczuk K, Borowiec D, Matysiak M, Szumala-Kakol A, Gierczynski R, Patzer J. 2010. Carriage of genes for various extended-spectrum β -lactamases: a novel resistance strategy of *Klebsiella pneumoniae* in Poland. [Short communication]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35:392-395
- Endimiani A, Bonomo RA. 2008. ESBLs: An emerging problem in pediatric infectious diseases. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*, 3:217-220
- European Antimicrobial Surveillance System (EARSS). 2009. On-going surveillance of *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* (Annual Report 2008). RIVM. ISBN:978-90-6960-236-3
- Falagas ME, Karageorgopoulos DE. 2009. Extended-spectrum β -lactamases-producing organisms. *Journal of Hospital Infection*, 73:345-354
- Fernandes R, Gestoso A, Freitas J, Santos P, Prudêncio C. 2009. High resistance to fourth-generation cephalosporins among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases isolate in Portugal. [Letter to the editor]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33:183-192

- Ferreira S, Toleman M, Ramalheira E, Da Silva G, Walsh T, Mendo S. 2010. First description of *Klebsiellae pneumoniae* clinical isolates carrying both *qnrA* and *qnrB* genes in Portugal. [Short communication]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.01.019
- Ferreira S. 2007. Detecção de β -lactamases de Espectro Expandido em *E. coli* e *K. pneumoniae* [dissertação]. [Aveiro]: Universidade de Aveiro.
- Freitas F, Ribeiro JM, Queirós AM, Silva M. 2006. Frequência de Isolados Clínicos de *Escherichia coli* produtores de β -lactamases de Largo Espectro. *Bioanálise*, Ano III (Nº2):90-93
- Friedman ND, Kaye KS, Stout JE *et al.* 2002. Health care-Associated Bloodstream Infections in Adults: A Reason to Change the Accepted Definition of Community-Acquired Infections. *Annals of Internal Medicine*, 137(10):791-797
- Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, Cantón R, Walsh TR. 2009a. Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63:1-4
- Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, Cantón R, Walsh TR. 2009b. Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need- authors's response. [Letters to the Editor]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64:213-214
- Gonçalves D. 2008. β -lactamases de espectro alargado em *Enterobacteriaceae* da flora fecal de idosos [dissertação]. [Aveiro]: Universidade de Aveiro
- Govinden U, Mocktar C, Moodley P, Sturm AW, Essack SY. 2007. Geographical evolution of the CTX-M β -lactamase –an update. *African Journal of Biotechnology*, 6(7):831-839
- Grabe M, Bjerklund-Johansen TE, Botto H, Çek M, Naker KG, Tenke P, Wagenlehner F. 2010. Guidelines on Urology Infections. In: EAU Guidelines, edition presented at the 25th EAU Annual Congress, Barcelona. European Association of Urology (EAU). ISBN: 978-90-79-754-70-0
- Hageman JC, Fridkin SK, Mohamed JM, Steward CD, Aynes RP, Tenover FC. 2003. Antimicrobial proficiency testing of National Nosocomial Infections Surveillance System Hospital Laboratories. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 24:356-361
- Hanberger H, Garcia-Rodriguez JA, Gobernado M, Goossens H, Nilsson LE, Struelens MJ, French and Portuguese ICU Study Groups. 1999. Antibiotic Susceptibility among Aerobic Gram-negative Bacilli in Intensive Care Units in 5 European Countries. *Journal of the American Medical Association*, 281(1):67-71
- Hernández Bello JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Pascual A e Grupo para el estudio de las Infecciones Hospitalarias (GEIH). 2004. Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) producidas por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* descritas por primera vez en España (Proyecto GEIH-BLEE) [Comunicação n.º 006]. XI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Bilbao, 16-19 de Maio de 2004. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(Supl1):1-230

- Ho PL, Wong R, Chow KH, Yip K, Wong S, Que TL. 2008. CTX-M type Beta-lactamases among fecal *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in non-hospitalized children and adults. [Brief Communication]. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 41:428-432
- Hoban DJ, Bouchillon SK, Hawswr S, Badal RE. 2010. Trends in the frequency of multiple drug-resistant *Enterobacteriaceae* and their susceptibility to ertapenem, imipenem, and other antimicrobial agents: data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends 2002 to 2007. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 66:78-86
- Huang SS, Lee MH, Leu HS. 2006. Bacteremia due to extended-spectrum Beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* other than *Escherichia coli* and *Klebsiella*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 39:496-502
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). 2004. Orientações para a Elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia. Programa Nacional de Controlo de Infecção. Ministério da Saúde
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). 2010. Resistência aos Antibióticos [acedido em 01-08-2010]. Disponível em: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/DoencasInfecciosas/AreasTrabalho/ResistencAnti/Paginas/inicial.aspx>
- Jacoby GA, Munoz-Price LS. 2005. The New β -Lactamases. *The New England Journal of Medicine*, 352(4):380-391
- Kahlmeter G. 2003. An International survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51:69-76
- Kahlmeter G. 2008. Breakpoints for intravenously used cephalosporins in *Enterobacteriaceae*-EUCAST and CLSI breakpoints. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1):169-174
- Khanfar HS, Bindayna KM, Senok AC, Botta GA. 2009. Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *K. pneumoniae*: trends in the hospital and community settings. *Journal of Infection in Developing Countries*, 3(4):295-299
- Ko KS, Lee MY, Song JH *et al.*, 2008. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated in Korean hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 61:453-459
- Kobayashi CCBA, Sadoyama G, Vieira JDG. 2009. Avaliação da resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, em um hospital público de Goiânia, Go-Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 38(3):165-178
- Kotsakis SD, Papagiannitsis CC, Tzelepi E, Legakis NJ, Miriagou V, Tzouveleki LS. 2010. GES-13, a β -Lactamase variant Possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3):1331-1333
- Kuo KC, Shen YH, Hwang KP. 2007. Clinical implications and risk factors of extended-spectrum Beta-lactamases-producing *Klebsiellae pneumoniae* infection in children: a case control

- retrospective study in a medical center in southern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 40:248-254
- Livermore DM, Struelens M, Amorim J *et al.* 2002. Multicentre evaluation of the VITEK2 Advanced Expert System for interpretive reading of antimicrobial resistance tests. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49:289-300
- Machado E, Coque TM, Canton R, Novais Â, Sousa JC, Baquero F, Peixe L. 2010. High diversity of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60:1370-1374
- Machado Sequeira CM. 2004. Resistência aos antibióticos: O uso inadequado dos antibióticos na prática clínica. *Revista de la Ofil*, 14(1): 45-68.
- Marín M, Gudiol F. 2003. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21 (1): 42-55
- Medeiros AA. 1984. β -lactamases. *British Medical Bulletin*, 40(1): 18-27
- Mendonça N, Ferreira E, Louro D, Caniça M. 2009. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended-and-broad-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34:29-37
- Mendonça N, Leitão J, Manageiro V, Ferreira E, Caniça M. 2007. Spread of Extended-Spectrum β -Lactamase CTX-M-Producing *Escherichia coli* Clinical isolates in Community and Nosocomial Environments in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51:1946-1955
- Mendonça N, Louro D, Castro AP, Diogo J, Caniça M. 2006. CTX-M-15, OXA-30 and TEM-1 producing *Escherichia coli* in two Portuguese regions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57:1014-1016
- Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR *et al.* 2006. Extended-spectrum β -lactamases-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food animal farms and sewage). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58:211-215
- Moland ES, Hong AG, Thomson KS, Larone DH, Hanson ND. 2007. *Klebsiella pneumoniae* isolate producing at least eight different β -lactamases, including AmpC and KPC β -lactamases [Letter to the editor]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(2):800-801
- Moubareck C, Brémont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T. 2009. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8):3579-3581
- Nakasone I, Kinjo T, Yamane N, Kisanuki K, Shiohira CM. 2007. Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the Advanced Expert System for detection of antimicrobial resistances: VITEK-2 Compact system identification and antimicrobial susceptibility testing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58:191-198
- Nicolas-Chanoine MH, Jarlier V and 'La Collégiale' de Bactériologie-Virologie-Hygiène Hospitalière de l'Assistance Publique. 2008. Extended-spectrum β -lactamases in long-term-care facilities. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1):111-116

- Nijssen S, Florijn A, Bonten MJM, Schitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. 2004. Beta-lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European *Enterobacteriaceae* isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24:585-591
- Oteo J, Navarro C, Cercenado E *et al.*, 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
- Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended-Spectrum β -Lactamses: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4):657-686
- Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, Bonomo RA and the International *Klebsiella* Study Group. 2003. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 47(11):3554-3560
- Peirano G, Pitout JDD. 2010. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35:316-321
- Perci RD. 1994. Plasmídeos Bacterianos. Akrópolis, *Revista de Ciências humanas da UNIPAR*, 2(6): 23-28
- Pereira A, Filho J, Tognim MA, Sader H. 2003. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiellae pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 39(4):301-308
- Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. 2007. The continuing challenge of ESBLs. *Current Opinion in Pharmacology*, 7:459-469
- Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Kugler K and the Sentry Participants Group. 1998. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada, 1997). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(7):1762-1770
- Picão R, Gales A. 2007. β -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: pesadelo ou só Imaginação? *Prática Hospitalar*, ano IX 49:79-84
- Pitout JDD, Laupland KB. 2008. Extended-spectrum β -lactamases-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, 8:159-166
- Pitout JDD, Nordmann P, Laupland KB and Poiret L. 2005. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56:52-59
- Pitout JDD, Sanders CC, Sanders Jr. WE. 1997. Antimicrobial Resistance with Focus on β -Lactam Resistance in Gram-negative Bacilli. *American Journal of Medicine*, 103:51-59

-
- Pitout, JDD. 2010. Infections with Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* (Changing Epidemiology and drugs Treatment Choices). *Drugs*, 70(3):313-333
- PORTUGAL. 2007. Circular Normativa n.º 20/DSQC/DSC de 24/10/07. Plano Operacional de Controlo da Infecção para os Cuidados de Saúde Primários. Direcção-Geral da Saúde
- Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção associada aos Cuidados de Saúde (PNCI). Direcção-Geral da Saúde, Março 2007
- Puerto AS, Fernández JG, Luna del Castillo JD, Pino MJS, Angulo GP. 2006. In vitro activity of β -lactam and non- β -lactam antibiotics in extended-spectrum β -lactamases-producing clinical isolates of *Escherichia coli*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 54:135-139
- Pujol M, Peña C. 2003. El significado clínico de las betalactamasas de espectro extendido. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(2): 69-71
- Rennie RP, Jones RN, Mutnick AH and the SENTRY Program Study Group (North America). Occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of pathogens isolated from skin and soft tissue infections: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada, 2000). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 45(2003):287-293
- Resende da Silva AJ, Oliveira FMD, Ramos MEP. 2009. Infecção associada ao Cateter Venoso Central - Revisão da Literatura. *Revista Referência*, 11(11):125-134
- Rice LB. 2009. The Clinical consequences of antimicrobial resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 12:476-481
- Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Matínez-martínez L, Munian MA, Perea EJ, Pérez-Cano R, Pascual A. 2004. Epidemiology and Clinical Features of Infectious Caused by Extended-Spectrum Beta-lactamase-Producing *Escherichia coli* in Nonhospitalized Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3):1089-1094
- Rodríguez-Baño J, Navarro MD. 2008. Extended-spectrum β -lactamases in ambulatory care: a clinical perspective. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1):104-110
- Sader HS, Mendes RE, Gales AC; Jones RN, Pfaller MA, Zoccoli C, Sampaio J. 2001. Perfil de sensibilidade a antibióticos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros – resultados do programa SENTRY, 1997 e 1998. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 27(2):59-67
- Sánchez MU, Bello HT, Domínguez MY, Mella SM, Zemelman RZ, González GR. 2006. Transferência de β -lactamasas de espectro extendido desde cepas hospitalares de *Klebsiellae pneumoniae* a otras espécies de enterobacterias. *Revista Médica do Chile*, 134:415-420
- Sanders CC, Barry AL, Washington JÁ, Shubert C, Moland ES, Traczewski MM, Knap C, Mulder R. 1996. Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing members of the Family *Enterobacteriaceae* with the Vitek ESBL Test. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(12):2997-3001
-

- Sanders CC. 1992. β -Lactamases of Gram-Negative Bacteria: New Challenges for New Drugs. *Clinical Infectious Diseases*, 14:1089-1099.
- Santos NQ. 2004. A Resistência Bacteriana no contexto da Infecção Hospitalar. Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. *Texto & Contexto Enfermagem*, 13(n.esp): 64-70
- Schwaber MJ, Raney PM, Rasheed JK, Biddle JW, Williams P, McGowan Jr JE, Tenover FC. 2004. Utility of NCCLS guidelines for identifying Extended-Spectrum β -Lactamases in Non-*Escherichia coli* and Non-*Klebsiella* spp. of *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1):294-298
- Simões AT, Ribeiro G, Silva GJ. 2006. Detecção de β -Lactamases de Espectro Alargado do tipo CTX-M nos Hospitais da Universidade de Coimbra. *Bioanálise*. Ano III (Nº2):56-62
- Soares MJ, Alves V, Read A, Monteiro M, Gomes A, Infante C, Castro D, Couto MJ, Carvalho S, Dias T, Silva T. (2009). Evolução de Resistências 1999-2006 e Ecologia Hospitalar 2008. Hospital Pedro Hispano (ULSM), serviço de Patologia Clínica [acedido em 25-08-2010] Disponível em: www.ulsm.pt/fotos/gca/1243014790evolucao_de_resistencias_1999-2008_e_ecologia_hospitalar.pdf
- Souli M, Galani I, Giamarellou H. 2008. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Eurosurveillance* [Internet],13(47):pii=19045. [acedido em 25-06-2010]. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19045>
- Sousa JC, Peixe LM, Ferreira H, Pinto ME, Nascimento MSJ, Sousa MI, Cabral M. 1998. Antibióticos. In *Microbiologia* (Editors: Ferreira WFC, Sousa JC), volume 1, pp. 239-269, Lidel Edições Técnicas. Lisboa. Livro microbiologia
- Sousa JC. 2006. Manual de Antibióticos Antibacterianos. 2ªed. Edições Universidade Fernando Pessoa
- Sousa Junior MA, Ferreira ES, Conceição GC. 2004. Betalactamases de espectro ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. *NewsLab*, 63:152-174
- Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, Amicosante G *et al.* 2002. Occurrence of Extended-Spectrum β -Lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: Implications for Resistance to β -Lactams and Other Antimicrobial Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(1):196-202
- Spanu T, Sanguinetti M, Tumbarello M, D'Inzeo T, Fiori B, Posteraro B, Santangelo R, Cauda R, Fadda G. 2006. Evaluation of the new VITEK 2 Extended-Spectrum Beta-lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL production in *Enterobacteriaceae* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9):3257-3262
- Steward CD, Rasheed JK, Hubert SK *et al.*, 2001. Characterization of clinical isolates of *Klebsiellae pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Extended-Spectrum β -Lactamase detection methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8):2864-2872

- Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, Santos O'Connor F, Giesecke J, the European NDM-1 Survey Participants. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing *Enterobacteriaceae*: emergence and response in Europe. *Eurosurveillance*. [Internet] 2010;15(46):pii=19716 [accedido em 27-11-2010]. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19716>
- Tragante CR, Ceccon MEJR, Falcão MC, Seiti M, Sakita N, Vieira RA. 2008. Prevalência de sepse por bactérias Gram negativo produtoras de Beta-lactamase de espectro estendido em Unidades de Cuidados Intensivos Neonatal. *Revista Paulista de Pediatria*, 26(1):59-63
- Treviño M, Martínez-Lamas L, Romero-Jung P, Varón C, Moldes L, García-Riestra Regueiro BJ. 2009. Comparación entre las pruebas para la detección de betalactamasas de espectro extendido de los sistemas Vitek 2 y Phoenix. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(10):566-570
- Trupia LA, Mollerach A, Di Conza JÁ, Radice M, Mugna V. 2005. Comparación de três métodos microbiológicos para detección de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas en Santa Fe (Argentina). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(9):525-528
- Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. 2005. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 8:525-533
- World Health Organization (WHO). 2009. The Burden of health care-associated infection worldwide [accedido em 06-05-2010]. Disponível em: http://www.who.int/gpsc/country_work/summary_20100430_en.pdf
- Zong Z, Partridge SR, Iredell JR. 2009. A *bla*_{VEB-1} variant, *bla*_{VEB-6}, associated with repeated elements in a complex genetic structure. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 53(4):1693-169

ANEXOS

ANEXO I

A carta de Identificação de Gram negativo VITEK® 2 (GN) deve ser usada com os sistemas VITEK® 2 Compact para a identificação automática dos bacilos Gram negativo fermentadores e não fermentadores de maior relevância clínica. A carta de identificação VITEK® 2 GN é um dispositivo de utilização única constituído pelos seguintes testes bioquímicos:

Poço	Teste	Mnemónica	Quantidade/ Poço
2	Ala-Fe-Pro-ARILAMIDASE	APPA	0,0384 mg
3	ADONITOL	ADO	0,1875 mg
4	L-Pirrolidonil - ARILAMIDASE	PyrA	0,018 mg
5	L-ARABITOL	IARL	0,3 mg
7	D-CELOBIOSE	dCEL	0,3 mg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0,036 mg
10	PRODUÇÃO DE H ₂ S	H ₂ S	0,0024 mg
11	BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG	0,0408 mg
12	Glutamil Arilamidase pNA	AGLTp	0,0324 mg
13	D-GLUCOSE	dGLU	0,3 mg
14	GAMA-GLUTAMIL-TRANSFERASE	GGT	0,0228 mg
15	FERMENTAÇÃO/GLUCOSE	OFF	0,45 mg
17	BETA-GLUCOSIDASE	BGLU	0,036 mg
18	D-MALTOSE	dMAL	0,3 mg
19	D-MANITOL	dMAN	0,1875 mg
20	D-MANOSE	dMNE	0,3 mg
21	BETA-XILOSIDASE	BXYL	0,0324 mg
22	BETA-Alanina arilamidase pNA	BAlap	0,0174 mg
23	L-Prolina ARILAMIDASE	ProA	0,0234 mg
26	LIPASE	LIP	0,0192 mg
27	PALATINOSE	PLE	0,3 mg
29	Tirosina ARILAMIDASE	TyrA	0,0276 mg
31	UREASE	URE	0,15 mg
32	D-SORBITOL	dSOR	0,1875 mg

Continua na página seguinte

Conteúdo dos poços da carta GN (continuação):

Poço	Teste	Mnemónica	Quantidade/ Poço
33	SACAROSE/SUCROSE	SAC	0,3 mg
34	D-TAGATOSE	dTAG	0,3 mg
35	D-TREALOSE	dTRE	0,3 mg
36	CITRATO (SÓDIO)	CIT	0,054 mg
37	MALONATO	MNT	0,15 mg
39	5-QUETO-D-GLUCONATO	5KG	0,3 mg
40	Alcalinização L-LACTATO	ILATk	0,15 mg
41	ALFA-GLUCOSIDASE	AGLU	0,036 mg
42	Alcalinização SUCINATO	SUCT	0,15 mg
43	Beta-N-ACETIL-GALACTOSAMINIDASE	NAGA	0,0306 mg
44	ALFA-GALACTOSIDASE	AGAL	0,036 mg
45	FOSFATASE	PHOS	0,0504 mg
46	Assimilação Glicina ARILAMIDASE	GlyA	0,012 mg
47	ORNITINA DESCARBOXILASE	ODC	0,3 mg
48	LISINA DESCARBOXILASE	LDC	0,15 mg
52	BASE DECARBOXILASE	ODEC	NA
53	Assimilação L-HISTIDINA	IHISa	0,087 mg
56	CUMARATO	CMT	0,126 mg
57	BETA-GLUCORONIDASE	BGUR	0,0378 mg
58	RESISTÊNCIA O/129 (comp.vibrio.)	O129R	0,0105 mg
59	Glu-Gli-Arg-ARILAMIDASE	GGAA	0,0576 mg
61	Assimilação L-MALATO	IMLTa	0,042 mg
62	ELLMAN	ELLM	0,03 mg
64	Assimilação L-LACTATO	ILATa	0,186 mg

Nota: os poços entre 1 e 64 não mencionados são poços vazios Fonte: BioMérieux, Marcy L'Étoile, França

ANEXO II

Composição da carta de sensibilidade antimicrobiana para Gram negativo (AST-N060)

Antibiótico	Código	Concentração (µg/mL)	Intervalo de CMI	
			≤	≥
Amicacina	AN	8, 16, 64	2	64
Amoxicilina-Ácido clavulânico	AMC	4/2, 16/8, 32/16	2/1	32/16
Ampicilina	AM	4, 8, 32	2	32
Cefalotina	CF	2, 8, 32	2	64
Cefepima	FEP	2, 8, 16, 32	1	64
Cefotaxima	CTX	1, 4, 16, 32	1	64
Ceftazidima	CAZ	1, 2, 8, 32	1	64
Cefuroxima	CXM	2, 8, 32	1	64
Ciprofloxacina	CIP	0.5, 2, 4	0.25	4
ESBL	ESB	FEP 1, CTX 0.5, CAZ 0.5, FEP/CA 1/10, CTX/CA 0.5/4, CAZ/CA 0.5/4	NEG	POS
Gentamicina	GM	4, 16, 32	1	16
Levofloxacina	LEV	0.5, 4, 8	0.25	8
Meropenemo	MEM	0.5, 4, 16	0.25	16
Nitrofurantoína	FT	16, 32, 64	16	512
Norfloxacina	NOR	1, 8, 32	0.5	16
Piperacilina-Tazobactam	TZP	4/4, 16/4, 128/4	4/4	128/4
Tetraciclina	TE	2, 4, 8	1	16
Tobramicina	TM	8, 16, 64	1	16
Trimetoprim-Sulfametoxazole	SXT	0.5/9.5, 2/38, 16/304	20(1/19)	320(16/304)

† Concentrações equivalentes em eficácia ao método padrão; Para ESBL: FEP é cefepima, CTX é cefotaxima, CAZ é ceftazidima e CA é ácido clavulânico. Para estirpes ESBL positivas, o resultado do teste deve ser interpretado como de resistência a todas as penicilinas, cefalosporinas e ao aztreonamo; NEG = Negativo (um resultado de teste ESBL negativo não exclui a presença de uma ESBL mascarada por uma β-lactamase AmpC; POS = Positivo; Fonte: BioMérieux (bula AST-N060 refº22147)

ANEXO III

Composição da carta de sensibilidade antimicrobiana para Gram negativo (AST-N151)

Antibiótico	Código	Concentração [†] (µg/mL)	Intervalo de CMI	
			≤	≥
Amicacina	AN	8, 16, 64	2	64
Amoxicilina-Ácido clavulânico	AMC	4/2, 16/8, 32/16	2/1	32/16
Ampicilina	AM	4, 8, 32	2	32
Cefotaxima	CTX	1, 4, 16, 32	1	64
Ceftazidima	CAZ	1, 2, 8, 32	1	64
Cefuroxima	CXM	2, 8, 32	1	64
Ciprofloxacina	CIP	0.5, 2, 4	0.25	4
Ertapenemo	ETP	0.5, 1, 6	0.5	8
ESBL	ESB	FEP 1, CTX 0.5, CAZ 0.5, FEP/CA 1/10, CTX/CA 0.5/4, CAZ/CA 0.5/4	NEG	POS
Gentamicina	GM	4, 16, 32	1	16
Levofloxacina	LEV	0.25, 0.5, 2, 8	0.25	8
Meropenemo	MEM	0.5, 2, 9, 12	0.25	16
Nitrofurantoína	FT	16, 32, 64	16	512
Piperacilina-Tazobactam	TZP	4/4, 16/4, 32/4, 64/4	4	128
Tigeciclina	TGC	0.75, 2, 4	0.5	8
Tobramicina	TM	8, 16, 64	1	16
Trimetoprim-Sulfametoxazole	SXT	1/19, 4/76, 16/304	20(1/19)	320(16/304)

[†] Concentrações equivalentes em eficácia ao método padrão; Para ESBL: FEP é cefepima, CTX é cefotaxima, CAZ é ceftazidima e CA é ácido clavulânico. Para estirpes ESBL positivas, o resultado do teste deve ser interpretado como de resistência a todas as penicilinas, cefalosporinas e ao aztreonam; NEG = Negativo (um resultado de teste ESBL negativo não exclui a presença de uma ESBL mascarada por uma β-lactamase AmpC; POS = Positivo; Fonte: BioMérieux (bula AST-N0151 ref#22346)

ANEXO IV

Técnica de coloração diferencial pelo Método de Gram (Becton, Dickinson and Company, USA):

- Cobrir o esfregaço já fixado, com solução de violeta de cristal durante 1 minuto.
- Retirar, lavando suavemente com água corrente fria
- Cobrir com lugol e deixar actuar durante 1 minuto.
- Lavar suavemente com água corrente fria.
- Descorar com álcool acetona até que não saia mais cor violeta do esfregaço.
- Lavar suavemente com água corrente fria.
- Cobrir a superfície com solução de fúcsina básica durante 1 minuto.
- Lavar com água corrente fria e deixar secar ao ar.
- Examinar ao microscópio

Resultados previstos e de rendimento:

<i>Gram negativo</i>	<i>Célula de cor rosa brilhante ou fúcsia</i>
<i>Gram positivo</i>	<i>Célula de cor violeta brilhante ou violeta escuro</i>

ANEXO V

Resultados VITEK®2 dos organismos de controlo de qualidade segundo as normas CLSI, analisados com as cartas AST-N060 e AST- N151

Antibiótico	Código	<i>E. coli</i> ATCC® 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC® 700603
Amicacina	AN	≤ 2-4	-
Amoxicilina-Ácido clavulânico	AMC	≤ 2-8	-
Ampicilina	AM	≤ 2-8	-
Cefalotina	CF	4-16	-
Cefepima	FEP	≤ 1	-
Cefotaxima	CTX	≤ 1	-
Ceftazidima	CAZ	≤ 1	-
Cefuroxima	CXM	2-8	-
Ciprofloxacina	CIP	≤ 0.25	-
Ertapenemo	ETP	≤ 0.5	-
ESBL	ESB	NEG	POS
Gentamicina	GM	≤ 1	-
Levofloxacina	LEV	≤ 0.25	-
Meropenemo	MEM	≤ 0.25	-
Nitrofurantoína	FT	≤ 16	-
Norfloxacina	NOR	≤ 0.5	-
Piperacilina-Tazobactam	TZP	≤ 4	-
Tetraciclina	TE	≤ 1-2	-
Tigeciclina	TGC	≤ 0.5	-
Tobramicina	TM	≤ 1	-
Trimetoprim-Sulfametoxazole	SXT	≤ 20	-