

Índice

1. A resistência bacteriana como um problema de saúde pública	8
2. Antibióticos β -lactâmicos	9
3. Mecanismos de Resistência	13
4. β -lactamases	14
4.1. Origem e disseminação	14
4.2. Classificação das ESBLs	16
4.3. β -lactamases de largo espectro mais comuns	17
4.4. Amp C β -lactamases	18
4.5 Carbapenemases	19
5. Transmissão de genes de resistência	20
6. Detecção laboratorial de genes de resistência	21
6.1. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	21
6.2. Eletroforese	24
7. Objectivos	26
8. Materiais e Métodos	27
8.1. Isolados bacterianos	27
8.2. Teste de suscetibilidade aos antibióticos e deteção fenotípica de β -lactamases	27
8.2.1. Vitek 2 Advanced Expert System (AES) BioMérieux	27
8.2.2. Pesquisa fenotípica de β -lactamases por método de difusão em disco	28
8.2.3. Pesquisa fenotípica de Amp C	29
8.3. Pesquisa Molecular de β -lactamases	30
8.3.1. Extração de DNA	30
8.3.2. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	30
8.3.3. Identificação dos produtos de PCR por eletroforese	31

8.4. Tipagem dos isolados bacterianos	32
9. Resultados e Discussão	32
9.1. Isolados bacterianos e produtos biológicos	32
9.2. Suscetibilidade dos isolados aos antimicrobianos	35
9.3. Detecção das β -lactamases pelo teste fenotípico	42
9.4. Pesquisa de β -lactamases por métodos moleculares	46
9.5 Genotipagem dos isolados	50
10. Conclusões Finais	57
11. Bibliografia	59

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura do peptidoglicano	9
Figura 2 – Estrutura das quatro famílias de antibióticos β -lactâmicos	10
Figura 3 – Representação esquemática de uma experiência de PCR	23
Figura 4 – Esquema representativo de um aparelho de eletroforese horizontal	25
Figura 5 – Percentagem das espécies e géneros de Enterobactérias resistentes à ceftazidima e/ou cefotaxima provenientes dos HUC	34
Figura 6 – Distribuição dos isolados bacterianos pelos produtos biológicos	34
Figura 7 – Suscetibilidade aos antibióticos testados no Vitek 2 AES (BioMérieux, França)	37
Figura 8 – Estrutura molecular de tetraciclina e da tigeciclina	40
Figura 9 – Antibiograma de um isolado de <i>Enterobacter aerogenes</i>	43
Figura 10 – Antibiograma de isolado de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	43
Figura 11 – Antibiograma de um isolado de <i>Enterobacter aerogenes</i>	44
Figura 12 – Percentagem da deteção de β -lactamases (ESBLs e Amp C) pelo teste fenotípico Kirby-Bauer	46
Figura 13 – Distribuição de β -lactamases do tipo TEM, SHV e CTX-M por espécies/género de Enterobactérias	48
Figura 14 – Eletroforese dos amplicões obtidos pela BOX-PCR de alguns isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	52
Figura 14a - Eletroforese dos amplicões obtidos pela BOX-PCR de alguns isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	53

Figura 15 – Eletroforese dos amplicões obtidos pela BOX-PCR de alguns isolados de *Escherichia Coli* 54

Figura 16 - Eletroforese dos amplicões obtidos pela BOX-PCR de alguns isolados de *Escherichia Coli* 55

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Valores dos antibiogramas para <i>Enterobacteriaceae</i>	29
Tabela 2 – Primers utilizados para pesquisa de ESBLs	31
Tabela 3 – Frequência das espécies/gênero Enterobactérias nos produtos biológicos	33
Tabela 4 – Suscetibilidade aos antibióticos testados no Vitek 2 AES (<i>BioMérieux</i> , França)	37
Tabela 5 – Percentagem de resistência para cada espécie/gênero	41
Tabela 6 – Detecção da presença de β -lactamases pelo teste fenotípico	45
Tabela 7 – Detecção da presença de β -lactamases por PCR com primers específicos para TEM, SHV e CTX-M	47
Tabela 8 – Comparação da percentagem de ESLBs encontrados pelo teste fenotípico (antibiogramas) e pelo teste molecular (PCR)	49

Lista de abreviaturas

- AES – *Advanced Expert System*
- AMC – *Ácido Clavulânico com Amoxicilina*
- ATM – *Aztreonam*
- CAZ – *Ceftazidima*
- CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute*
- CTX – *Cefotaxima*
- dATP – *Deoxyadenosine Triphosphate*
- dCTP – *Deoxycytidine Triphosphate*
- dGTP – *Deoxyguanosine Triphosphate*
- DNA – *Deoxyribonucleic Acid*
- dNTPs – *Deoxyribonucleotide Triphosphates*
- dTTP – *Deoxythymidine Triphosphate*
- EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*
- ESBL – *Extended Spectrum Beta Lactamases*
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FEP – *Cefepima*
- FOX – *Cefoxitina*
- HUC – *Hospital da Universidade de Coimbra*
- IMP – *Imipenem*
- KPC – *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase*
- NAG – *N-acetil glucosamina*
- NAM – *N-acetilmurâmico*
- PBP – *Penicilin Binding Protein*
- PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RNA – *Ribonucleic Acid*

SHV – *Sulphydryl Variable*

TBE – *Tris-borate-EDTA*

TEM – *de Temoniera*

UV – *Ultra Violeta*

I. A resistência bacteriana como um problema de saúde pública

A descoberta dos antibióticos revolucionou a história da medicina em vários aspectos e, desde então, estes fármacos têm contribuído para diminuir o número de mortes por infecções bacterianas em todo o mundo. Esta descoberta representou um ponto de viragem na história da humanidade. O primeiro antibiótico, a penicilina, foi descoberto em 1928 por Alexander Fleming, biólogo e farmacologista escocês. Em 1940, foi identificada uma penicilinase bacteriana capaz de inativar a penicilina. Infelizmente, a introdução destes agentes antimicrobianos na prática clínica sempre foi acompanhada pelo rápido aparecimento de estirpes bacterianas resistentes, representando atualmente um dos maiores problemas de saúde pública em todo o mundo. É uma ameaça para todas as áreas da prática médica, desafiando o controlo de doenças infecciosas, pondo em risco o progresso nos resultados de saúde, aumentando a morbilidade e mortalidade, e conferindo elevados custos à sociedade. Na União Europeia, cerca de 25 000 pacientes morrem a cada ano por infeções causadas por bactérias multirresistentes, e estima-se que os custos associados atingem 1,5 bilhões de euros por ano.^{1,2,6}

Têm sido desenvolvidas algumas ações para combater a resistência antimicrobiana, principalmente por instituições e programas individuais, porém, infelizmente, o impacto é fragmentado e pouco abrangente, pois é dada pouca importância a esta ameaça por parte dos governos nacionais. A insuficiência de dados de vigilância sobre este problema contribui para uma má compreensão da sua dimensão e dificulta uma resposta efetiva para a sua resolução.¹

2. Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos são, provavelmente, um dos grupos de antibacterianos mais utilizados na terapêutica em todo o mundo.

Os antibióticos β -lactâmicos atuam na fase parietal da síntese do peptidoglicano. Este é um componente estrutural da parede celular bacteriana, constituído por cadeias lineares de dissacarídeos, unidades repetidas de N-acetil glucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM), interligadas por pontes peptídicas e catalisadas por enzimas específicas (transpeptidases, carboxipeptidases, endopeptidases), denominadas por proteínas de ligação à penicilina (PBPs - *Penicilin Binding Protein*) (Figura 1). Os β -lactâmicos ligam-se diretamente às PBPs da parede celular em crescimento, impedindo o estabelecimento de pontes interpeptídicas do peptidoglicano, inativando-as.

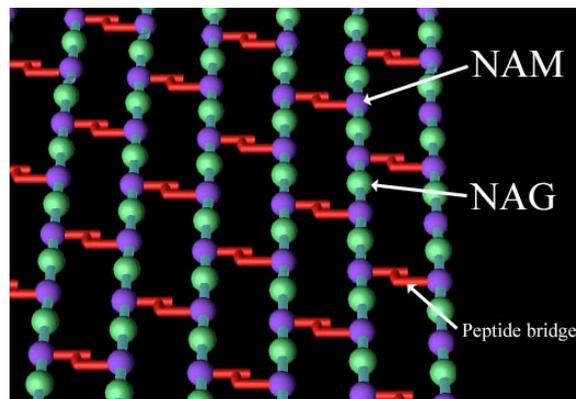


Figura 1 – Estrutura do peptidoglicano. (Adaptado de <http://biosaudefarmaceutica.blogspot.pt/>)

Existem quatro famílias de β -lactâmicos: as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactams e os carbapenems, todos com um anel β -lactâmico comum na sua estrutura (Figura 2).

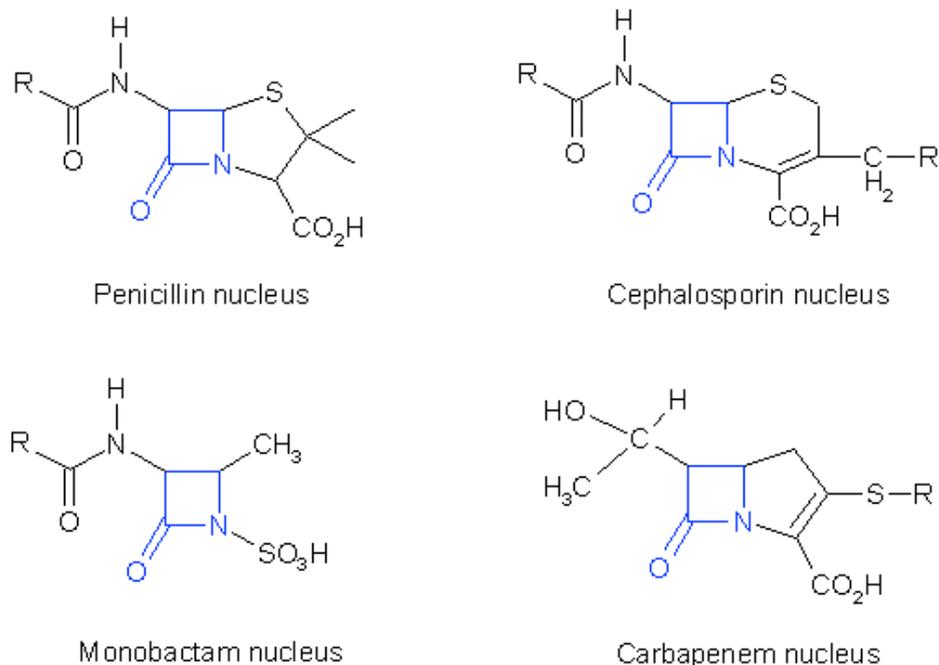


Figura 2 – Estrutura das quatro famílias de antibióticos β -lactâmicos, mostrando a azul o anel β -lactâmico comum à classe. (Adaptado de <http://dc385.4shared.com/doc/KaFe4kOT/preview.html>)

Apesar do mecanismo de ação ser comum a todos os β -lactâmicos, os antibióticos apresentam espectros de ação diferentes entre si, devido a vários fatores, como as diferentes afinidades para as PBPs e a resistência à inativação pelas β -lactamases. Outra característica comum consiste na necessidade do anel β -lactâmico se manter íntegro, para que se mantenha a atividade antimicrobiana.

As penicilinas são produzidas por um fungo do gênero *Penicillium* ou obtidas por semi-síntese. Existem duas penicilinas naturais obtidas a partir do *Penicillium chrysogenum*, a penicilina G (benzilpenicilina), e a penicilina V, (fenoximetilpenicilina) que possui atividade bactericida inferior à penicilina G. A benzilpenicilina hidrolisa-se facilmente em

meio ácido, pelo que não é utilizada por via oral. Tem um espectro de ação pouco amplo e, devido à crescente emergência de estirpes produtoras de β -lactamases, torna-se cada vez mais estreito. A fenoximetilpenicilina apresenta uma razoável resistência à inativação pelos ácidos, pelo que pode ser administrada por via oral. Tem espectro de ação superior à benzilpenicilina, porém é 5 a 10 vezes menos ativa.

Existem também as penicilinas resistentes à inativação pelas β -lactamases estafilocócicas, as isoxazolilpenicilinas (sendo comercializadas em Portugal a dicloxacilina e flucloxacilina, que apresentam as melhores características farmacocinéticas e com elevada ação antimicrobiana) e a meticilina. As isoxazolilpenicilinas podem ser administradas por via oral, uma vez que não são inativadas pelo ácido clorídrico do suco gástrico, sendo a meticilina apenas administrada por via parentérica. São ativas contra estafilococos, incluindo os produtores de β -lactamases, mas são facilmente inativadas pelas β -lactamases dos bacilos Gram negativos.

As penicilinas de largo espectro, ao contrário das benzilpenicilinas, são ativas contra os bacilos Gram negativo, embora não tenham atividade contra bactérias produtoras de β -lactamases. Fazem parte as aminopenicilinas (ampicilina e amoxicilina) que foram as primeiras a serem utilizadas em terapêutica com o espectro mais amplo do que as benzilpenicilinas, as carboxipenicilinas (carbenicilina e ticarcilina) e as ureidopenicilinas (piperacilina). São muitas as bactérias Gram negativo sensíveis a estas penicilinas, embora o espectro de ação não tenha atingido as dimensões esperadas, pois algumas importantes bactérias Gram negativo como *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp* e *Proteus vulgaris* nunca apresentaram elevada sensibilidade às aminopenicilinas, e as que inicialmente eram suscetíveis, com a emergente percentagem de estirpes produtoras de β -lactamases, fez com que essa sensibilidade diminuísse progressivamente. Apesar da ampicilina ter sido a primeira aminopenicilina a ser introduzida na terapêutica, a amoxicilina por ter melhor biodisponibilidade por via oral (responsável por uma larga experiência clínica), pode ser considerada o antibiótico principal do grupo das aminopenicilinas. A terapêutica com as carboxipenicilinas tem sido abandonada uma vez que as ureidopenicilinas apresentam maior potência antibiótica. A piperacilina tem um espectro de ação muito amplo, uma vez que inclui as bactérias Gram positivo e Gram negativo não produtoras de β -lactamases sendo, ao contrário das aminopenicilinas, ativa contra *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp* e

Proteus vulgaris. É administrada por via intramuscular ou intravenosa, por ser mal absorvida por via oral.

As cefalosporinas são semelhantes às penicilinas a nível estrutural e mecanismo de ação, todavia apresentam alguma resistência às β -lactamases. Dividem-se em primeira, segunda, terceira e quarta geração, pois a atividade antibacteriana depende da capacidade de penetração pela membrana externa, da estabilidade à presença de β -lactamases e da afinidade para as enzimas-alvo, fatores que variam consoante a cefalosporina.

As cefalosporinas de primeira geração (as primeiras disponíveis para uso terapêutico), como a cefalotina, que apresenta alguma nefrotoxicidade, e a cefalozina, têm fraca atividade contra as bactérias Gram negativo (Enterobactérias). A partir de 1975 foram surgindo novas cefalosporinas, de maneira a ultrapassar as resistências que as bactérias iam desenvolvendo, e apareceram as cefalosporinas de segunda geração, de que fazem parte a cefuroxima, o cefaclor e a cefoxitina, com alguma atividade contra as Enterobactérias e algumas bactérias produtoras de β -lactamases, uma vez que são mais resistentes à hidrólise pelas β -lactamases. As cefalosporinas de terceira geração já são mais ativas contra as Enterobactérias, e têm também atividade contra algumas produtoras de β -lactamases Amp C (β -lactamase cromossômica). Fazem parte a cefotaxima e a ceftazidima. As cefalosporinas de quarta geração, como a cefepima e a cefpiroma, têm atividade contra os bacilos Gram negativo produtores de β -lactamases de espectro alargado (ESBL), e também de Amp C.

A diferença do núcleo das cefalosporinas em relação ao das penicilinas permite que pacientes com episódios de alergia às penicilinas possam tolerar as cefalosporinas, a menos que não tenham tido uma reação alérgica grave.

Os monobactamos (aztreonamo) têm elevada atividade contra os bacilos Gram negativo e são muito estáveis perante as β -lactamases. Como é pouco absorvido por via oral, normalmente é administrado por via intravenosa e por via intramuscular em pediatria. Por ter elevada seletividade para bactérias Gram negativo, poderá levar a algumas infeções por bactérias Gram positivo, fator a ter em conta na escolha da terapêutica, associando-se muitas vezes ao aztreonamo outros antibióticos ativos contra bactérias Gram positivo.

Os carbapenemos são ativos contra bactérias Gram negativo e positivo.

Os inibidores das β -lactamases, ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, são usados associados a penicilinas hidrolisáveis e têm conseguido escapar à ação hidrolítica das β -lactamases plasmídicas clássicas. As associações utilizadas são: ácido clavulânico + amoxicilina, sulbactam + ampicilina, tazobactam + piperacilina e ácido clavulânico + ticarcilina. Esta capacidade de inibição é devido às semelhanças da sua estrutura química com as β -lactamases, que ao permitirem a sua ligação, protegem as penicilinas da ação das β -lactamases (à exceção das β -lactamases cromossómicas induzidas, produzidas por *Enterobacter sp*, *Citrobacter sp* e *Serratia sp*).^{3,4}

3. Mecanismos de Resistência

A resistência aos antibióticos foi evoluindo como uma resposta natural das bactérias à exposição a estes fármacos, e pode ser definida pela capacidade de resistir às concentrações clínicas do antibiótico. É dividida em resistência intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca é aquela que ocorre naturalmente, e é uma característica de toda a espécie. A resistência adquirida ocorre através de mutações espontâneas, que surgem naturalmente durante o crescimento bacteriano e/ou aquisição de DNA exógeno, por transferência de genes de organismos resistentes para os sensíveis, sendo por isso a mais preocupante devido à possibilidade de disseminação dos genes de resistência a uma população bacteriana.

Existem quatro mecanismos que conferem resistência:

- > Alteração do sítio alvo: estas alterações normalmente surgem de mutações nos genes alvo, resultando numa alteração estrutural do sítio alvo. Esta alteração mantém a função celular, apenas torna a bactéria inacessível ao antibiótico.
- > Alteração da permeabilidade da membrana externa: as bactérias Gram negativo têm a capacidade de restringir a entrada de moléculas hidrofílicas devido

à sua membrana externa. Esta membrana, composta por uma dupla camada assimétrica de fosfolípidos, polissacáridos e proteínas é uma excelente barreira, e é a primeira linha de defesa à entrada de agentes antimicrobianos. As porinas são proteínas que permitem a passagem de agentes hidrofílicos, tais como os antibióticos β -lactâmicos, e a perda de porinas funcionais poderá levar a resistências.

- > Bombas de efluxo: são proteínas de transporte transmembranares usadas pelas bactérias, para expulsar para fora da célula substâncias tóxicas às mesmas, incluindo múltiplos antibióticos, podendo conferir assim múltiplas resistências.
- > Inativação enzimática do fármaco: produção de proteínas que hidrolisam o antibiótico, tornando-o inativo. A produção de β -lactamases é provavelmente o exemplo deste mecanismo de resistência mais comum, e que mais contribui para a resistência aos antibióticos β -lactâmicos.^{2,5,6}

4. β -lactamases

4.1. Origem e disseminação

A maioria das bactérias Gram-negativo possuem naturalmente β -lactamases mediadas pelo cromossoma. Estas enzimas, denominadas Amp C, parecem ter evoluído a partir das proteínas de ligação à penicilina, devido à sua homologia molecular⁷.

A primeira β -lactamase plasmídica (TEM-1) foi encontrada numa *Escherichia coli* isolada a partir de uma cultura de sangue, por volta de 1960, na Grécia, numa doente de nome *Temoniera*, daí ter sido denominada TEM. Rapidamente foi disseminada para outras espécies bacterianas, através de plasmídeos e transposões, por todo o mundo. Atualmente, encontra-se em diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae*,

Pseudomonas aeruginosa, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*. A segunda β -lactamase mediada por plasmídeos mais comum, encontrada em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, é a SHV-I (*sulphydryl variable*). É cromossomicamente codificada na maioria dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* e mediada por plasmídeos em *Escherichia coli*^{8,9}.

Nos últimos 30 anos desenvolveram-se vários antibióticos específicos para ultrapassar a ação hidrolítica das β -lactamases, tal como as oximino-cefalosporinas ou cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima e ceftazidima, por exemplo), que apresentavam uma boa estabilidade contra as β -lactamases TEM-I e SHV-I. Contudo, por cada nova classe desenvolvida, emergem novas β -lactamases pela contínua exposição e uso prolongado, através de mutações e sobreprodução das mesmas. Estas novas β -lactamases adquiriram a capacidade de hidrolisar as penicilinas, as cefalosporinas de pequeno e largo espetro e os monobactams, sendo por isso designadas de β -lactamases de largo espetro (*Extended Spectrum β -Lactamases* – ESBL), sendo, por definição, inibidas pelo ácido clavulânico. A primeira ESBL foi descrita em 1983, a TEM-3, e em 1985 foi isolada de uma *Klebsiella pneumoniae* outra SHV, a SHV-2 na Alemanha. Em 2005 existiam mais de 130 enzimas TEM-type e mais de 50 SHV-type descritas, sendo actualmente encontradas por todo mundo, e isoladas principalmente em espécies da família *Enterobacteriaceae*. As principais produtoras deste tipo de enzimas são *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, devido não só à existência de vários plasmídeos que contêm genes que codificam ESBLs, mas também por serem as bactérias que estão mais adaptadas ao ambiente hospitalar, sobrevivendo algum tempo, não só nas mãos dos portadores como também nas superfícies, facilitando assim a contaminação cruzada dentro do hospital. Existem vários fatores que levam à disseminação e infeção por bactérias portadoras destas enzimas, tais como: a permanência prolongada de doentes graves nos hospitais, o uso prolongado e constante de antibióticos, principalmente cefalosporinas de terceira geração, quinolonas e aminoglicosídeos. Contudo, a mesma ESBL presente no mesmo serviço hospitalar pode ser mediada por diferentes plasmídeos (que transportam diferentes genes que codificam ESBLs), e diferentes ESBLs podem igualmente ser encontradas no mesmo serviço hospitalar. As unidades de cuidados intensivos são, normalmente, os principais epicentros da produção destas enzimas (numa perspetiva geral, mais de 40% dos isolados produtores de ESBLs são recolhidos de pacientes dos cuidados intensivos). Os cuidados intensivos

neonatais podem também ser um foco de infecções por bactérias multirresistentes. Outras ESBLs têm sido reportadas, as CTX-M, existindo em 2005 mais de 40.^{8,9} Atualmente, as CTX-M são as ESBLs mais comumente encontradas, superando a incidência das SHV e TEM.¹⁰

4.2. Classificação das ESBLs

Existem várias classificações de β -lactamases, quer baseadas na sua estrutura molecular (Classificação de Ambler), quer na sua função hidrolítica (Classificação de *Bush-Jacoby-Medeiros*). A classificação mais usada tem sido a baseada na sequência dos nucleótidos e aminoácidos por ser a mais simples. Na classificação de Ambler são reconhecidas quatro classes (A-D), sendo as classes A, C e D serina- β -lactamases e a classe B metalo- β -lactamases^{9,11}. As serina- β -lactamases hidrolizam o seu substrato através da formação de uma enzima acil através de um local ativo com um resíduo de serina. As metalo- β -lactamases utilizam pelo menos um local ativo de iões de zinco para facilitar a hidrólise dos β -lactâmicos. Os genes que codificam estas enzimas estão presentes no cromossoma bacteriano ou em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposões, ou podem ocorrer como parte de integrões destes elementos transferíveis. As ESBLs pertencem na sua maioria à classe A de Ambler. Apesar desta abordagem estrutural ser a maneira mais fácil e menos controversa para classificar estas enzimas, Bush et al¹¹ reconheceram que uma classificação funcional permite relacionar estas enzimas com o seu papel clínico, proporcionando assim uma resistência seletiva a diferentes classes de antibióticos β -lactâmicos. Embora a análise funcional e bioquímica possa ser um pouco subjetiva comparada com a análise molecular, permite ao clínico e aos laboratórios correlacionar as propriedades de uma dada enzima com o perfil de resistência microbiológica observada para um determinado isolado clínico¹². Desta maneira foi criada uma classificação, a classificação de Bush-Jacoby-Medeiros, que tem em conta a especificidade do substrato e o perfil de inibição da enzima, e é dividida em quatro grupos (1-4) e alguns sub-grupos (A-F). De acordo com esta classificação, a maioria das ESBLs pertencem ao grupo 2Be.¹¹

4.3. β -lactamases de largo espectro mais comuns

TEM (Classe A)

A TEM-1, referida anteriormente, confere resistência à ampicilina, penicilina e cefalosporinas de primeira geração, como a cefalotina. É responsável por 90% de resistência à ampicilina em isolados de *Escherichia coli*. Com as mutações sofridas no gene *bla*_{TEM-1} a enzima evoluiu, adquirindo a capacidade de hidrolisar as cefalosporinas de largo espectro e o aztreonam, mantendo as resistências iniciais. A TEM-2 difere da TEM-1 através da substituição da lisina pela glutamina na posição 39, mas como mantém os mesmos substratos não é, tal como a TEM-1, considerada ESBL. Consequentemente, as substituições de aminoácidos em 12 posições distintas juntamente com outras mutações estruturais nos genes, levaram ao aparecimento de ESBLs derivadas da TEM-1 e da TEM-2. Estas enzimas têm um perfil de substrato ligeiramente diferente, no qual uma ESBL pode hidrolisar uma cefalosporina de largo espectro, de forma mais eficiente do que outra ESBL, embora seja necessária uma análise da sequência de aminoácidos para as diferenciar. São principalmente encontradas em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, mas podem ocorrer em outros géneros de *Enterobacteriaceae*^{9,13,14}.

SHV (Classe A)

A primeira SHV encontrada (SHV-1) confere resistência às penicilinas de largo espectro, tal como a ampicilina e piperacilina e às cefalosporinas de primeira geração. É uma enzima codificada pelo cromossoma ou por plasmídeos, ou encontrada universalmente em *Klebsiella pneumoniae*. Tal como aconteceu com a TEM-1, ocorreram mutações específicas na estrutura do gene *bla*_{SHV-1} que levou ao aumento da capacidade hidrolítica da SHV-1 para as cefalosporinas de largo espectro e monobactams, surgindo em 1983 a SHV-2 plasmídica isolada de três *Klebsiella pneumoniae*. Em 2007, estavam descritas mais de 50 tipos de enzimas SHV^{9,11,13}.

CTX-M (Classe A)

Em 1989, foi descoberta uma nova ESBL num isolado clínico de *Escherichia coli* em Munique, que não se assemelhava nem com as ESBL do tipo TEM, nem do tipo SHV. Apresentava apenas 40% de homologia, e tinha atividade hidrolítica contra a cefotaxima, daí ter sido designada de CTX-M-1. Outra característica deste tipo de enzimas é a melhor inibição pelo tazobactam do que pelo sulbactam e ácido clavulânico⁹. Em 1992 foi descoberta outra CTX com um ponto isoelétrico diferente, designada de CTX-M-2. Em 2008 estavam descritas mais de 80 CTX-M, e são atualmente as mais frequentes em todo o mundo. A origem destas enzimas difere das TEM e SHV, e acredita-se serem originárias por mutação de enzimas produzidas pelo género *Kluyvera sp.*, uma bactéria ambiental. As ESBLs do tipo CTX, são adquiridas por transferência horizontal de genes de outra bactéria mediada por plasmídeos conjugativos ou transposões¹⁴. Em 2007 foram reconhecidas várias CTX-M em diversos surtos focais por todo o mundo, como no Japão, Índia e Reino Unido, o que indica uma larga dispersão. A CTX mais reportada por todo o mundo é a CTX-M-15, descrita pela primeira vez na Índia, mas que rapidamente se disseminou em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, incluindo Portugal.^{13,15}

4.4. Amp C β -lactamases

Em 1981, foi descoberta a sequência de um gene Amp C (β -lactamase cromossómica) isolada de *Escherichia coli* que, embora o sítio alvo fosse uma serina, a sequência era diferente da TEM-1. As Amp C pertencem à classe C da classificação estrutural de Ambler e pertencem ao grupo I da classificação funcional de Bush *et al.* Estas enzimas são consideradas cefalosporinases, mas são ativas contra as penicilinas, assim como contra as cefalosporinas (primeira, segunda e terceira geração), as cefamicinas, tais como a cefoxitina, e monobactams como o aztreonam. O fato de hidrolisarem com eficiência a cefoxitina distingue-as das ESBLs. Algumas Amp C podem hidrolisar os carbapenems. Os inibidores das enzimas de classe A (sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico) têm pouco efeito nas Amp C, embora algumas possam

ser inibidas pelo tazobactam e pelo sulbactam. Em muitas Enterobactérias, a expressão de enzimas Amp C é reduzida, mas pode ser induzida em resposta à exposição a um antibiótico β -lactâmico em alguns géneros bacterianos, como *Enterobacter sp.*, *Citrobacter sp.*, *Serratia sp.* e *Morganella sp.* Esta indução difere consoante o antibiótico; a benzilpenicilina, ampicilina, amoxicilina e algumas cefalosporinas (cefazolina e cefalotina) são fortes indutores e bons substratos para as Amp C. A cefoxitina e o imipenem são também fortes indutores mas são muito mais estáveis na hidrólise. A cefotaxima, a ceftazidima, a piperacilina e o aztreonam são fracos indutores e substratos, mas podem ser hidrolisados se houver concentração suficiente de enzima por hiperprodução. As Amp C encontradas em *Escherichia coli* não são induzíveis, mas reguladas por mecanismos promotores e atenuadores.

É frequente nas bactérias que apresentam Amp C β -lactamases cromossómicas também produzirem outras β -lactamases como TEM-I ou ESBLs, como a SHV-5, o que complica a deteção fenotípica da Amp C.

As Amp C plasmídicas são conhecidas desde 1989, e têm sido encontradas em isolados nosocomiais e não nosocomiais por todo o mundo, mas são menos comuns do que as ESBLs. Em *Escherichia coli* são menos responsáveis pela resistência à cefoxitina. Várias destas enzimas têm sido encontradas em isolados de pacientes hospitalizados durante muito tempo e, recentemente, em serviços de assistência a longo prazo e centros de reabilitação.⁷

4.5 Carbapenemases

As carbapenemases são β -lactamases com o maior espetro de atividade. Para além de hidrolizarem os carbapenemos, têm também atividade contra a maioria dos antibióticos β -lactâmicos, salvo alguns casos. A recente emergência destas β -lactamases pode ser explicada pelo aumento do uso dos carbapenemos empiricamente para tratamento de infeções graves. Dependendo da sua estrutura molecular, estas enzimas pertencem às classes A, B ou D da classificação de Ambler. As carbapenemases de classe

B, as metalo- β -lactamases, são as mais eficientes, hidrolisando todos os antibióticos β -lactâmicos, com exceção do aztreonam.¹⁶ Atualmente, a carbapenemase plasmídica mais prevalente e disseminada é a KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). São de difícil detecção por parte dos laboratórios clínicos, uma vez que a maioria dos isolados apresenta uma concentração mínima inibitória contra o imipenem e o meropenem que teoricamente os torna sensíveis. Estudos *in vitro* têm demonstrado que o ertapenem poderá ser o melhor substrato para a detecção da produção destas enzimas¹⁷.

5. Transmissão de genes de resistência

Ao longo das últimas décadas temos assistido, não só ao desenvolvimento de uma infinidade de novos mecanismos de resistência, mas também à sua transmissão e propagação por e para toda a população bacteriana. Como referido anteriormente, a resistência é adquirida por mutações em genes pré-existentes ou previamente adquiridos e pela transferência horizontal de genes, ao adquirirem novos genes de outras bactérias. Estes dois mecanismos são os responsáveis pelo desenvolvimento da preocupante atual situação da resistência antimicrobiana, sendo o mecanismo principal de disseminação a aquisição de novos genes de resistência. Por vezes desconhece-se a origem destes genes, embora a maioria pareça surgir de organismos presentes no ambiente, como os produtores naturais de antibióticos.⁶

Vários elementos estão presentes na transferência de genes, e este movimento pode ocorrer a dois níveis diferentes: intra e intercelular. A nível intracelular, os genes de resistência podem movimentar-se no cromossoma, e/ou entre este e os plasmídeos, se inseridos em elementos genéticos móveis, como integroes e transposões.

A nível intercelular, o movimento dos genes de resistência (transferência horizontal de genes) é devido a três mecanismos: transformação (aquisição e incorporação de fragmentos de DNA estranho presentes no ambiente, originados de bactérias lisadas), transdução (transferência de informação genética de uma bactéria para

outra através de bacteriófagos) e conjugação (transferência de material genético de uma bactéria para outra através de plasmídeos conjugativos, que se mantêm estáveis na bactéria recetora e/ou se recombinam com o material genético da bactéria recetora).⁵

6. Deteção laboratorial de genes de resistência

A análise do perfil de suscetibilidade aos antibióticos de uma dada estirpe bacteriana pode sugerir alguns dos mecanismos de resistência expressados. Após conhecer o fenótipo de suscetibilidade de uma estirpe, os métodos moleculares permitem a confirmação e identificação de alguns dos mecanismos previamente inferidos. A reação da polimerização em cadeia assume aqui um papel primordial.

6.1. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Criada em 1984 por Kary Mullis, a PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação da Polimerase em Cadeia) é um método engenhoso e sensível que consiste em amplificar, *in vitro*, fragmentos específicos de DNA. Na realidade, o PCR permite obter, em apenas algumas horas, um elevado número de cópias de um fragmento específico de DNA a partir de uma quantidade mínima de amostra.

Além do fragmento de DNA que queremos amplificar, o PCR utiliza a capacidade replicativa de uma DNA polimerase termo-estável (a Taq polimerase), todos os quatro desoxirribonucleósidos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP e dTTP, em conjunto, dNTPs), um par de primers específicos (*Forward* e *Reverse*) e um tampão apropriado.

Os primers são oligonucleótidos sintéticos de DNA em cadeia simples (aproximadamente 20 nucleótidos) com uma extremidade 3'-OH livre. São desenhados de modo a que um deles seja complementar de uma extremidade do fragmento desejado

na cadeia codificante (sentido 5' – 3', *forward*), enquanto o segundo é complementar da extremidade oposta na cadeia não codificante (sentido 3' – 5', *reverse*). Adicionalmente, os dois primers do par devem apresentar uma distribuição aleatória e equilibrada de bases e temperaturas de emparelhamento (*'annealing'*) semelhantes, para que a especificidade da reação seja maior, mas não devem formar dímeros consigo próprios ou entre si. Por conseguinte, o rendimento da reação é sensível à seleção dos primers.

A reação envolve a repetição cíclica (25-30 vezes) de três etapas que correspondem a simples mudanças na temperatura de incubação: desnaturação do DNA, hibridização dos primers e extensão. Após cada ciclo, o DNA duplica na região ladeada pelos primers, presentes em elevada concentração. No final da reação, os produtos de PCR (ou amplicões) incluem a molécula de DNA de cadeia dupla original e milhões de cópias do fragmento inicial amplificado (ver Figura 3).

Numa experiência de PCR todos os componentes requeridos para a reação são adicionados no início da experiência e, por isso, a reação não tem de ser interrompida para adição de mais reagentes nos ciclos subsequentes. Além disso, a descoberta de DNA polimerases termo-estáveis, capazes de resistir às sucessivas etapas de desnaturação, possibilitou a automatização da técnica de PCR num aparelho programável denominado por termociclador, que aquece e arrefece ciclicamente, por períodos de tempo específicos.

Apesar da sua teórica simplicidade, a aplicação prática do PCR requer a otimização, por tentativas, de vários parâmetros que influenciam o rendimento e a especificidade da reação. Os parâmetros mais críticos de uma experiência de PCR são a temperatura de emparelhamento dos primers, que é a mais crítica do ciclo de temperaturas, e depende da temperatura de fusão e do tamanho, composição e concentração dos primers. Uma temperatura de *'annealing'* muito elevada poderá impedir a hibridização dos primers e, por outro lado, uma temperatura demasiado baixa poderá permitir emparelhamentos incorretos.

Todas as reações devem incluir uma amostra de DNA bem amplificada para avaliar os parâmetros da reação (controlo positivo) e uma mistura contendo todos os componentes da reação à exceção do DNA a fim de detetar possíveis contaminações (controlo negativo).^{2,18,19}

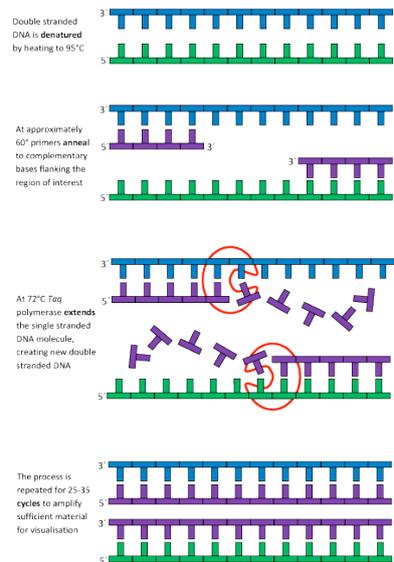


Figura 3 - Representação esquemática de uma experiência de PCR. Um ciclo consiste em três etapas de diferentes temperaturas. Na primeira etapa, as duas cadeias da molécula de DNA são separadas (desnaturadas) por aquecimento a uma temperatura elevada (90-95°C). Ao aumentar a temperatura, aumenta a energia cinética necessária para quebrar as pontes de hidrogénio existentes entre os pares de bases. Após desnaturação, as duas cadeias simples vão servir como molde para a síntese de novas cadeias de DNA, atendendo ao princípio da complementaridade entre bases. Na segunda etapa, a reação é, então, abruptamente arrefecida (50-65°C) para que cada primer emparelhe com a extremidade 3'-OH da cadeia de DNA que lhe é complementar, delimitando a região que se pretende amplificar. Durante a terceira etapa, a extensão, os primers são alongados por uma DNA polimerase termo-estável, a enzima Taq polimerase, à temperatura ótima da enzima. Formam-se duas cópias de DNA de cadeia dupla por cada molécula de DNA original. Estas etapas repetem-se n vezes, de modo a obter 2^n cópias do fragmento de DNA desejado.

(Adaptado de <http://www2.le.ac.uk/departments/emfpu/genetics/explained/pcr>)

6.2. Eletroforese

A eletroforese em gel é uma técnica utilizada para separar e ordenar fragmentos de DNA de diferentes comprimentos. As moléculas de DNA, a pH neutro, são carregadas negativamente devido ao grupo fosfato de cada nucleótido. Por esta razão, as moléculas de DNA movem-se na direção do elétrodo positivo (ânodo) em resposta a um campo elétrico. A mobilidade eletroforética do DNA é influenciada pelo tamanho e pela forma do fragmento, pelo tamanho do poro do gel e pela força do campo elétrico. Moléculas menores migram através da matriz do gel mais rapidamente, enquanto que moléculas maiores encontram maior resistência.

Existem dois tipos diferentes de gel utilizados para análise de DNA: o gel de agarose e o gel de poliacrilamida, que funcionam como crivos moleculares, separando as moléculas de DNA segundo a sua dimensão e a carga global da molécula. Os géis de agarose constituem os meios de suporte mais comuns para a eletroforese de DNA e utilizam-se para separar fragmentos maiores (~500 pb a ~60 kb) por serem mais porosos. É normalmente o gel usado para separar os produtos de amplificação da PCR. O gel é facilmente preparado mediante a deposição de uma solução transparente contendo agarose fundida num tampão apropriado, num molde com a forma de uma placa horizontal fina, de vidro ou de plástico, com poços individuais numa das extremidades. Com a solidificação da agarose forma-se uma matriz em gel cujo tamanho dos poros diminui para concentrações crescentes de agarose (gramas de agarose por mililitro de solução tampão).

O aparelho de eletroforese é composto por um gerador elétrico, que indica a voltagem, e por uma tina, que contém o gel e o tampão. O gel de agarose de eletroforese de DNA corre horizontalmente submerso na solução tampão, a uma voltagem e temperatura necessárias à separação dos produtos de amplificação da PCR,

Com o auxílio de uma micropipeta, aplicam-se as amostras nos poços do gel, juntamente com um tampão de carga (azul de bromofenol), submetendo em seguida a

corrente elétrica ao sistema através do gerador. Após a corrida, os fragmentos de DNA separados no gel podem ser visualizados em bandas distintas alaranjadas, graças ao brometo de etídio adicionado antes do total arrefecimento do gel, quando excitadas com luz ultravioleta. O etídio é uma molécula planar que se liga à dupla hélice de DNA, intercalando-se entre as bases adjacentes. A luz ultravioleta, emitida pela fonte de luz UV, é absorvida pelo complexo DNA e brometo de etídio, de modo a detetar-se cada fragmento de DNA como uma banda fluorescente marcada na matriz do gel de agarose. De salientar que esta substância é altamente mutagénica.^{18,19}

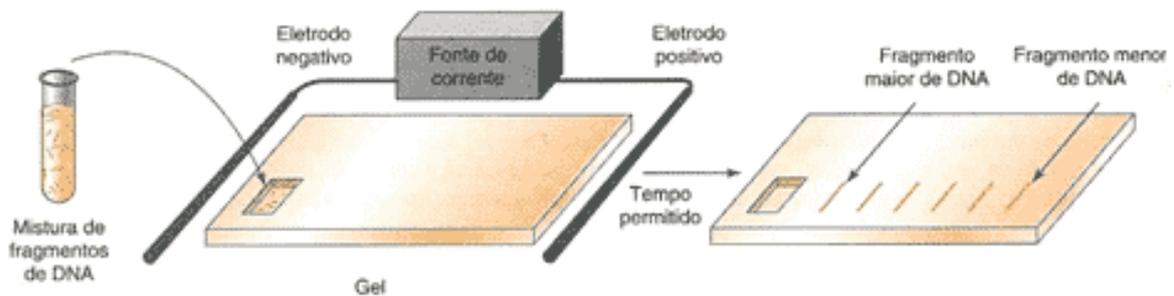


Figura 4 – Esquema representativo de um aparelho de eletroforese horizontal. (Adaptado de <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Biotecnologia/eletroforese.php>)

7. Objectivos

Em Portugal, tal como em muitos outros países, a resistência aos agentes antimicrobianos tem vindo a aumentar de uma forma dramática, nomeadamente aos antibióticos β -lactâmicos, uma das classes mais usadas em terapêutica. As instituições prestadoras de cuidados de saúde devem conhecer o perfil de suscetibilidade das bactérias isoladas, assim como, determinar os mecanismos de resistência mais comuns e a prevalência de determinadas estirpes. Esta abordagem pode permitir uma racionalização do uso de antibióticos, e melhorar as medidas de controlo de infecção hospitalar.

Este trabalho teve como objetivo principal o estudo da suscetibilidade a diversos antibióticos de Enterobactérias multirresistentes (incluindo a ceftazidima e/ou a cefotaxima) isoladas em doentes dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC). Este estudo versou vários aspetos, nomeadamente:

- A avaliação da suscetibilidade de Enterobactérias a antibióticos de várias famílias;
- A avaliação da prevalência de cada género/espécie multirresistente e associação com o tipo de infeção;
- A deteção fenotípica do tipo de β -lactamases associadas à resistência aos β -lactâmicos (ESBLs e AmpC);
- A deteção de β -lactamases mais comuns, nomeadamente dos tipos TEM, SHV e CTX-M, por métodos moleculares;
- A avaliação da variabilidade genética entre os isolados multirresistentes estudados.

8. Materiais e Métodos

8.1. Isolados bacterianos

No presente trabalho foram estudados 204 isolados clínicos de Enterobactérias, resistentes à cefotaxima e à ceftazidima: *Klebsiella pneumoniae* (n=96), *Escherichia coli* (n=70), *Morganella morganii* (n=14), *Enterobacter aerogenes* (n=11), *Enterobacter cloacae* (n=5), *Serratia sp.* (n=3), *Proteus mirabilis* (n=2), *Citrobacter sp.* (n=2) e *Enterobacter gergoviae* (n=1). Os isolados foram recolhidos de doentes de vários serviços do Hospital da Universidade de Coimbra (HUC) entre setembro de 2011 e fevereiro de 2012, e foram identificados pelo Serviço de Patologia Clínica do referido hospital.

8.2. Teste de suscetibilidade aos antibióticos e deteção fenotípica de β -lactamases

Para a determinação da suscetibilidade dos isolados aos vários antimicrobianos utilizados na prática clínica, foram utilizadas dois métodos. Numa primeira fase, foram analisados através do aparelho Vitek 2 Advanced Expert System (AES) BioMérieux, realizado pelo laboratório de microbiologia do HUC. Posteriormente, foi utilizado o método de difusão em disco, também conhecido por técnica de *Kirby-Bauer*, para alguns antibióticos.

8.2.1. Vitek 2 Advanced Expert System (AES) BioMérieux

O Vitek é um sistema automatizado que avalia a suscetibilidade aos antibióticos. Permite inferir a presença de ESBLs, no qual a ceftazidima e a cefotaxima são testadas

isoladamente e em combinação com o ácido clavulânico. A redução logarítmica no crescimento dentro do poço que contém o ácido clavulânico comparada com o poço que não contém o ácido clavulânico indica a expressão de uma ESBL. Este teste, em combinação com o software Vitek 2 AES, representa uma metodologia muito sensível para detetar ESBLs em isolados clínicos. Se é detetada a presença de uma ESBL, todas as penicilinas, aztreonamo e cefalosporinas (tais como a cefepima, mas excluindo a cefoxitina e o cefotetan, uma vez que as ESBLs não hidrolisam por norma as cefamicinas), são automaticamente considerados como resistentes.¹²

8.2.2. Pesquisa fenotípica de β -lactamases por método de difusão em disco

Esta técnica de fácil execução e interpretação, permite-nos detetar a presença de ESBLs nas estirpes em estudo. Preparou-se uma suspensão de bactérias em água bidestilada estéril, a partir de uma cultura bacteriana crescida em meio tripticase soja, incubada a 37°C durante 18-24 horas, seguindo a escala de turvação de *McFarland* (0,5). Posteriormente, inoculou-se a suspensão em placas com o meio de cultura *Mueller-Hinton* (OXOID), usando a técnica de sementeira em toalha, de forma uniforme, com uma zaragatoa. De seguida aplicou-se, com a ajuda do dispensador automático da OXOID, os discos impregnados com os antibióticos previamente escolhidos: imipenem, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, aztreonamo e cefepima, colocando no centro o disco da amoxicilina com o ácido clavulânico, de modo a conseguir detetar-se posteriormente a presença de ESBLs. Ao colocarmos o disco de amoxicilina com o ácido clavulânico ao centro, por ser um inibidor da β -lactamase, observa-se à volta dos outros discos um aumento do halo de inibição perto do centro, provocado pelo ácido clavulânico. Após incubação das placas a 37°C durante 18-24 horas seguiu-se a medição, em milímetros, dos halos de inibição e leitura dos resultados utilizando as normas descritas no 'Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement' do 'Clinical Laboratory Standards Institute' (CLSI), M100-S20 de 2010, cujos valores (*breakpoints*) se encontram na seguinte tabela (Tabela 1).

Antibiótico	Conteúdo do disco	Diâmetro do halo de exibição		
		Resistente	Intermédio	Sensível
Imipenem (IMP)	10 µg	≤ 13	14 – 15	≥ 16
Cefotaxima (CTX)	30 µg	≤ 14	15 – 22	≥ 23
Cefoxitina (FOX)	30 µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Ceftazidima (CAZ)	30 µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Aztreonam (ATM)	30 µg	≤ 15	16 – 21	≥ 22
Cefepima (FEP)	30 µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Ácido Clavulânico com Amoxicilina (AMC)	20/10 µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18

Tabela I - Valores dos antibiogramas para *Enterobacteriaceae*, adaptado do CLSI, 2010.

8.2.3. Pesquisa fenotípica de Amp C

O método de *Kirby-Bauer* foi utilizado também para a detecção da presença de Amp C nos isolados bacterianos, visto ser de fácil execução e interpretação. Utilizaram-se os discos de cefoxitina e imipenemo por serem fortes indutores das Amp C, que foram colocados ao lado de cefalosporinas, para analisar posteriormente os halos de inibição. Se o resultado for um halo deformado/cortado, significa que a β -lactamase Amp C induzida travou a atividade antimicrobiana do disco, podendo assim concluir que a bactéria em estudo produz uma Amp C.

8.3. Pesquisa Molecular de β -lactamases

8.3.1. Extração de DNA

A produção de β -lactamases pode ser confirmada através de técnicas de biologia molecular, pelo que é necessário extrair o DNA dos isolados bacterianos. Foi utilizado o método de ebulição, que consiste em fazer uma suspensão de uma ou duas colónias bacterianas em 50 μ l de água bi-distilada ou Milli Q num *eppendorf*, e aquecê-la à temperatura de ebulição da água durante 10 minutos. De seguida, introduz-se os lisados na centrífuga a 20 000 rotações por minuto (rpm) durante 2 minutos. Recolhe-se o sobrenadante, que contém o DNA, e congela-se então a -20°C para posterior análise.

8.3.2. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Utilizou-se esta técnica para a deteção de β -lactamases de largo espectro (ESBLs). Preparou-se, então, uma mistura com 1 μ l de DNA de cada isolado, 0,5 μ l de cada primer (*Forward* (F) para a direção 5'→3' e *Reverse* (R) para a direção 3'←5') de uma solução de trabalho de 10 μ M (indicados na Tabela 2), 10 μ l de uma solução comercial (MIX) de nucleótidos, Taq polimerase e tampão (DNAzyme™ II 2x PCR Master Mix, Thermo Scientific) e 8 μ l de água Milli Q estéril, para perfazer um volume total de 20 μ l. De seguida, programou-se as condições de corrida no termociclador, repetindo-se 25 vezes as 3 etapas da PCR. Numa fase inicial, para que ocorra desnaturação programou-se o termociclador a uma temperatura de 95°C durante 5 minutos (desnaturação inicial seguida de 25 ciclos). Numa segunda fase, ocorre o abaixamento de temperatura para os 53°C durante um minuto para ocorrer a hibridização dos primers. Após a conclusão de todos os ciclos, aumenta-se a temperatura para os 65°C (temperatura ótima da enzima) para ocorrer a extensão das cadeias. No fim dos ciclos, programa-se o termociclador para os 4°C , de forma a conservar os produtos de amplificação.

Enzima	Primers (sintetizados pela <i>Stavida</i> , Oeiras, Portugal)
TEM - tipo F	5'-TACGATACGGGCTTAC-3'
TEM - tipo R	5'-TTCCTGTTTCACCCA-3'
SHV - tipo F	5'-TCAGCGAAAAACACCTTG-3'
SHV - tipo R	5'-TCCCGCAGATAAATCACCA-3'
CTX - M F	5'-TTTGCGATGTCAGTAA-3'
CTX - M R	5'-CGATATCGTTGCCATA-3'

Tabela 2 – Primers utilizados para pesquisa de ESBLs

Em todas as corridas foram colocados controlos positivos de TEM, SHV e CTX-M que pertencem à coleção do laboratório, assim como controlos negativos, em que o DNA foi substituído por água.

8.3.3. Identificação dos produtos de PCR por eletroforese

Após terminar as reações da polimerase em cadeia, é necessário identificar os amplicões. Para isso, os produtos de PCR são submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 2%. Pesou-se 2 gramas de agarose e dilui-se em 100 ml de tampão tris-borato-EDTA (TBE) 0,5 x, com o auxílio de calor, de maneira a ficar um líquido transparente e homogéneo. Adicionou-se 5 µl de brometo de etídio para posterior visualização no transiluminador de ultra-violeta (UV), e esperou-se até arrefecer sem solidificar. Numa tina de electroforese colocou-se a agarose, o pente, e esperou-se até o gel solidificar. Nos poços, com a ajuda de uma micropipeta, colocou-se os nossos amplicões juntamente com o tampão de carga azul de bromofenol numa proporção de 1:5, e deixou-se correr a 80 Volts durante sensivelmente 60 minutos. Posteriormente, visualizou-se e identificou-se os amplicões através do UV.

8.4. Tipagem dos isolados bacterianos

Embora não seja considerada a técnica padrão para avaliar a clonalidade dos isolados, utilizou-se uma técnica baseada em PCR devido à elevada quantidade de isolados em estudo. Esta técnica permite usar um maior número de isolados bacterianos, rapidez na execução, e não tão dispendiosa, como técnicas baseadas em sequenciação do DNA.

Foram testados 204 isolados por BOX-PCR. Para 1 μ l de amostra adicionou-se 1 μ l do Primer BOX AIR 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGAC-3', 10 μ l da MIX da DNAzyme™ II 2x PCR Master Mix, Thermo Scientific, e 8 μ l de água Milli Q estéril, para perfazer um volume total de 20 μ l. Colocaram-se as amostras nos termocicladores e programaram-se as condições descritas de seguida. Primeiramente, para ocorrer a desnaturação inicial das cadeias de DNA, configurou-se o termociclador a 95°C durante cinco minutos. De forma a ocorrer o emparelhamento dos primers, procedeu-se ao arrefecimento abrupto para 53°C, durante um minuto. Após o 'annealing', aumentou-se a temperatura para os 65°C, temperatura ótima da enzima Taq polimerase, durante oito minutos, de maneira a que ocorra a extensão das cadeias. Programou-se o termociclador para repetir 30 vezes a partir do primeiro passo.

9. Resultados e Discussão

9.1. Isolados bacterianos e produtos biológicos

Neste estudo foram analisadas 204 amostras clínicas de onde foram isoladas Enterobactérias resistentes a múltiplos antibióticos, inclusivamente à ceftazidima e/ou à cefotaxima, provenientes do Hospital da Universidade de Coimbra (HUC): *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter gergoviae*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter sp*, *Proteus mirabilis* e *Serratia sp*. Como se verifica na Tabela 3, as bactérias foram isoladas de várias amostras biológicas. Os serviços de

onde foram recolhidos os isolados não foram fornecidos, mas temos a informação que as amostras foram provenientes de diferentes serviços hospitalares. A distribuição das espécies ou géneros isolados e diversidade das amostras clínicas encontra-se na Tabela 3.

Produtos Biológicos	Espécies/Género									Total n (%)
	Entero. aerog.	Entero. cloac.	Entero. gerg.	Morg.	Kleb. pneum.	E. coli	Citro.	Prot. mir.	Serratia sp	
Sem indicação	1	1	-	4	9	17	-	-	2	34 (16,67%)
Bilis	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1 (0,49%)
Urina	6	-	-	2	60	36	2	2	-	108 (52,94%)
Urina cateter	1	-	1	-	1	-	-	-	-	3 (1,47%)
Líquido peritoneal	1	-	-	-	3	2	-	-	-	6 (2,94%)
Biópsia	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (0,49%)
Aspirado brônquico	-	-	-	-	6	1	-	-	1	8 (3,92%)
Hemocultura	-	-	-	-	1	1	-	-	-	2 (0,98%)
Expetoração	-	-	-	1	3	2	-	-	-	6 (2,94%)
Exsudato de ferida	1	-	-	2	6	5	-	-	-	14 (6,86%)
Exsudato de ferida cirúrgica	-	-	-	4	-	1	-	-	-	5 (2,45%)
Sangue	-	2	-	1	7	4	-	-	-	14 (6,86%)
Pus abscesso	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (0,49%)
Tubo endotraqueal	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (0,49%)
Total n (%)	11 (5,39%)	5 (2,45%)	1 (0,49%)	14 (6,86%)	96 (47,06%)	70 (34,31%)	2 (0,98%)	2 (0,98%)	3 (1,47%)	204

Tabela 3 – Frequência das espécies/género de Enterobactérias nos produtos biológicos. (*Entero. aerog* - *Enterobacter aerogenes.*, *Entero. cloac* - *Enterobacter cloacae.*, *Entero. gerg.* - *Enterobacter gergoviae*, *Morg.* - *Morganella morgani*, *Kleb. pneumo.* - *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* - *Escherichia coli*, *Citro.* - *Citrobacter sp*, *Prot. mir.* - *Proteus mirabilis*)

Os gráficos das Figuras 5 e 6, mostram a prevalência de espécies ou géneros da família *Enterobacteriaceae* resistentes à ceftazidima e/ou cefotaxima, e das amostras clínicas de onde foram isolados, respetivamente.

Amostra biológica

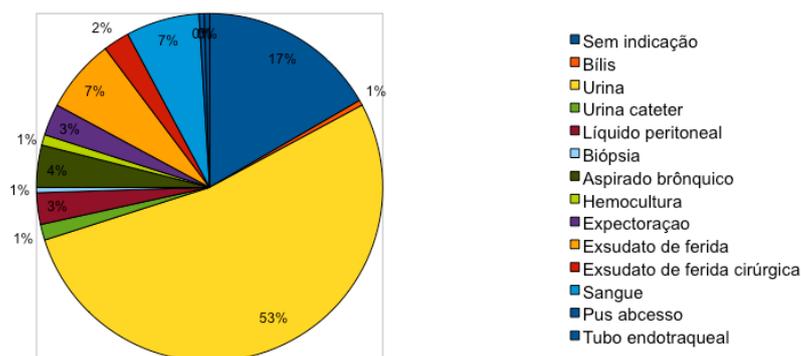


Figura 5 – Percentagem das espécies/géneros de Enterobactérias resistentes à ceftazidima e/ou cefotaxima provenientes dos HUC.

Percentagem do nº de isolados

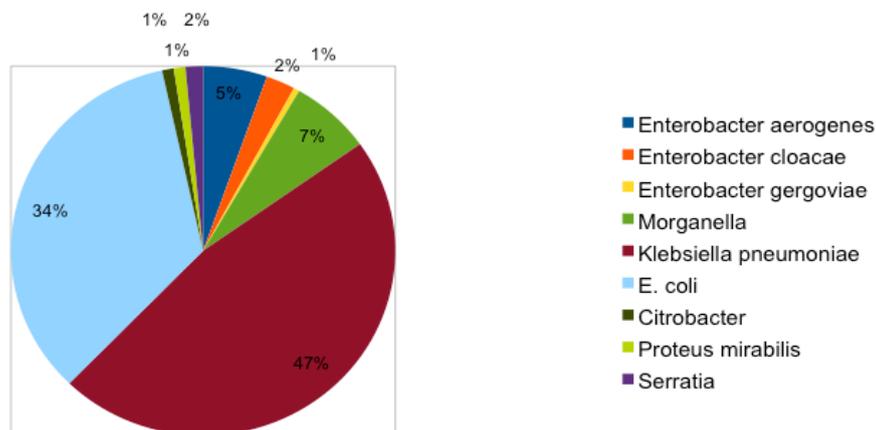


Figura 6 – Distribuição dos isolados bacterianos pelos produtos biológicos.

Através da análise da Tabela 3 e dos gráficos das Figuras 5 e 6, verifica-se que as espécies predominantes nos isolados bacterianos recolhidos nos HUC são *Klebsiella pneumoniae* (=47%) e *Escherichia coli* (=34%), existindo também uma percentagem significativa de estirpes *Morganella morganii* (aproximadamente 7%). É de realçar o aparecimento de *Morganella morganii* multirresistentes neste hospital, uma vez que não é uma espécie frequentemente encontrada. A urina foi a amostra biológica de onde foram recolhidos mais isolados (108 em 204, ou seja, aproximadamente 53%), e em que 60 dos 108 isolados são *Klebsiella pneumoniae* (55,6%) e 36 são *Escherichia coli* (33,4%). Verifica-se também que 14 das 204 amostras (cerca de 7%) foram isoladas a partir do sangue de pacientes, sendo também a *Klebsiella pneumoniae* (50%) e a *Escherichia coli* (28,6%) as estirpes predominantes. Em relação ao trato respiratório, 6 das 8 amostras isoladas a partir de aspirados brônquicos (75%) são estirpes de *Klebsiella pneumoniae*.

Verifica-se assim, que *Klebsiella pneumoniae* foi a espécie predominante nas amostras clínicas dos HUC durante o período de estudo, incluindo em urinas, onde é muito mais frequente encontrar-se *Escherichia coli*.

De salientar que houveram 34 amostras (=16,7%) que não tinham qualquer indicação acerca do produto biológico que foram isoladas.

9.2. Suscetibilidade dos isolados aos antimicrobianos

Juntamente com as amostras, foram fornecidos pelos HUC o 'Relatório do Laboratório', com informação da sensibilidade dos isolados a alguns antibióticos selecionados, analisados pelo Vitek 2 AES, cujos valores são apresentados na Tabela 4, sendo mais perceptível os elevados valores de resistência ao analisarmos o gráfico da Figura 3. De salientar que, não foram utilizados os mesmos antibióticos para todos os isolados, logo os valores apresentados correspondem ao número de isolados testados para o antibiótico indicado.

Antibióticos	Nº de isolados (%)			Total
	Sensível	Intermédio	Resistente	
Ampicilina	0	1 (0,6%)	166 (99,4%)	167
Amox. /AC	31 (18,67%)	76 (45,78%)	59 (35,54%)	166
Piper./Tazob.	57 (34,97%)	35 (21,47%)	71 (43,56%)	163
Cefalotina	0	1 (0,6%)	166 (99,4%)	167
Cefuroxima	4 (2,63%)	2 (1,32%)	146 (96,05%)	152
Cefotaxima	20 (12,2%)	29 (17,16%)	115 (70,12%)	164
Ceftazidima	19 (11,45%)	83 (50%)	64 (38,55%)	166
Meropenem	146 (100%)	0	0	146
Ertapenem	161 (99,38%)	1 (0,62%)	0	162
Gentamicina	80 (48,19%)	6 (3,61%)	82 (38,55%)	166
Tobramicina	41 (26,45%)	6 (3,87%)	108 (69,68%)	155
Amicacina	104 (63,41%)	59 (35,97%)	1 (0,61%)	164
Levofloxacina	25 (15,34%)	3 (1,84%)	135 (82,82%)	163
Ciprofloxacina	28 (16,67%)	2 (1,19%)	138 (82,14%)	168
Trim./Sulfam.	41 (24,55%)	0	126 (75,45%)	167
Nitrofurantoína	61 (39,1%)	28 (17,95%)	67 (42,95%)	156
Tigeciclina	98 (88,3%)	5 (4,5%)	8 (7,2%)	111

Tabela 4 – Suscetibilidade aos antibióticos testados no Vitek 2 AES (BioMérieux, França)
(Piper./Tazob. – Piperaciclina/Tazobactam; Trim./Sulfam. – Trimetoprim/Sulfametazol;
Amox./AC – Amoxicilina/Ácido Clavulânico)



Figura 7 – Suscetibilidade aos antibióticos testados no Vitek 2 AES (BioMérieux, França) (Piper./Tazob. – Piperacilina/Tazobactam; Trim./Sulfam. – Trimetoprim/Sulfametazol; Amox./AC – Amoxicilina/Ácido Clavulânico)

Através da análise da Tabela 4 e do gráfico da Figura 7, é claramente visível que os isolados estudados apresentam resistência a múltiplos antibióticos, o que dificulta a abordagem terapêutica por parte dos clínicos. Para além da elevada resistência aos antibióticos β -lactâmicos (ampicilina, amoxicilina, piperacilina, cefalotina, cefuroxima) incluindo as cefalosporinas de 3^a geração (cefotaxima e ceftazidima), indicando provavelmente a presença de organismos produtores de β -lactamases de largo espectro e/ou de AmpC, também se observam elevadas percentagens de resistência aos aminoglicosídeos, gentamicina e tobramicina, e às fluoroquinolonas, levofloxacina e ciprofloxacina. De salientar que organismos produtores de β -lactamases de largo espectro frequentemente possuem fatores de resistência para outras classes de antibióticos⁶. Quando as amostras apresentam constantemente estes perfis de suscetibilidade, é

importante que a pesquisa de bactérias multirresistentes se proceda de forma rotineira pelos laboratórios de microbiologia do hospital.

Em termos de resistência, verifica-se que 166 dos 167 isolados testados com a ampicilina (99,4%), representando aqui as benzilpenicilinas, apresentam resistência ao antibiótico, assim como a cefalotina, que representa as cefalosporinas de 1ª geração (166 dos 167 isolados são resistentes). Se se considerar um isolado classificado de intermédio como resistente, podemos concluir que em relação à ampicilina e à cefalotina, 100% dos isolados em estudo são resistentes, o que era de esperar devido ao estreito amplo de ação das referidas famílias de antibióticos, principalmente em relação às estirpes produtoras de β -lactamases.

Ao analisarmos as associações das penicilinas com os inibidores das β -lactamases, verificamos que os isolados apresentam uma percentagem significativa de resistência: 59 dos 166 isolados (35,5%) testados com a amoxicilina associada ao ácido clavulânico são resistentes, sendo 45,8% (76 isolados) intermédios; relativamente à associação piperacilina com o tazobactam, 43,6% dos isolados testados com estes antibióticos (71 em 163 isolados), apresentam um perfil de resistência, sendo 35 dos 163 isolados (21,7%) intermédios.

Relativamente aos antibióticos, nos quais isolados apresentaram elevada sensibilidade, os carbapenemos evidenciaram-se. São a única classe de antimicrobianos, que apresenta uma grande eficácia contra microrganismos produtores de β -lactamases. Dito de outro modo, foram os que apresentaram maior sensibilidade entre todas as famílias, nas quais os 146 isolados testados apresentaram 100% de sensibilidade ao meropenem, e 161 dos 162 isolados apresentaram sensibilidade ao ertapenem (99,8%). Estes são, realmente, os agentes de primeira linha no tratamento de infeções causadas por organismos produtores de ESBLs, embora não existam dados de ensaios clínicos randomizados que apoiem esta utilização. As evidências desta terapêutica advêm de uma série de casos e estudos retrospectivos, que expõem resultados favoráveis em pacientes tratados com carbapenemos.³ Embora não tenhamos procedido à pesquisa de carbapenemases, os resultados indicam que à partida não estarão presentes nos isolados estudados, à exceção de um isolado de *Klebsiella pneumoniae* que apresentou um valor

intermédio ao ertapenem. É necessário estar atento ao aparecimento de carbapenemases nos Hospitais da Universidade de Coimbra, uma vez que, embora nunca tenha sido identificada nenhuma carbapenamase em *Klebsiella pneumoniae* no referido hospital, sabe-se que em Portugal, nomeadamente no Hospital de Santa Maria em Lisboa, a carbapenemase KPC já se encontra disseminada.²⁰

Apesar da elevada sensibilidade dos isolados à amicacina, em que das 164 amostras estudadas, 104 apresentam sensibilidade ao antibiótico (cerca de 63,4%), é necessário ter em conta que este aminoglicosídeo apresenta oto e nefrotoxicidade³, pelo que não será a escolha inicial de tratamento, especialmente em indivíduos com a função renal comprometida.

Em relação à tigeciclina, 88,3% dos isolados apresentam sensibilidade (98 em 111 isolados testados), representando uma boa alternativa terapêutica. A tigeciclina foi aprovada pela U.S. *Food and Drug Administration* (FDA) a 15 Junho de 2005, e é o primeiro antibiótico de uma nova classe terapêutica, as gliciliclinas, que se relaciona diretamente a nível molecular com as tetraciclina.^{3,21} A figura 8 mostra a similaridade destas moléculas. É indicada em monoterapia, por via intravenosa, em infeções graves intra-abdominais, pele e tecidos moles. Atuam na subunidade 30S do ribossoma, bloqueando a entrada do RNA de transferência, impedindo assim a alongação das cadeias peptídicas, não permitindo a síntese de proteínas. A resistência à tigeciclina é devido a bombas de efluxo, diferentes das que efluxam as tetracilinas. Embora haja uma semelhança estrutural, a tigeciclina tem ação contra as bactérias resistentes às tetraciclina. Esta resistência às tetraciclina é conseguida pela expulsão do antibiótico para fora da célula através de proteínas de efluxo (denominadas *Tet*) e pela proteção do ribossoma garantida pelas proteínas de proteção ribossomal. Especula-se que a longa cadeia da tigeciclina impede a ligação da maioria das proteínas de efluxo, impedindo assim a sua expulsão da célula, e a sua forte ligação ao local ativo (5 vezes mais do que as tetraciclina) impede a sua dissociação pelas proteínas que protegem o ribossoma. Para além de ultrapassar o mecanismo de resistência da degradação enzimática, parece que resiste também à modificação do alvo e mutações na girase do DNA, o que torna este tratamento promissor contra patógenos multirresistentes. Infelizmente, foram reportadas resistências intrínsecas em algumas Enterobactérias, como *Proteus spp* e *Morganella spp*. Tendo em conta a farmacocinética da

tigeciclina, nomeadamente o seu metabolismo (que não é extensivamente metabolizada⁹⁾ e a sua excreção (sabemos que as vias maioritárias são a via biliar e a excreção fecal, sendo também importante a via renal e a glucuronidação pelo fígado), é importante tê-la em conta em doentes com os sistemas digestivo e renal comprometidos, assim como os doentes transplantados de fígado, rins e intestino. Para além da otimização dos regimes de administração/dosagem nestes doentes, é necessário uma monitorização regular da resposta ao tratamento. De notar que a tigeciclina não é removida por hemodiálise, fator a ter em conta no caso de suspeita de overdose em doentes com o sistema renal comprometido. É também importante referir que a tigeciclina interfere na *clearance* da varfarina, sendo necessário monitorizar os testes de coagulação, como os da protrombina. Apesar da sua excelente atividade contra as Enterobactérias, incluindo os organismos produtores de ESBLs, a sua utilização, apesar de promissora, é limitada, uma vez que muitos destes organismos encontram-se no trato urinário, onde a tigeciclina tem uma penetração limitada. Para além disso, devido à sua rápida distribuição pelos tecidos após administração intra-venosa, a sua utilização é limitada em infeções na corrente sanguínea.^{3,21}

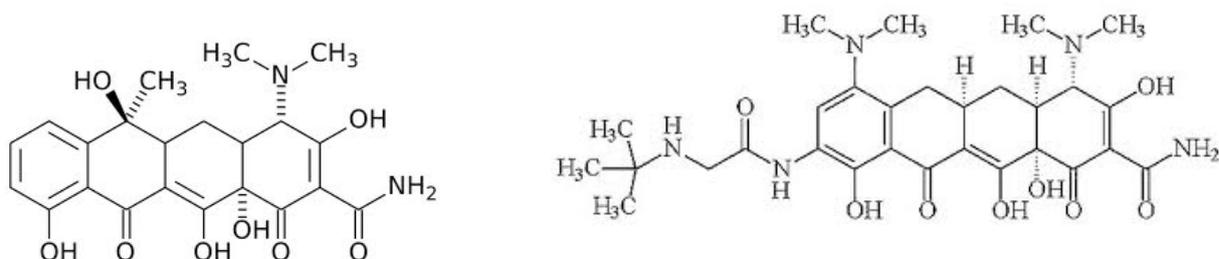


Figura 8 - Estrutura molecular da tetraciclina e da tigeciclina.

Depois de analisarmos as resistências dos isolados por antibiótico, procedeu-se à análise das resistências a cada antibiótico por cada espécie/género. Os resultados (em percentagem) encontram-se na tabela seguinte (Tabela 5).

Resistência (%)									
Antibióticos	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Citrobacter sp</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Serratia sp</i>
Ampicilina	100% (n=10)	100% (n=4)	100% (n=1)	100% (n=13)	100% (n=76)	98,27% (n=58)	100% (n=2)	100% (n=2)	100% (n=1)
Amox. /AC	100% (n=10)	100% (n=4)	100% (n=1)	100% (n=13)	85,53% (n=76)	68,42% (n=57)	100% (n=2)	0% (n=2)	100% (n=1)
Piper./Tazob.	100% (n=10)	100% (n=4)	0% (n=1)	27,27% (n=11)	78,38% (n=74)	48,28% (n=58)	100% (n=2)	0% (n=2)	0% (n=1)
Cefalotina	100% (n=10)	100% (n=4)	100% (n=1)	100% (n=13)	100% (n=76)	100% (n=58)	100% (n=2)	100% (n=2)	100% (n=1)
Cefuroxima	90% (n=10)	100% (n=4)	100% (n=1)	100% (n=7)	97,14% (n=70)	98,25% (n=57)	100% (n=2)	100% (n=2)	100% (n=1)
Cefotaxima	90% (n=10)	100% (n=4)	0% (n=1)	81,82% (n=13)	94,74% (n=76)	78,95% (n=57)	100% (n=2)	100% (n=2)	100% (n=1)
Ceftazidima	90% (n=10)	100% (n=4)	100% (n=1)	75% (n=12)	96,05% (n=76)	79,31% (n=58)	100% (n=2)	100% (n=2)	100% (n=1)
Meropenem	0% (n=6)	0% (n=4)	0% (n=1)	0% (n=8)	0% (n=65)	0% (n=57)	0% (n=2)	0% (n=2)	0% (n=1)
Ertapenem	0% (n=10)	0% (n=4)	0% (n=1)	0% (n=10)	0% (n=75)	1,75% (n=57)	0% (n=2)	0% (n=2)	0% (n=1)
Gentamicina	20% (n=10)	50% (n=4)	100% (n=1)	69,23% (n=13)	86,84% (n=76)	64,4% (n=59)	50% (n=2)	100% (n=2)	100% (n=1)
Tobramicina	71,43% (n=7)	25% (n=4)	100% (n=1)	55,56% (n=9)	85,92% (n=71)	63,8% (n=58)	50% (n=2)	100% (n=2)	100% (n=1)
Amicacina	50% (n=8)	25% (n=4)	100% (n=1)	25% (n=12)	25,3% (n=75)	50,85% (n=59)	0% (n=2)	50% (n=2)	100% (n=1)
Levofloxacina	66,67% (n=9)	0% (n=4)	0% (n=1)	72,73% (n=11)	94,74% (n=76)	87,72% (n=57)	50% (n=2)	50% (n=2)	0% (n=1)
Ciprofloxacina	60% (n=10)	0% (n=4)	0% (n=1)	61,54% (n=13)	97,37% (n=76)	84,75% (n=59)	50% (n=2)	50% (n=2)	0% (n=1)
Trim./Sulfam.	70% (n=10)	0% (n=4)	0% (n=1)	61,54% (n=13)	88,16% (n=76)	72,41% (n=58)	50% (n=2)	50% (n=2)	0% (n=1)
Nitrofurantoína	87,5% (n=8)	100% (n=4)	100% (n=1)	100% (n=8)	93,05% (n=72)	8,62% (n=58)	0% (n=2)	100% (n=2)	100% (n=1)
Tigeciclina	0% (n=7)	0% (n=3)	0% (n=1)	100% (n=4)	15,1% (n=76)	0% (n=39)	0% (n=2)	100% (n=1)	0% (n=1)

Tabela 5 – Percentagem de resistência para cada espécie/género. Foram considerados também resistentes os isolados que apresentaram valores de intermédio. (n = x corresponde ao número total de amostras testadas, da referida espécie/género, com o antibiótico indicado)

Analisando a tabela, é possível constatar novamente a elevada percentagem de resistência por parte dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* à maioria dos antibióticos,

incluindo os de largo espectro. De salientar, também, as elevadas resistências por parte de todos os isolados à maioria dos antibióticos de largo espectro.

No caso de infecções graves e em doentes internados nas unidades dos cuidados intensivos, é necessário um início de tratamento rápido. Daí a importância da terapêutica empírica, que é iniciada tendo em conta as bactérias que infetam frequentemente os diferentes órgãos do organismo e o perfil de suscetibilidade da zona geográfica ou instituição em questão. Normalmente, para infecções graves, inicia-se a terapêutica com cefalosporinas de segunda ou terceira geração, mas pela análise da Tabela 5, verifica-se elevadas percentagens de resistência em todas as espécies para todas as cefalosporinas estudadas. Com esta análise conclui-se que o tratamento empírico nestes casos resultaria em falhas de tratamento. A menor resistência apresentada por penicilinas e cefalosporinas corresponde à associação da piperacilina com o tazobactam (excetuando *Enterobacter sp.* e *Citrobacter sp.* que apresentaram 100%), o que poderá ocorrer devido ao tazobactam, pois pensa-se ser o inibidor mais potente, que é ativo contra algumas enzimas TEM, SHV e CTX-M. De salientar que os isolados de *Escherichia coli* apresentaram, a nível percentual, as menores resistências para estes grupos de antibióticos. Tendo em conta a elevada percentagem de resistências aos antibióticos β -lactâmicos, principalmente nas espécies mais disseminadas, como é o caso da *Klebsiella pneumoniae* e da *Escherichia coli*, assim como para os aminoglicosídeos (gentamicina e tobramicina) e as fluoroquinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina), é necessária a criação e implementação de documentos orientadores de prescrição e monitorização de isolados multirresistentes, de maneira a ser possível a seleção da terapêutica mais adequada o mais rapidamente possível.

9.3. Deteção das β -lactamases pelo teste fenotípico

As Figuras 9, 10 e 11 abaixo apresentadas, são representativas de uma deteção de β -lactamases Amp C e ESBL pelo método de difusão em disco.

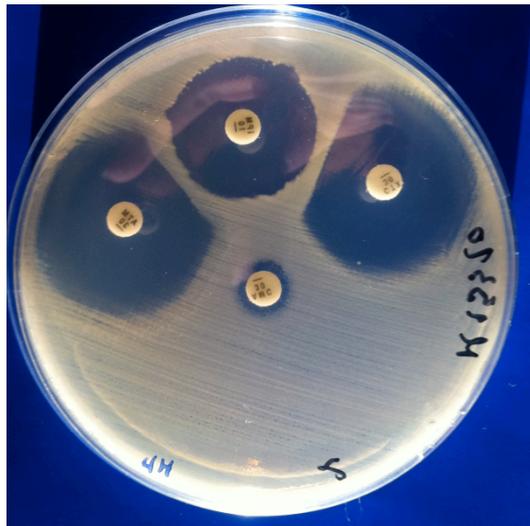


Figura 9 – Antibiograma de um isolado de *Enterobacter aerogenes* onde é visível a deformação do halo de inibição pela indução do imipenem, que sugere a presença de uma Amp C. (AMC ao centro, no sentido dos ponteiros do relógio ATM, IMP e CTX)

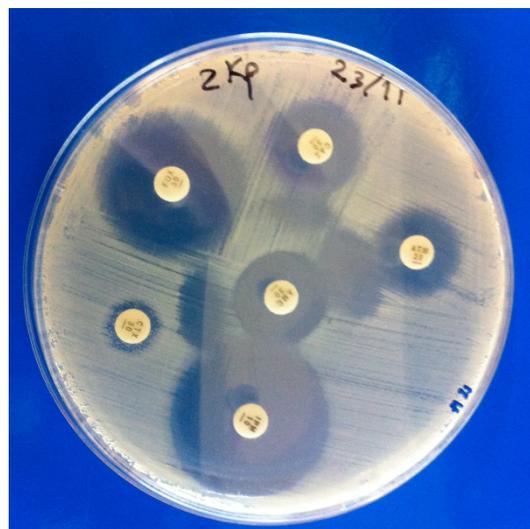


Figura 10 – Antibiograma de um isolado de *Klebsiella pneumoniae* onde é visível a inibição pelo ácido clavulânico que sugere a presença de ESBL. Uma vez que o halo da cefotaxima (CTX) é quase zero e o da ceftazidima maior que o da cefotaxima, esta situação sugere a presença de uma CTX-M-type. (AMC ao centro, no sentido dos ponteiros FOX, CAZ, ATM, IMP, CTX)



Figura 11 – Antibiograma de um isolado de *Enterobacter aerogenes* em que o halo da cefotaxima é superior ao da ceftazidima, sugerindo a presença de uma ESBL não do tipo CTX-M. (AMC ao centro, no sentido dos ponteiros do relógio IMP, ATM, CAZ, FOX e CTX)

Por meio da análise dos antibiogramas obtidos pelo método de *Kirby-Bauer*, foi possível avaliar o número de bactérias produtoras de ESBLs e Amp C. Os resultados encontram-se na Tabela 6 e na Figura 12. Não foram estudados por este método trinta e nove isolados de *Klebsiella pneumoniae* e vinte e oito isolados de *Escherichia coli*.

Espécie	Teste Fenotípico			Total
	ESBL	Amp C	ESBL + Amp C	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2 (18,18%)	5 (45,45%)	1 (9,09%)	8 (72,73%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 (20%)	2 (40%)		3 (60%)
<i>Enterobacter gergoviae</i>	1 (100%)			1 (100%)
<i>Morganella morganii</i>		7 (50%)	4 (28,57%)	11 (78,57%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40 (70,18%)			40 (70,18%)
<i>Escherichia coli</i>	25 (59,52%)	2 (4,76%)		27 (64,3%)
<i>Citrobacter sp</i>		1 (50%)		1 (50%)
<i>Proteus mirabilis</i>				
<i>Serratia sp</i>		3 (100%)		3 (100%)
Total	69 (50,36%)	20 (14,6%)	5 (3,65%)	94 (68,6%)

Tabela 6 – Detecção da presença de β -lactamases pelo teste fenotípico (método de Kirby-Bauer)

Através da análise da Tabela 6, verifica-se que os dois isolados estudados de *Proteus mirabilis* não apresentaram ESBLs e Amp C por este método, e os três isolados de *Serratia sp* estudados apresentaram Amp C. Não foram detetadas ESBLs nos isolados de *Citrobacter sp*, *Proteus mirabilis* e *Serratia sp*, assim como não se verificou a presença de Amp C nos isolados de *Enterobacter gergoviae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. De salientar a elevada percentagem de ESBL detetada nos isolados de *Klebsiella pneumoniae* (70,2%) e em *Escherichia coli* (59,5%). A distribuição das β -lactamases sugeridas pelo método de difusão em disco é mostrada na Figura 12.

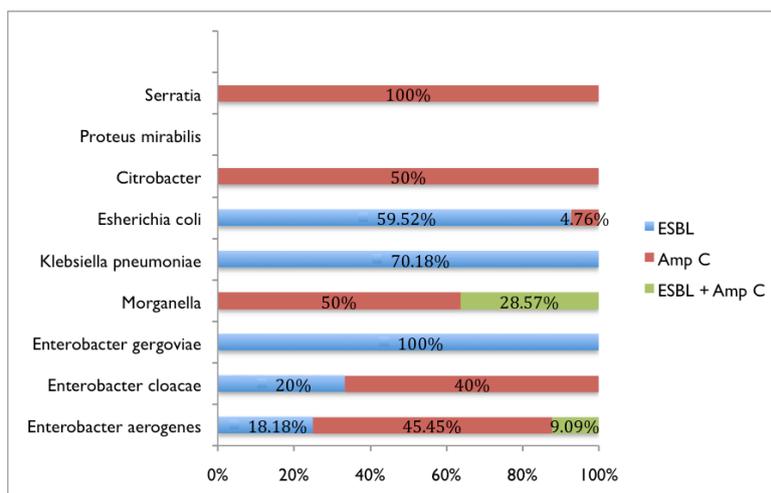


Figura 12 – Percentagem da detecção de β -lactamases (ESBLs e Amp C) pelo teste fenotípico Kirby-Bauer

Ao analisar o gráfico da Figura 12, verificamos a elevada incidência de Amp C nos isolados de *Serratia sp*, *Citrobacter sp*, e em metade dos isolados *Morganella morganii* estudados, a somar aos quatro isolados que apresentaram simultaneamente ESBLs e Amp C (28,6%), o que era teoricamente esperado. Esperava-se uma maior incidência de Amp C nos isolados de *Enterobacter sp.*, o que só se verificou em algumas espécies, pois utilizou-se fortes indutores de Amp C na realização do método de difusão em disco, como a ceftioxime e o imipenem. Nos isolados que apresentaram concomitantemente ESBL e Amp C, a escolha da terapêutica deve ser bem estudada, tendo em conta as resistências que apresentam, uma vez que do grupo dos β -lactâmicos, apenas os carbapenemos poderão ser utilizados. Com os dados apresentados na Tabela 5, as percentagens de resistências por parte dos isolados que apresentam Amp C e ESBL simultaneamente são muito elevadas, apresentando a gentamicina e a amicacina para *Enterobacter aerogenes* e a amicacina para *Morganella morganii* valores razoáveis para instituir uma terapêutica, não esquecendo a possibilidade de oto e nefrotoxicidade pela amicacina.

9.4. Pesquisa de β -lactamases por métodos moleculares

Considerando que as ESBLs eram as β -lactamases mais frequentemente encontradas procedeu-se à identificação do tipo de ESBL em cada isolado.

A Tabela 7 mostra a frequência das β -lactamases do tipo TEM, SHV e CTX-M encontradas por espécie/género bacteriano, assim como a percentagem de isolados com associações de ESBLs diferentes.

Espécie	CTX	TEM	SHV	TEM + SHV	TEM + CTX	SHV + CTX	TEM + SHV + CTX	Ausente
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	5 (45,45%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)	0	0	3 (27,27%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	1 (20%)	0	0	0	0	4 (80%)
<i>Enterobacter gergoviae</i>	0	0	1 (100%)	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii</i>	0	0	0	1 (7,14%)	1 (7,14%)	0	0	12 (85,71%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6 (6,25%)	5 (5,21%)	3 (3,13%)	14 (14,58%)	22 (22,92%)	3 (3,13%)	39 (40,63%)	4 (4,17%)
<i>Escherichia coli</i>	35 (50%)	7 (10%)	0	2 (2,86%)	15 (21,43%)	2 (2,86%)	1 (1,43%)	8 (11,43%)
<i>Citrobacter sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	2 (100%)
<i>Serratia sp.</i>	1 (33,33%)	0	0	0	0	0	0	2 (66,67%)
<i>Proteus mirabilis</i>	0	1 (50%)	0	0	0	1 (50%)	0	0
Total	42 (20,59%)	18 (8,82%)	6 (2,94%)	18 (8,82%)	39 (19,12%)	6 (2,94%)	40 (19,61%)	35 (17,17%)

Tabela 7 – Detecção da presença de β -lactamases por PCR com primers específicos para TEM, SHV e CTX-M.

Através da análise da Tabela 7, é claramente visível a predominância da β -lactamase do tipo CTX-M (62,6%) seguida da TEM, com uma percentagem de 56,7%. De

salientar a elevada percentagem dos três tipos de β -lactamases estudadas (CTX, TEM e SHV) encontrada em *Klebsiella pneumoniae*.

A distribuição por espécie/género é mais visível na Figura 13.

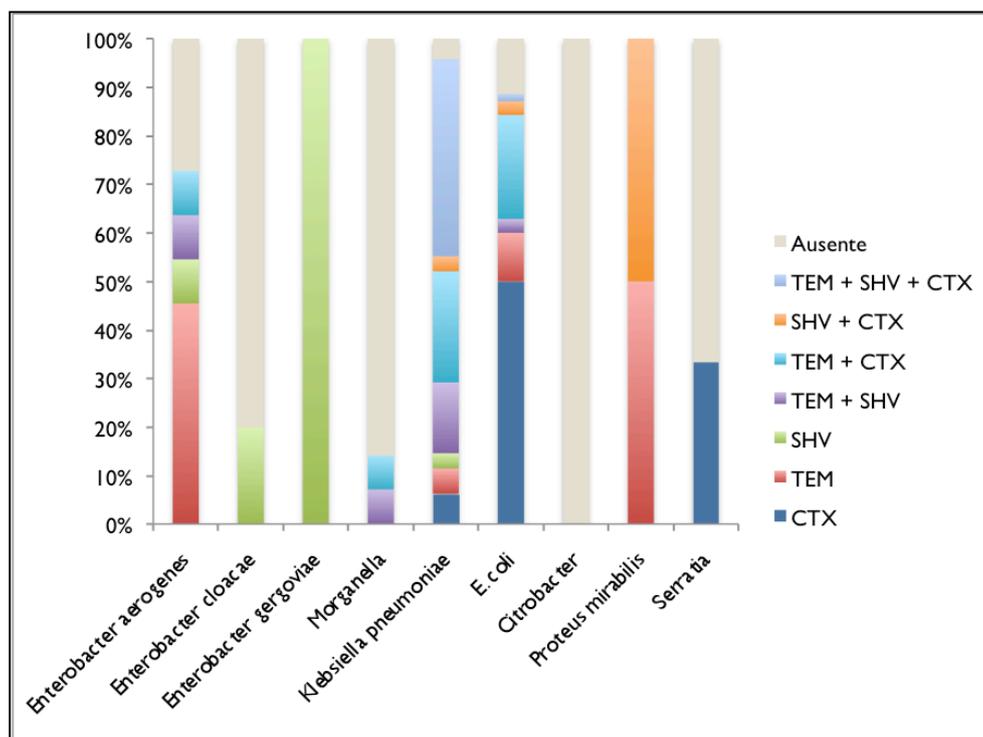


Figura 13 – Distribuição de β -lactamases do tipo TEM, SHV e CTX-M por espécies/género de Enterobactérias

Estes resultados mostram uma maior prevalência de CTX-M em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia sp.* e *Proteus mirabilis*. Todas as CTX-M são enzimas de largo espectro, embora variável, e estão descritas em todo o mundo, tendo vindo suplantar as de largo espectro do tipo TEM e SHV.¹⁷ A *Escherichia coli* é a espécie mais frequentemente associada a CTX-M, especialmente CTX-M-15, com a capacidade de hidrolisar eficientemente ceftazidima e cefotaxima, embora comece também a aparecer em *Klebsiella pneumoniae*.¹³ As enzimas SHV são frequentes em *Klebsiella pneumoniae*. De notar que as enzimas do tipo TEM e SHV detetadas por PCR podem não ser ESBLs, mas sim, TEM-1/2

e SHV-1/2, enzimas de estreito espectro. Contudo, embora tenham sido estudadas por PCR todas as amostras enviadas, a maioria apresentava ESBLs pelo método de sinergismo em disco. Assim, nos isolados em que só se encontraram TEM ou SHV isoladamente, poderemos pensar que são ESBL, porque são mais comuns, não descartando a possibilidade da presença de outras ESBLs não descritas como frequentes, que não foram pesquisadas por PCR.

A tabela seguinte (Tabela 8), compara os resultados obtidos para *Enterobacter gergoviae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* no Vitek, teste fenotípico e teste molecular, e para as restantes estirpes pelo teste fenotípico e molecular.

Espécie	Vitek	Método difusão em disco	Teste molecular
<i>Enterobacter aerogenes</i>		27,27%	73,73%
<i>Enterobacter cloacae</i>		20%	20%
<i>Enterobacter gergoviae</i>	100%	100%	100%
<i>Morganella morganii</i>		28,57%	14,30%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97,37%	70,18%	95,83%
<i>Escherichia coli</i>	98%	59,52%	88,57%
<i>Citrobacter sp</i>		0%	0%
<i>Proteus mirabilis</i>		0%	100%
<i>Serratia sp</i>		50,36%	33,33%

Tabela 8 – Comparação da percentagem de ESLBs encontradas pelo teste fenotípico (antibiogramas) e pelo teste molecular (PCR).

Os resultados apresentados mostram uma grande discrepância de valores entre a pesquisa de β -lactamases pelo teste fenotípico comparativamente com o Vitek e teste molecular. A elevada deteção pelo teste molecular de β -lactamases em *Klebsiella*

pneumoniae (95,83%) não se verificou no teste fenotípico (70,18%), assim como em *Escherichia coli* (88,57% contra 59,52%). O fato de não termos pesquisado pelo teste fenotípico trinta e nove isolados de *Klebsiella pneumoniae* e os vinte e oito isolados de *Escherichia coli* poderá estar na base desta diferença de resultados. No entanto, poderemos concluir que, apesar de numa primeira análise possamos utilizar o método fenotípico para detecção de β -lactamases para iniciar a terapêutica, é importante a realização do teste molecular quando o objetivo é a detecção de estirpes produtoras de β -lactamases.

9.5 Genotipagem dos isolados

No último trabalho laboratorial realizado, procedeu-se à genotipagem dos isolados com o objetivo de verificar a variabilidade genética nos isolados fornecidos. As Figuras 14, 14a, 15 e 15a, mostram a similaridade genética entre os isolados de cada espécie ou género, tendo sido usado primers aleatórios, que ligam em vários locais do genoma. Foi considerado que os isolados eram a mesma estirpe se o perfil de impressão digital de DNA fosse igual, clonalmente relacionadas entre si se existisse uma a três bandas de diferença, ou distintas geneticamente com mais de quatro bandas de diferença.²² Um clone pode ser definido como um grupo de isolados bacterianos recolhidos independentemente em datas e locais diferentes, mas que apresentam uma estrutura genética base homóloga, o que sugere uma origem filogenética comum.²³

Através da análise dos resultados obtidos através da técnica BOX-PCR, conclui-se que não existia muita variabilidade genética entre os isolados de *Klebsiella pneumoniae*, uma vez que o perfil da eletroforese era idêntico na maioria das amostras, como se verifica nas Figuras 14 e 14a. Analisando todos os isolados de *Klebsiella pneumoniae*, encontraram-se apenas 5 perfis diferentes (A, B e C), com 3 muito semelhantes entre si (A1, A2 e A3), o que indica a presença de 3 clones em 96 amostras, que se encontram disseminados pelos vários serviços hospitalares. Em relação aos restantes isolados, incluindo os de *Escherichia coli*, os resultados obtidos indicaram uma maior variabilidade

genética, tendo sido encontrados 8 clones (A a H) nas 70 amostras estudadas de *Escherichia coli*. Dentro de cada um dos clone há ligeiras variações (de uma a duas bandas). Estes clones podem ser provenientes de serviços diferentes, mas a semelhança genética entre eles indica uma origem comum.

Estes resultados sugerem que, no caso de *Klebsiella pneumoniae*, existe nos HUC um clone multirresistente prevalente e altamente disseminado por vários serviços do hospital, salientando a necessidade imperativa de se melhorar e implementar medidas de controlo de infeção hospitalar mais eficiente, e dirigidas a este clone.

Relativamente à *Escherichia coli*, os isolados apresentam maior variabilidade genética, denotando diversas origens, como por exemplo, indivíduos que entram no hospital já colonizados com isolados resistentes ou que adquirem resistência após hospitalização do doente submetido a vários regimes terapêuticos. Estes clones podem existir há já algum tempo nos HUC, e porque apresentam uma enorme plasticidade genética, têm vindo a evoluir e a adquirir novas resistências, como a aquisição do determinante da CTX-M. Neste caso, pode ser mais difícil o controlo da disseminação utilizando apenas as medidas gerais de controlo de infeção, pelo que os regimes antibacterianos e a política de antibióticos usada no hospital deve ser revista.

Três dos isolados correspondiam à espécie *Serratia marcescens*. É preciso ter em conta que este microrganismo pode apresentar resistência às soluções desinfetantes e antissépticas, usadas para desinfeção.

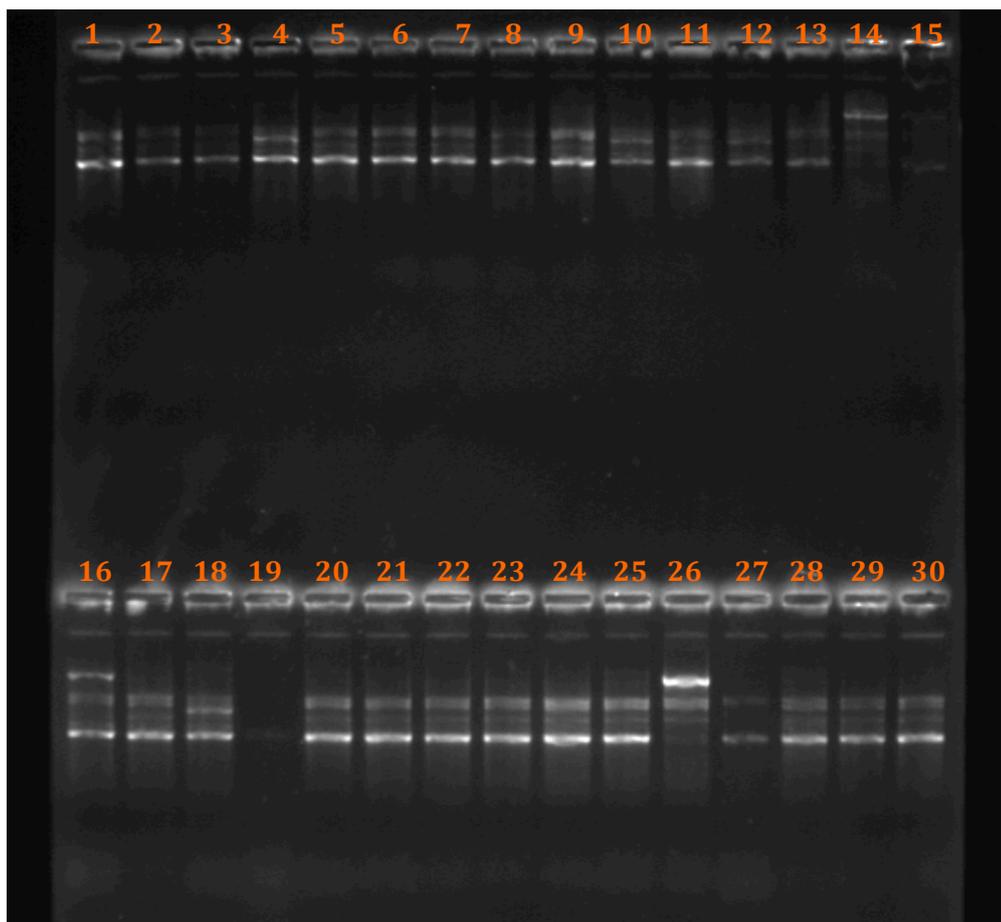


Figura 14 – Eletroforese dos amplicões obtidos pela BOX-PCR de alguns isolados de *Klebsiella pneumoniae*. (Clone A1 – poço 20, clone A2 – poço 25, clone A3 – poço 4, clone B – poço 26).

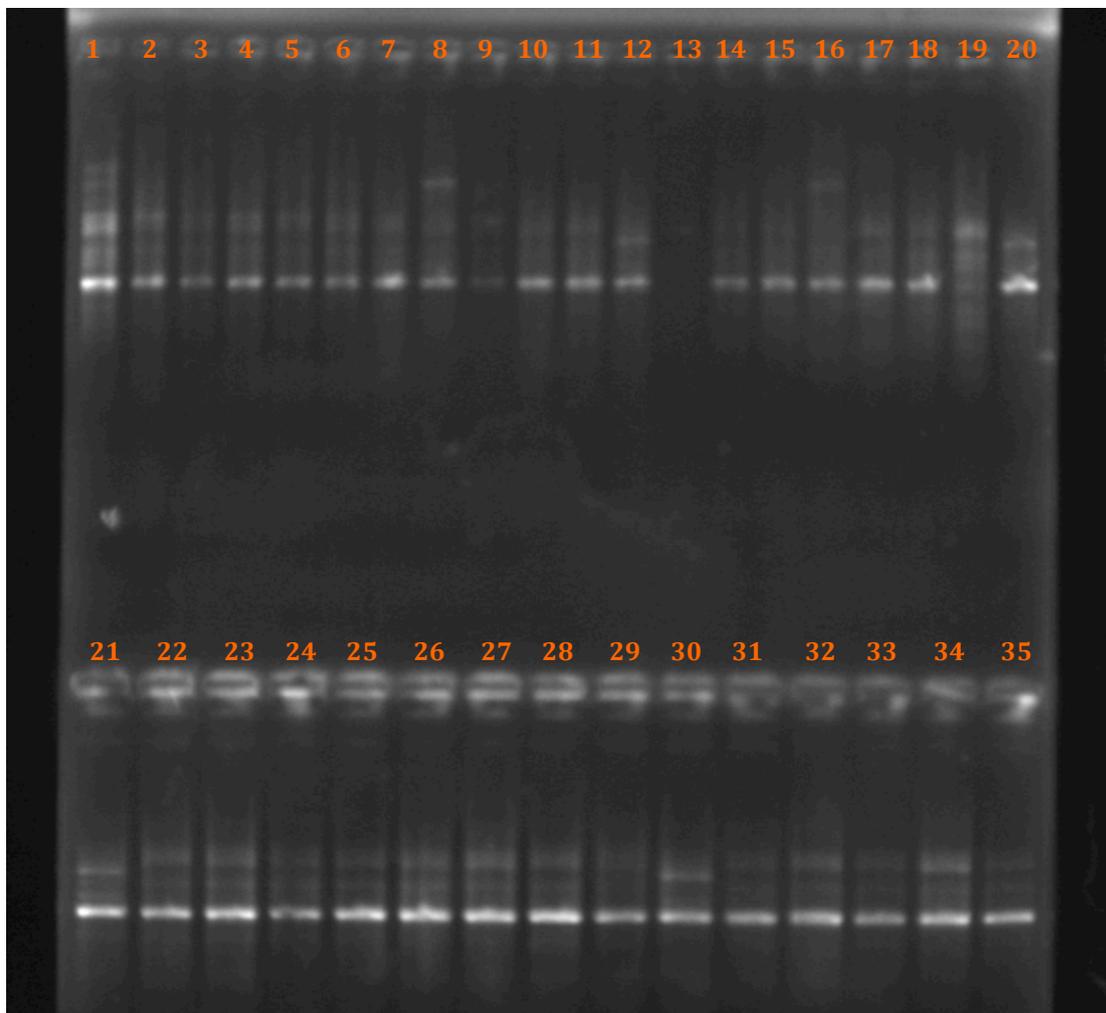


Figura 14a – Eletroforese dos amplicões obtidos pela BOX-PCR de alguns isolados de *Klebsiella pneumoniae*. (Clone C – poço 1)

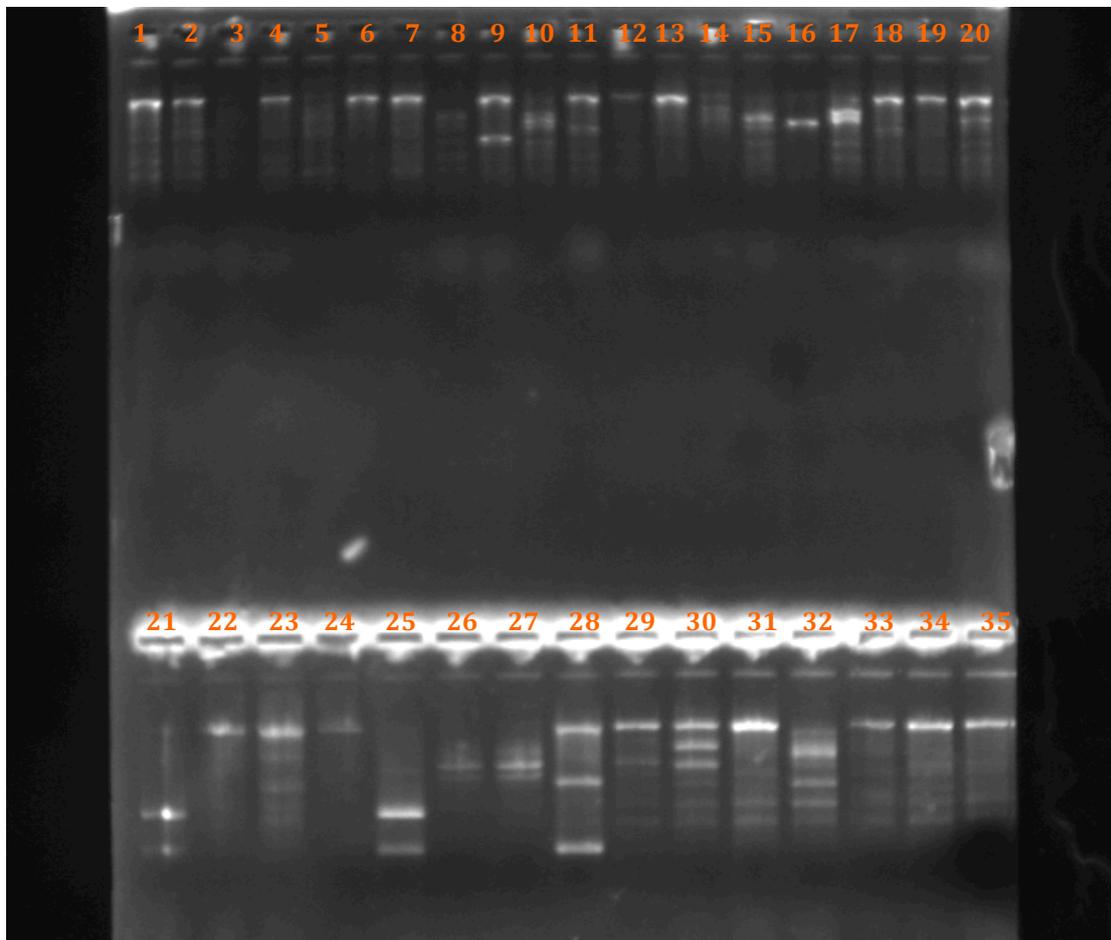


Figura 15 – Eletroforese dos amplicões obtidos pela BOX-PCR de alguns isolados de *Escherichia coli*. (Clone A – poço 20, clone B – poço 27, clone C – poço 25, clone D – poço 30, clone E – poço 32, clone F – poço 29, clone G – poço 28).

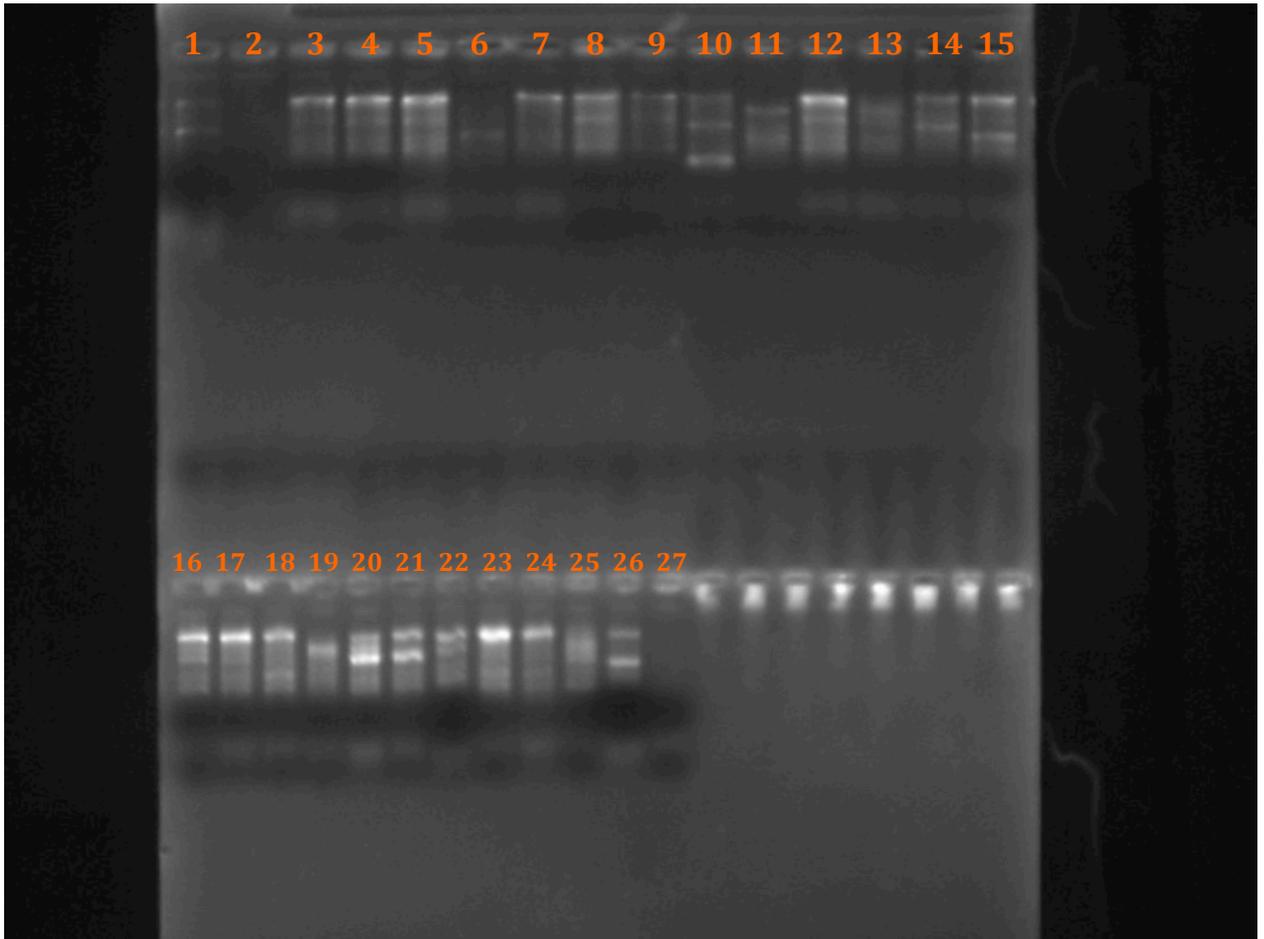


Figura 15a– Eletroforese dos amplicões obtidos pela BOX-PCR de alguns isolados de *Escherichia coli*. (Clone H – poço 4)

Numa perspetiva geral, conclui-se que:

- De todos os isolados bacterianos estudados, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* eram as espécies prevalentes;
- Muitos dos isolados foram recolhidos a partir de urina;
- Existe uma elevada percentagem de infeções no trato urinário causadas por *Klebsiella pneumoniae*, seguindo-se *Escherichia coli*;

- A maioria das infeções na trato respiratório são devidas a *Klebsiella pneumoniae*;
- Todos os isolados apresentam resistências a um preocupante elevado número de antibióticos, incluindo os de largo espectro;
- Os carbapenemos são a única classe de antibióticos realmente efetivos contra bactérias produtoras de β -lactamases;
- A tigeciclina é o primeiro antibiótico de uma nova classe terapêutica, que poderá ser uma escolha alternativa aos carbapenemos;
- Através do método fenotípico *Kirby-Bauer*, foram detetadas uma elevada percentagem de ESBL em *Enterobacter gergoviae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e uma elevada percentagem de Amp C em *Serratia sp*, *Citrobacter sp* e *Morganella morganii*;
- Pelo método molecular, foram detetadas uma elevada percentagem de β -lactamases do tipo CTX-M, principalmente em *Escherichia coli*, seguida da TEM, destacando-se a elevada presença de CTX, TEM e SHV em *Klebsiella pneumoniae*;
- Existe uma elevada similaridade genética entre os isolados estudados, tendo sido identificados 5 clones em 96 amostras de *Klebsiella pneumoniae* (com 3 muito semelhantes entre si) e 8 clones em 70 amostras de *Escherichia coli*. Esta semelhança genética indica uma origem comum que resultou numa disseminação pelos diferentes serviços do hospital.

10. Conclusões Finais

De forma conclusiva e tendo em conta todos os resultados apresentados, conclui-se que existe uma elevada disseminação de bactérias multirresistentes pelos serviços dos HUC. É necessário alertar os profissionais de saúde e a comissão de controlo de infeção hospitalar para esta problemática, sensibilizar para as medidas de controlo de infeção hospitalar como uma lavagem das mãos efetiva, tomar as devidas precauções no contato com doentes colonizados com bactérias produtoras de ESBLs, principalmente nos serviços mais suscetíveis de contaminação, como as unidades de cuidados intensivos, pediatria, neonatologia, cirurgia. É preciso ter em conta que um doente internado encontra-se imunodeprimido, logo suscetível a contrair uma infeção hospitalar. Esta suscetibilidade aumenta se o paciente for sujeito a terapias invasivas como os catéters venosos e urinários, endoscopias, havendo outros factores de risco como a ventilação mecânica e bebés prematuros com pouco peso, por isso, qualquer falha por parte dos profissionais de saúde contribui para a contaminação e disseminação de bactérias pelo hospital. É importante orientar os médicos para a correta prescrição e administração de agentes antimicrobianos, não a fazer de forma excessiva, e orientar a antibioterapia consoante o microrganismo em questão. Para além das medidas a implementar nos serviços hospitalares, existem outros comportamentos que devem ser evitados, como a toma indiscriminada de antibióticos por parte da população, mesmo para constipações e infeções virais, impedir a cedência de antibióticos pelas farmácias sem prescrição e controlar a terapêutica utilizada na criação de animais e na agricultura, porque infelizmente muitos dos antibióticos aprovados para uso humano são administrados em animais com nomes e para fins diferentes (descrito no *Report of the Advisory Committee on Animal Antimicrobial Use Data Collection in the United States of the Alliance for the Prudent Use of Antibiotics*). Apesar do sucesso obtido na Holanda e na Escandinávia na diminuição dos níveis de resistência, implementar todas estas medidas numa escala global tem-se demonstrado uma tarefa difícil.

É necessário refletir sobre as graves consequências do uso indiscriminado de antibióticos de maneira a diminuir a pressão seletiva destes sobre as bactérias e da importância de se adotar as medidas necessárias para o controlo de infeções.

I I. Bibliografia

1. Emily Leung, *et al.* 2011. The WHO policy package to combat antimicrobial resistance. Bulletin of the World Health Organization.
2. Chroma, M., Kolar, M. 2010. Genetic methods for detection of antibiotic resistance: focus on extended-spectrum β -lactamases. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 154.
3. Guimarães, S., Moura, D., Soares da Silva P. Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas. 5ª Edição. Porto Editora.
4. Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., Ochoa T. 2011. Mecanismos Moleculares de Resistencia Antibiótica en *Escherichia coli* Asociadas a Diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Publica, 28.
5. Murray, Patrick R., Rosenthal, Ken S., Kobayashi, G., Pfaller, M. A. Microbiologia Médica. 4ª Edição. Guanabara Koogan.
6. Davies, J., Davies, D. 2010. Origins and evolution of antibiotics resistance. Vol.74, No. 3.
7. Jacoby, G. A. 2009. Amp C -Lactamases. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 22, No. 1.
8. Paterson, D. L., Bonomo, R. A. 2005. Extended Spectrum β -Lactamases: A Clinical Update. Clinical Microbiology Reviews.
9. Gupta, V. 2007. An update on newer β -lactamases. Indian J Med Res 126.
10. Jorgenses, J. H., McElmeel M. L., Fulcher L. C., Zimmer B. L. 2009. Detection of CTX-M-Type Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBLs) by Testing with

MicroScan Overnight and ESBL Confirmation Panels. Journal of Clinical Microbiology.

11. Bush, K., Jacoby, George A., 2010. Updated Functional Classification of β -Lactamases. Vol. 54, No. 3.
12. Bradford, P. 2001. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of this Important Resistance Threat, Vol.14, No.4.
13. Livemore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G. M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T. M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, Laurent., Woodford, N. 2006. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 59.
14. Rupp, Mark E., Fey, Paul D. 2003. Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing Enterobacteriaceae: Considerations for Diagnosis, Prevention and Drug Treatment. 63 (4).
15. Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., Baquero, F. 2006. Dissemination in Portugal of CTX-M-15, OXA-1 and TEM-1 Producing Enterobacteriaceae Strains Containing the *aac(6)-Ib-cr* Gene, which encodes an Aminoglycoside and Fluoroquinolone Modifying Enzyme. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol 50 n°9.
16. Gupta, A., Ampofo, K., Rubenstein, D., Saiman, L. 2003. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Infections: A Review of the Literature. Journal of Perinatology, 23.
17. Neil Woodford, Jane F. Turton, David M. Livermore. 2010. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. Microbiology Services - Colindale, Health Protection Agency, London, UK.
18. Brown, T. A. 2001. Gene Cloning and DNA analysis – An Introduction – 4^o Edition. Blackwell Science Ltd. Oxford.

19. Stryer L. Biochemistry. 1996. 4^o Edition. Guanabara Koogan. New York.
20. Caneiras, C., Calisto, F., da Silva, G., Lito, L., Cristino, J. M., Duarte, A. 2011. Enterobacteriaceae Isolates and KPC-3 Carbapenemase in Portugal: Overview of 2010-2011.
21. Seputiene, V., Povilonis, J., Armalyte, J., Suziedelis, K., Pavilonis, A., Suziedeliene, E. 2010. Tigecycline – how powerful is it in the fight against antibiotic-resistant bacteria?. *Medicine (Kaunas)* 46(4).
22. van Belkum, A., Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N. K., Fushing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M. 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect. Suppl* 3.
23. Orskov, F., Orskov, I. 1983. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the Enterobacteriaceae and other bacteria. *J. Infect. Dis.* 148.
24. WHO – Antimicrobial Resistance: A Global Threat. *Essential Drugs Monitor.* 2000. Double Issue – n^o28 e 29.
25. Patrick Boerlin, Richard J. Reid-Smith. 2008. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. *Animal Health Research Reviews* 9(2).
26. Kanj, S. S., Kanafani, Z. A. 2011. Current Concepts in Antimicrobial Therapy Against Resistant Gram-negative Organisms: Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae, Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, and Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*; *Mayo Clinic Proceedings* 86(3):250-259.
27. Sohei Harada, M. D., Yoshikazu Ishii, M. D., and Keizo Yamaguchi, M.D. 2008. Extended-Spectrum β -Lactamases: Implications for the Clinical Laboratory and Therapy. *Korean J Lab Med*, 28.

28. Harris, R., Cruz, M. 2006. Tigecycline (Tygacil): A Novel First-in-Class, Broad-Spectrum Intravenous Antibiotic For the Treatment of Serious Bacterial Infections; P&T Vol. 31 No. 1.
29. Gimménez, M. J. et al. 2009. Experiencia clínica con tigeclina en el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por aislados con mecanismos de resistencia prevalentes.
30. Pitout, J. D. D., Laupland, K. B. 2008. Extended-Spectrum β -Lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Vol. 8
31. Davies, J., Davies, D. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance; Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 74 No. 3
32. Hun Lee, J., Bae, I. K., Hee Lee, S. 2012. New Definitions of Extended-Spectrum β -Lactamase Conferring Worldwide Emerging Antibiotic Resistance. Medicinal Research Reviews, 32, No. 1.
33. Philip J. Turner. 2005. Extended-Spectrum β -Lactamases. Clinical Infectious Diseases, 41.
34. Taneja, N., Rao, P., Arora, J., Dogra, A. 2008. Occurrence of ESBL & Amp C β -Lactamases & susceptibility to newer antimicrobial agents in complicated UTI. Indian J Med Res, 127.
35. Garcia-Hernández, A. M., Garcia-Vázquez, E., Hernández-Torres, A., Ruiz, J., Yague, G., Herrero, J. A., Gómez, J. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE):significación clínica y perspectivas actuales. Rev Esp Quimioter, 24.
36. Hun Lee, J., Hoon Jeong, S., Cha, Sun-Shin, Hee Lee, Sang. 2009. New Disturbing Trend in Antimicrobial Resistance of Gram-Negative Pathogens. PLoS Pathogenes Volume 5.
37. Neuza de Queirós Santos. 2004. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. Texto e Contexto Enfermagem, Vol. 13

38. Marc J. Struelens. 2003. Multidisciplinary antimicrobial management teams: the way forward to control antimicrobial resistance in hospitals. Lippincott Williams & Wilkins 0951-7375.
39. Donaldson, H., McCalmont, M., Livermore, D. M., Rooney, P. J., Ong, G., McHenry, E., Campbell, R., McMullan, R. 2008. Evaluation of the VITEK 2 AST N-054 test card for the detection of extended-spectrum b-lactamase production in *Escherichia coli* with CTX-M phenotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62.