

Rita Emanuela Fernandes Gralha

Métodos de pesquisa de beta-lactamases em amostras clínicas – estudo de revisão

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2011

Métodos de pesquisa de beta-lactamases em amostras clínicas- estudo de revisão

Rita Emanuela Fernandes Gralha

Métodos de pesquisa de beta-lactamases em amostras clínicas – estudo de revisão

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2011

Rita Emanuela Fernandes Gralha

Métodos de pesquisa de beta-lactamases em amostras clínicas – estudo de revisão

Tese apresentada à Universidade
Fernando Pessoa como parte dos
requisitos para a obtenção do grau
de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Resumo

As beta-lactamases são enzimas bacterianas que hidrolisam antibióticos beta-lactâmicos. Nos últimos anos muitos antibióticos beta-lactâmicos foram desenvolvidos e especificamente preparados para serem resistentes a esta acção hidrolítica das beta-lactamases; no entanto, com o passar do tempo, novas enzimas surgiram pela pressão selectiva do uso e abuso dos novos antibióticos. O aumento da prevalência de bactérias produzindo beta-lactamases criou a necessidade de métodos rápidos que identifiquem a presença destas enzimas no microrganismo isolado, condição importante para o tratamento do paciente, pois permite ao médico seleccionar o antibiótico adequado evitando medicamentos ineficazes e de alto custo. O objectivo deste estudo é a pesquisa bibliográfica dos vários métodos de detecção de beta-lactamases, em isolados clínicos de bactérias Gram negativo e Gram positivo, realizando um estudo comparativo.

Abstract

The beta-lactamases are bacterial enzymes that hydrolyze beta-lactam antibiotics. In recent years many beta-lactam antibiotics were developed and prepared specifically to be resistant to this hydrolytic action of beta-lactamases, however, over time, new enzymes arose through selective pressure of use and abuse of new antibiotics. The increasing prevalence of beta-lactamase leading the research for rapid and new method to identify the presence of these enzymes in the isolated microorganism, an important condition for the treatment of the patient. It allows the physician to select the appropriate antibiotic avoiding ineffective and expensive drugs. The aim of this study is to search various methods of detection of beta-lactamases in clinical isolates of Gram negative and Gram positive, conducting a comparative study.

Agradecimentos

Agradeço....

.... aos meus pais e irmã, que sempre me proporcionaram uma vida de estudante com acesso a tudo o que precisei. Sem vocês nunca teria conseguido.

..... à minha família.

..... aos meus amigos.

.... aos meus colegas de faculdade.

..... à Universidade Fernando Pessoa – Faculdade Ciências da Saúde por ter contribuído para a minha formação pessoal e profissional.

.... à Professora Doutora Elisabete Machado por toda a disponibilidade, paciência e compreensão em esclarecer dúvidas e em ceder toda a informação necessária para a minha pesquisa.

....às Professoras Doutoradas Cristina Pina e Maria João Coelho por toda a disponibilidade, profissionalismo, paciência e dedicação na elaboração da minha tese.

.... àqueles que sempre me apoiaram.

O meu Obrigado...

“A busca da recompensa era absolutamente necessária para que se chegasse à vitória”

Paulo Coelho

“A verdade científica é a mais estranha das amantes; se esconde nos lugares mais estranhos, se chega a ela com muito trabalho e por caminhos penosos; Mas está sempre lá! Batida e nunca te falhará; é sua e da humanidade para sempre.”

H.G. wells

Índice

I - Introdução	12
1- Perspectiva global.....	12
II - Antibióticos beta-lactâmicos	16
1 - Composição química	16
2- Mecanismo de acção.....	17
3- Origem da resistência aos antibióticos beta-lactâmicos	19
4- Mecanismos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos	20
4.1 Hidrólise enzimática dos beta-lactâmicos por beta-lactamases – Mecanismo de acção.....	20
4.2 Modificação dos alvos (PBPs)	22
4.3 Bombas de efluxo.....	22
4.4 Impermeabilização da membrana externa.....	23
III - Beta-lactamases	25
1 – Síntese e modo de transferência.....	25
2- Localização.....	25
3- Classificação	25
4- Beta-lactamases de bactérias Gram negativo	28
4.1 Beta-lactamases de largo espectro (ESBLs).....	28
4.2 Beta-lactamases AmpC	29
4.3 Carbapenemases	30
5- Beta-lactamases de bactérias Gram positivo	32
6- Inibidores de beta-lactamases	35
IV – Métodos de pesquisa de beta-lactamases em amostras clínicas	37
1-Métodos fenotípicos	37
1.1 Método acidimétrico	37
1.2 Método iodométrico	39

Métodos de pesquisa de beta-lactamases em amostras clínicas- estudo de revisão

1.3 Método cromogénico.....	40
1.4 Método de difusão por discos (métodos de Kirby-Bauer)	43
1.5 Teste do duplo disco.....	44
1.6 Teste de Etest	46
1.7 Método do ácido borónico.....	48
1.8 Teste de Hodge.....	48
1.9 Métodos automáticos.....	49
2. Métodos moleculares	52
V – Conclusão	57
VI- Bibliografia	59

Índice de Figuras

Figura 1 - Um fungo de penicilina inibe o crescimento da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> numa placa de Petri	12
Figura 2 - Esquema dos principais passos da investigação que levou à produção de penicilina.	13
Figura 3 - Sub-grupos dos antibióticos beta-lactâmicos.....	16
Figura 4 - Biossíntese do peptidoglicano	18
Figura 5 - Permeação da parede celular de bactérias Gram positivo e Gram negativo por beta-lactâmicos	19
Figura 6 - Mecanismo de inativação de antibióticos com beta-lactamases com serina no centro activo	21
Figura 7 - Mecanismo de hidrólise de um beta-lactâmico por uma metalo-beta-lactamase	21
Figura 8 - Inibidores de beta-lactamases	35
Figura 9 - Tiras de papéis comerciais - "IntraLactam" (Mast Diagnostics, Bootle,UK)	39
Figura 10 - Teste de Nitrocefina - Becton Dickinson BBL DrySlide Nitrocefina	42
Figura 11 - Antibiograma de uma estirpe bacteriana, pelo método de difusão por discos	43
Figura 12 - Detecção da produção de ESBLs no teste do duplo disco.....	45
Figura 13 - E-test - ESBLs positivo.	47
Figura 14 - Teste modificado de Hodge onde se observam estirpes positivas	49
Figura 15 - As diferentes etapas do método automático VITEK 2	51
Figura 16 - Aparelho e cartas de identificação utilizados no método VITEK 2.	52

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Evolução da classificação funcional das beta-lactamases	26
Tabela 2 - As duas classificações de beta-lactamases bacterinas em vigor nos dias de hoje	27
Tabela 3 - Métodos rápidos utilizados para a detecção de beta-lactamases	42
Tabela 4- Recomendações de CLSI para a detecção de ESBLs em <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	46
Tabela 5 - Técnicas de detecção de beta-lactamases.....	55
Tabela 6 - Vantagens e Desvantagens das técnicas de detecção de beta-lactamases	56

I - Introdução

1- Perspectiva global

A relação entre os microrganismos e determinadas doenças, é reconhecida desde há longos anos. É histórico o isolamento de leprosos das populações saudáveis e o abandono de cidades a fim de os habitantes escaparem à peste negra e a outras doenças infecciosas. A elevada mortalidade provocada por diferentes doenças infecciosas (sobretudo epidémicas), levou os cientistas a pesquisarem compostos naturais e produtos químicos dotados de propriedades antimicrobianas. Em pleno século XX, era da quimioterapia, um acontecimento acidental em 1928 veio revolucionar os esquemas no tratamento das doenças infecciosas (Tokar, 2008).

Alexander Fleming ao trabalhar com culturas de *Staphylococcus aureus* observou, que uma colónia de um fungo (mais tarde identificado como *Penicillium notatum*) tinha crescido numa das placas de Petri, como contaminante, e à sua volta não havia crescimento das colónias da bactéria em estudo. Fleming concluiu assim que o fungo era produtor de uma substância activa (a penicilina), embora não a tenha conseguido isolar (Sousa, 2006; Tokar, 2008).



Figura 1 - Um fungo de penicilina inibe o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* numa placa de Petri (adaptado de Arias, 2001).

Estava assim descoberto o primeiro antibiótico, a penicilina, substância natural produzida por um fungo do solo, que apresenta propriedades antibacterianas impedindo o seu crescimento ou provocando a sua morte celular (Sousa, 2006).

Este acontecimento veio alterar profundamente o decurso da terapêutica antibacteriana, já que se estava na presença de uma molécula dotada de poucos efeitos nocivos sobre as células humanas, levando assim a iniciar um processo de síntese comercial de antibióticos e sua administração terapêutica (Sousa, 2006).

Em 1941, Howard Florey e Ernest Chain, isolaram e purificaram a penicilina em quantidades insignificantes a partir de culturas de *Penicillium notatum*. Este acontecimento veio limitar o uso da penicilina na terapêutica.

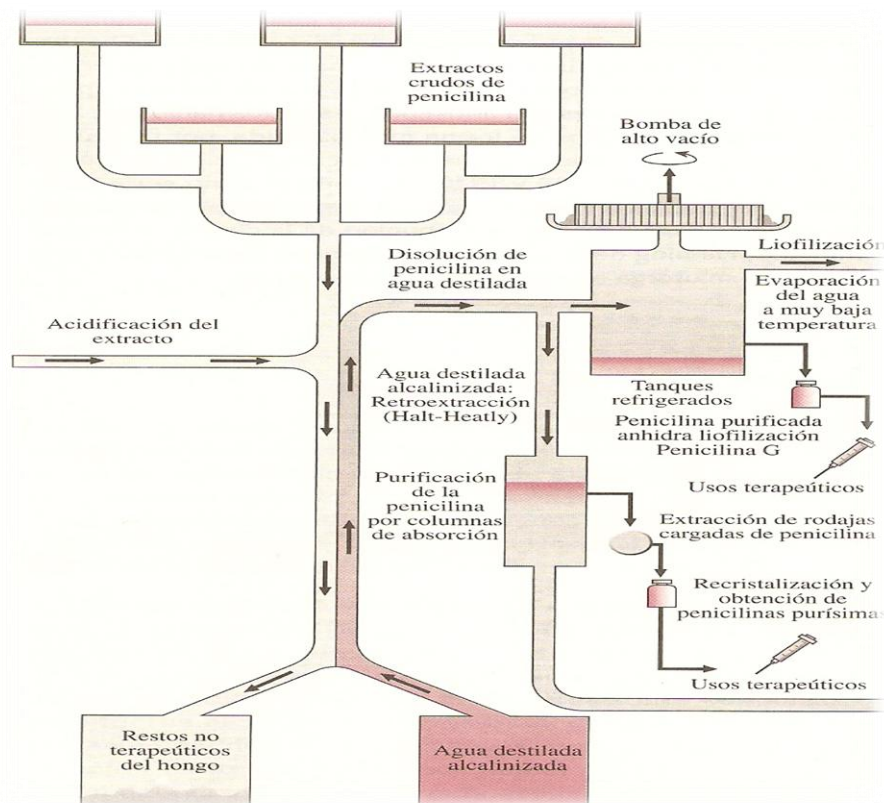


Figura 2 - Esquema dos principais passos da investigação que levou à produção de penicilina (adaptado de Arias, 2001).

A 12 de Fevereiro de 1941, em Oxford, Constable Robert Alexander é o primeiro doente a ser tratado com penicilina, tendo uma sépsis grave. Vinte e quatro horas após a administração injectável as melhoras foram evidentes e dada a inexistência de mais matéria prima recorreu-se à recuperação da penicilina eliminada pela urina, a fim de ser usada novamente. As condições precárias deste tratamento levaram a um acontecimento trágico, pois esse mesmo doente a ser tratado com penicilina acabaria por morrer a 18 de Março de 1941 (Tokar, 2008; Sousa, 2006).

Em 1944, em plena segunda Guerra Mundial, e dada a necessidade de uma grande toma de penicilina, foram criadas condições industriais nos Estados Unidos da América para uma grande produção do antibiótico. Para este facto, passaram a ser usadas mutantes de *Penicillium chrysogenum*, obtendo-se maior rendimento na produção de penicilina, que era distribuída primeiro pelos soldados e mais tarde pelo resto da população, proporcionando assim o regresso dos soldados a casa (Tokar, 2008; Sousa, 2006).

Em 1929, Fleming publicou a sua descoberta no *British Journal of Experimental Pathology* e mais tarde, em 1945, Fleming, Florey e Chain receberam o Prémio Nobel da Medicina e Fisiologia (Sousa, 2006; Tokar, 2008).

Nos últimos 60 anos, os antibióticos contribuíram para o controlo das infecções de uma forma generalizada e provaram ser uma mais-valia a nível clínico, aumentando assim a esperança média de vida no século XX. No entanto, o crescente uso e abuso dos antibióticos a nível humano, veterinário e na agricultura, tem levado cada vez mais a várias e diferentes resistências bacterianas, sendo actualmente um dos mais graves problemas para a saúde pública (Tokar, 2008; Kucers *et al*, 1997).

Num estudo sobre o uso de antibióticos em países europeus, mostra uma grande variação no consumo de antibióticos entre os vários países. O uso de antibióticos foi significativamente maior nos países do Mediterrâneo do que em outros países europeus. A Holanda foi o país com o menor uso de antibióticos e França, Espanha e Portugal (com uma dose diária de 28,8 por 1000 habitantes) os países que mais os consomem. O uso restrito e controlado e melhor cumprimento da legislação parecem ser as melhores estratégias para superar a problema da resistência antimicrobiana (Cars, Mölsted e Melander, 2001).

Um dos grupos de antibióticos mais amplamente utilizado na terapêutica das doenças infecciosas, é o dos antibióticos beta-lactâmicos, devido à sua eficácia terapêutica e à sua especificidade para a célula bacteriana. Este estatuto deve-se, essencialmente, a uma propriedade importante, à ausência de toxicidade para organismos eucariotas, pois estes antibióticos possuem como local de acção, uma estrutura que existe unicamente em bactérias, o peptidoglicano. Estes antibióticos são classificados como antibióticos

antiparietais, pois actuam na fase parietal da biossíntese do peptidoglicano (Ferreira *et al*, 1998).

No entanto estes antibióticos podem ser inactivados por hidrolases bacterianas, as beta-lactamases. Estas enzimas são um dos exemplos de resistências bacterianas adquiridas, cujos genes estão normalmente contidos nos plasmídeos, passando rapidamente essa informação genética, às gerações futuras de uma mesma espécie ou de diferentes espécies (Sousa, 2006).

O aumento da prevalência de bactérias produzindo beta-lactamases criou a necessidade de métodos rápidos que identifiquem a presença destas enzimas no microrganismo isolado, condição importante para o tratamento do paciente, pois permite ao médico seleccionar o antibiótico adequado evitando medicamentos ineficazes e de alto custo (Livermore, 1995).

Para detectar beta-lactamases utilizam-se métodos fenotípicos (método acidimétrico, iodométrico, cromogénico, de difusão por discos, teste de duplo disco, teste de Etest, método do ácido borónico, teste de Hodge, métodos automáticos (por exemplo, Vitek 2, Phoenix)) e métodos moleculares (por exemplo, PCR, sondas de DNA, PCR-RFLP) (Rodríguez *et al*, 2000; Murray *et al*, 2007; Livermore e Brown, 2001).

O objectivo deste estudo é a pesquisa bibliográfica dos vários métodos de pesquisa de beta-lactamases, em isolados clínicos de bactérias Gram negativo e Gram positivo, realizando um estudo comparativo.

II - Antibióticos beta-lactâmicos

1 - Composição química

Em 1942, Waksman criou o termo antibiótico, para denominar todos os compostos naturais produzidos por microrganismos, que inibem o crescimento microbiano ou que têm efeito microbicida. Estes compostos para serem utilizados na terapêutica, não devem ter efeitos nocivos significativos sobre o hospedeiro infectado (Sousa, 2006).

Os antibióticos beta-lactâmicos são constituídos estruturalmente pelo anel beta-lactâmico (que dá o nome ao grupo) constituído por 3 átomos de carbono e um de nitrogénio com radicais substituintes. Este anel pode apresentar-se isolado, ou conjugado com outro anel, resultando em estruturas bicíclicas. Pode-se assim dividir os beta-lactâmicos em quatro sub-grupos: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos (Sousa, 2006; Mascaretti, 2003).

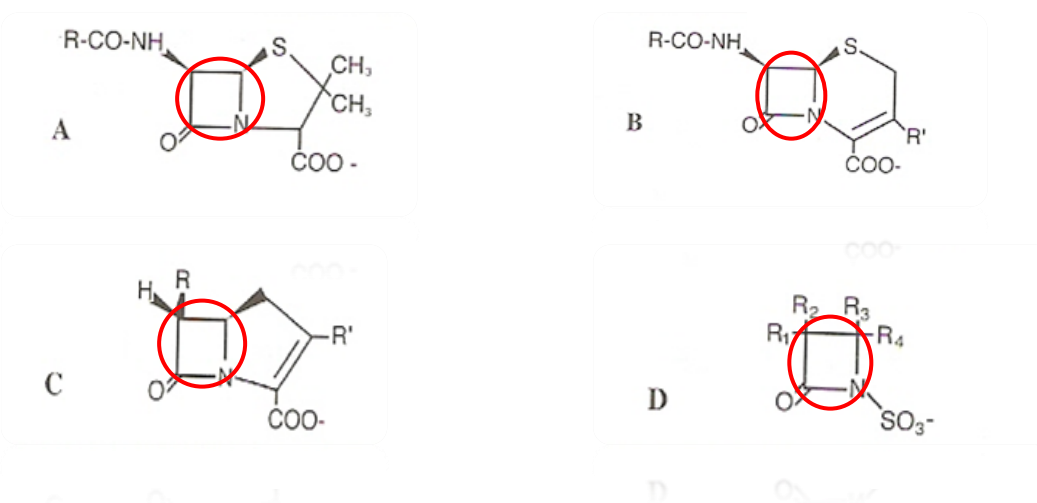


Figura 3 - Sub-grupos dos antibióticos beta-lactâmicos. A estrutura base destas moléculas é constituída por um anel beta-lactâmico (assinalado na imagem). A- Penicilinas; B- Cefalosporina; C- Carbapenemo ; D- Monobactâmico (adaptado de Ferreira *et al*, 1998).

Nas penicilinas o anel beta-lactâmico encontra-se unido a um anel de tiazolidina, enquanto nas cefalosporinas aquele anel existe associado a um anel de di-hidrotiazina.

A classe dos carbapenemos é diferente dos outros beta-lactâmicos porque em vez de possuir um átomo de enxofre (S) no anel tiazolidina, possui um carbono (C) e uma dupla ligação (Ferreira *et al*, 1998; Mascaretti, 2003).

De uma forma geral, é a constituição dos radicais referenciados como R e R' que dita as propriedades das diferentes classes de antibióticos beta-lactâmicos que existem disponíveis para a prática clínica (Donowitz e Mandell, 1988).

2- Mecanismo de ação

Estes antibióticos são classificados como antibióticos antiparietais e inibem a biossíntese do peptidoglicano na sua fase terminal, impedindo a transpeptidação, isto é, inibem o estabelecimento de pontes interpeptídicas (cross-linking) entre cadeias peptídicas vizinhas do peptidoglicano recém-sintetizado. O peptidoglicano faz parte da parede celular bacteriana, conferindo rigidez à célula e proteção a alterações osmóticas. A sua destruição torna as bactérias mais susceptíveis a lise quando presentes em ambientes hipotônicos (Ferreira *et al*, 1998).

A biossíntese do peptidoglicano passa por três fases: fase citoplasmática, fase membranar e fase parietal. Em que na fase citoplasmática, ocorre a síntese de UDP-NAG (uridinodifosfato N-acetilglucosamina) e UDP-NAMA-pentapeptídeos (uridinofosfato-ácido N-acetilmurâmico), pois são as unidades básicas formadoras do peptidoglicano. Na fase membranar, ocorre o transporte de UDP-NAG e UDP-NAMA-pentapeptídeos através da membrana citoplasmática, com ajuda do lípido membranar – bactoprenol (-álcool isoprenóide C₅₅ fosforilado), formando o par NAG-NAMA-pentapeptídeo. Na fase parietal, inicia-se a incorporação do precursor NAG-NAMA-pentapeptídeo no peptidoglicano pré-formado, estabelecendo-se assim inicialmente ligações glicosídicas β (1-4) com o peptidoglicano já existente e em seguida ligações peptídicas entre o último resíduo de glicina e o 4º aminoácido da cadeia peptídica vizinha. Isto pressupõe a intervenção das enzimas D-D-carboxipeptidases-transpeptidases, localizadas no folheto externo da membrana citoplasmática. Estas enzimas envolvidas são denominadas PBP_s (Penicillin-Binding-Proteins) devido à sua grande afinidade para as penicilinas. Existem também as autolisinas, que requerem a

quebra de ligações covalentes no peptidoglicano já existente, para se formar um novo peptidoglicano (Sousa, 2006).

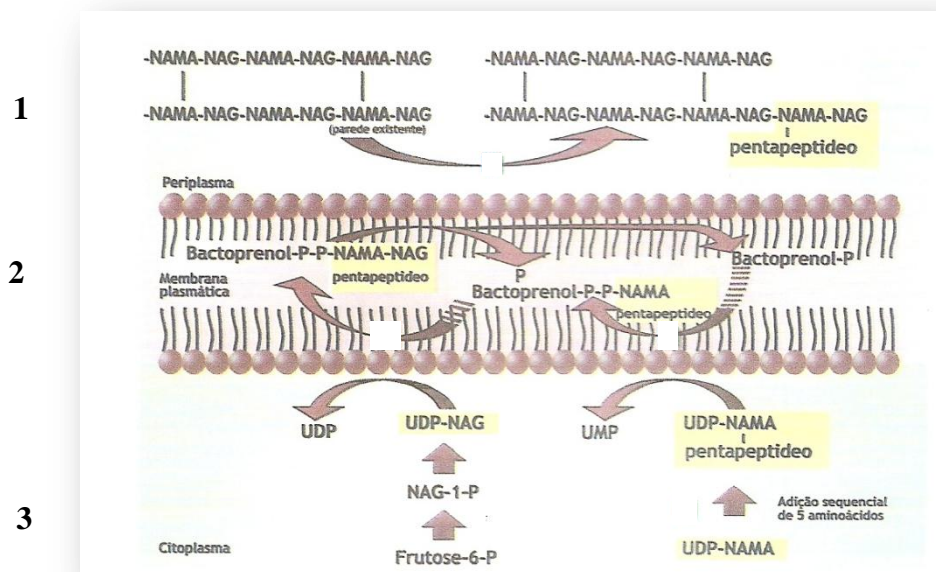


Figura 4 - Biossíntese do peptidoglicano. 1- Fase parietal; 2- Fase membranária; 3- Fase citoplasmática (adaptado de Sousa, 2006).

A entrada destes antibióticos na célula bacteriana está directamente relacionada com a estrutura e composição da parede, a qual vai ser diferente nas bactérias Gram positivo e Gram negativo.

Nas bactérias de Gram positivo o peptidoglicano é o principal constituinte da parede celular. A membrana citoplasmática, neste caso encontra-se justaposta à parede e é nesta estrutura que estão inseridos os alvos dos antibióticos beta-lactâmicos – PBP_s no folheto externo.

Nas bactérias de Gram negativo, a parede celular apresenta-se mais estratificada, sendo constituída por camadas de lipopolissacarídeos e fosfolípidos, onde se inserem poros constituídos por porinas (proteínas) sob as quais se encontra a camada de peptidoglicano. E entre esta camada e a membrana citoplasmática existe o espaço periplásmico. Neste tipo de bactérias é no folheto externo da membrana citoplasmática que se localizam os PBP (Sousa, 2006; Normark e Normark, 2002).

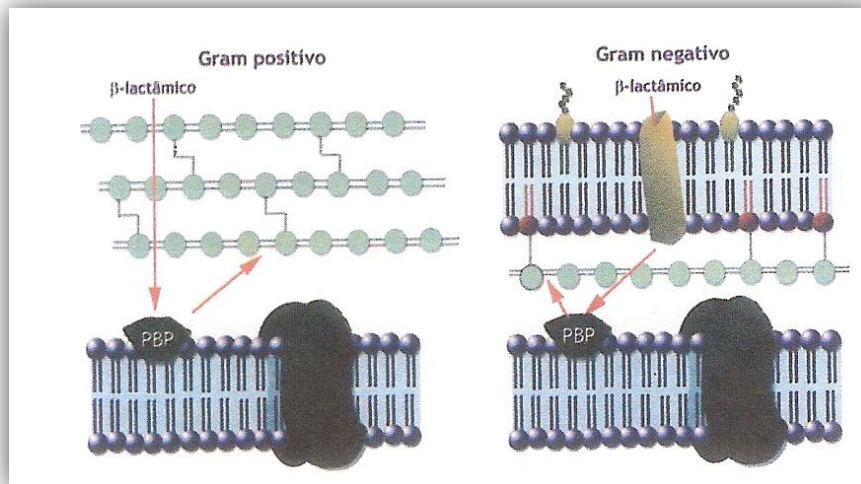


Figura 5 - Permeação da parede celular de bactérias Gram positivo e Gram negativo por beta-lactâmicos (adaptado de Sousa, 2006).

3- Origem da resistência aos antibióticos beta-lactâmicos

A resistência bacteriana aos antibióticos pode ser do tipo natural/intrínseco, adquirido ou apresentar susceptibilidade aos antibióticos.

A resistência intrínseca é a resistência natural exibida por todos os exemplares de determinada espécie. Esta característica pode ser observada, por exemplo, nos organismos do género *Enterobacter* que são naturalmente resistentes à cefoxitina, fenótipo que surge devido à produção de uma beta-lactamase AmpC cromossômica. De um modo geral as espécies bacterianas Gram negativo são intrinsecamente resistentes aos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina. Tal facto deve-se ao elevado peso molecular destas moléculas, o que impede a sua difusão através dos canais de porina presentes na membrana exterior (Sousa, 2006).

A resistência adquirida aos antibióticos pode resultar da aquisição de genes de resistência veiculados por elementos genéticos móveis, da mutação de genes reguladores ou estruturais ou da combinação de ambos os mecanismos. A aquisição de genes de resistência faz-se através de elementos móveis, tais como plasmídeos, transposões ou integrões. Os genes que codificam beta-lactamases surgem como exemplo de genes que são disseminados por plasmídeos, os quais podem ser facilmente adquiridos por diversas bactérias patogénicas (transferência horizontal) (Sousa, 2006).

A susceptibilidade aos antibióticos resulta da ausência total de mecanismos de resistência que possibilitem a sobrevivência das bactérias na presença de determinados compostos (Tokar, 2008).

4- Mecanismos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos

A resistência aos antibióticos beta-lactâmicos tem vindo aumentar devido às más práticas a eles associados e parecem superar o ritmo a que novos antibióticos têm sido descobertos e sintetizados. É preocupante a adaptação das bactérias patogénicas a essas resistências.

As bactérias escapam ao efeito bacteriolítico dos antibióticos beta-lactâmicos por quatro mecanismos diferentes: modificação dos alvos (PBPs), bombas de efluxo, impermeabilização da membrana externa e por fim hidrólise enzimática dos beta-lactâmicos por beta-lactamases, sendo este o principal mecanismo de resistência (Nikaido, 2009).

4.1 Hidrólise enzimática dos beta-lactâmicos por beta-lactamases – Mecanismo de acção

O principal mecanismo de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos consiste na degradação de antibióticos por enzimas, beta-lactamases, que promovem a clivagem do anel beta-lactâmico (ligação CO-N) no espaço periplásmico.

As beta-lactamases podem actuar por dois mecanismos: utilização de iões de zinco capazes de desencadear a ruptura do anel beta-lactâmico no caso das metalo-beta-lactamases e utilização da via éster-serina, no caso das restantes classes de beta-lactamases (Livermore, 1995).

As serino-beta-lactamases (têm serina no centro activo) associam-se ao antibiótico de uma forma não-covalente e quebram a ligação amida do anel beta-lactâmico, por parte do grupo hidróxilo da cadeia lateral de um resíduo serina do sítio activo da enzima, originando um acil-éster covalente. A hidrólise deste éster vai por fim libertar a enzima, que se encontra activa e disponível para hidrolisar outras moléculas de antibiótico, enquanto o antibiótico se encontra hidrolisado e inactivo (Livermore, 1995).

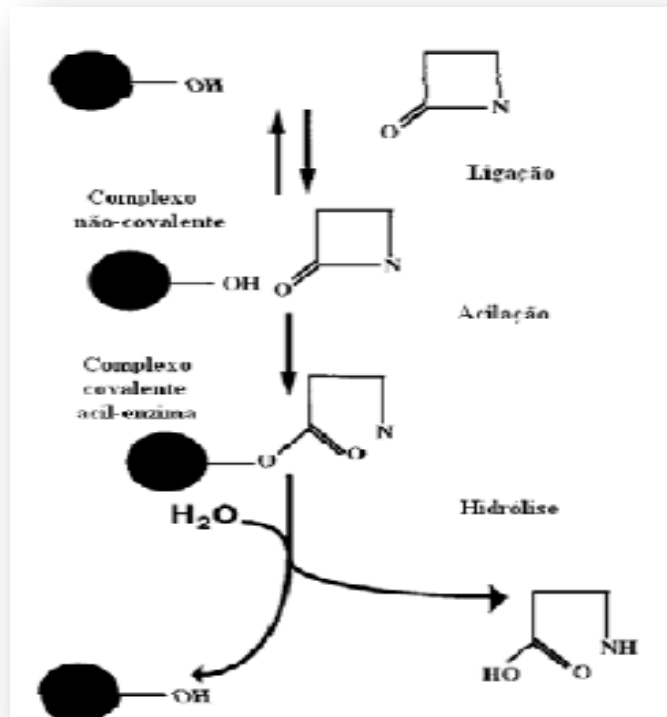


Figura 6 - Mecanismo de inactivação de antibióticos com beta-lactamases com serina no centro activo (adaptado de Livermore, 1995).

As metalo-beta-lactamases têm íões zinco no centro activo e têm um largo espectro degradando os carbapenemos, sendo conhecidas por carbapenemases. Diferem das serino-beta-lactamases porque não há a formação do intermediário peniciloenzima, fazendo o ataque directo ao anel beta-lactâmico.

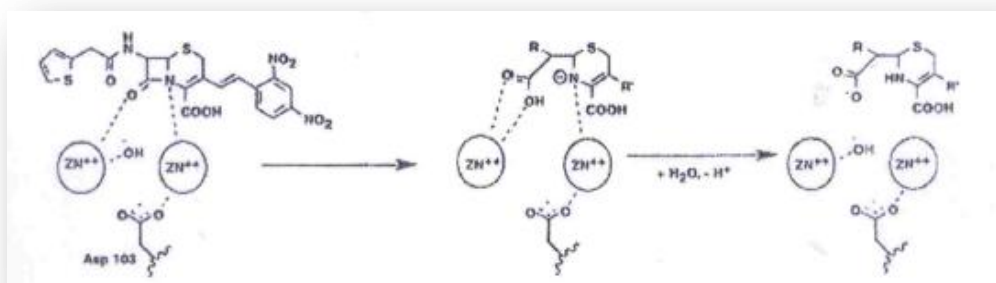


Figura 7 - Mecanismo de hidrólise de um beta-lactâmico por uma metalo-beta-lactamase (adaptado Sousa, 2006).

As beta-lactamases dependendo da sua especificidade são muitas vezes chamadas penicilinases, cefalosporinas e carbapenemases. As beta-lactamases são os principais determinantes da resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos (Sousa, 2006) e os vários métodos usados para a sua detecção serão o tema central deste estudo.

4.2 Modificação dos alvos (PBPs)

Este tipo de mecanismo de resistência surge através de substituições aminoacídicas na proteína que constitui o alvo do antibiótico, as PBPs. Na maioria das situações, a proteína torna-se menos susceptível à ligação com o agente antimicrobiano. Apesar este facto ter sido observado em bactérias de Gram negativo, este mecanismo de resistência é encontrado essencialmente em bactérias de Gram positivo, nomeadamente nas estirpes MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina). Esta resistência aparece por mutação do gene *mecA*, que se encontra no cromossoma e codifica a síntese de PBP₂. A incidência deste tipo de estirpes em Portugal é cerca de 50% (Sousa, 2006).

A modificação destas proteínas (transpeptidases) pode ser conseguida por um dos quatro mecanismos: substituição aminoacídica, que promove a diminuição da afinidade entre antibiótico e PBP; aquisição de novas PBPs; existência de proteínas resultantes da recombinação entre genes que codificam PBPs associadas à expressão de susceptibilidade e PBPs que conduzem à resistência ao antibiótico e por fim a hiperprodução da proteína com consequente aumento do nível de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos (Georgopapadakou e Liu, 1980; Georgopapadakou, 1993).

4.3 Bombas de efluxo

Este tipo de mecanismo pode não ser suficiente para expressar resistência clínica, porém, em conjunto com outros mecanismos pode originar falências terapêuticas. A resistência é frequentemente causada pelo aumento da síntese das proteínas, que constituem a bomba, devido por exemplo, a mutações que ocorrem nos repressores transcricionais destas proteínas. As mutações que podem ocorrer nestes genes podem levar a um aumento da eficiência do transporte dos antibióticos para o exterior da célula.

Estudo feitos em *Escherichia coli*, em 1974, demonstraram que nas estirpes Tetra^R havia na membrana citoplasmática uma proteína específica Tet, que bombeava o antibiótico para o exterior, funcionando como uma bomba de efluxo. Em *Pseudomonas aeruginosa*, o sistema MexA-MexB-OprD, pode estar associado à resistência ao meropenem. As bombas de efluxo podem ter afinidade para diversos antibióticos, pelo que são frequentemente associadas a multirresistência (Harbottle *et al*, 2006).

As bombas de efluxo têm sido agrupadas em cinco famílias, de acordo com a sua sequência em aminoácidos, a família ABC (ATB-Binding Cassete), família MFS (Major Facilitator Superfamily), família RND (Resistance-Nodulation-Division), família SMR (Small Multidrug Resistance) e a família MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion). Os sistemas de transporte tipo MFS predominam nas bactérias Gram positivo e os sistemas RND e MATE nas bactérias Gram negativo (Poole, 2004; Sousa, 2006).

4.4 Impermeabilização da membrana externa

A resistência aos antibióticos está também relacionada com a diminuição da permeabilidade que ocorre na membrana exterior das bactérias de Gram negativo. O fluxo de moléculas para o interior da célula é assegurado através de complexos de proteínas da membrana, denominadas OMPs (*Outer Membrane Proteins*), os quais formam canais de porina. A carga, estrutura e dimensão influenciam a passagem de moléculas para o interior da célula. Algumas das moléculas que utilizam este percurso são os antibióticos para atingirem o interior da célula bacteriana ou no caso dos antibióticos beta-lactâmicos, o espaço periplásmico.

As porinas clássicas são trímeros estáveis que produzem grande permeabilidade a moléculas neutras, hidrofílicas e de baixo Peso Molecular (até 600Da). Além destas, ainda existem as porinas monoméricas que permitem uma difusão lenta e não específica (ex: OmpA de *E. coli* e OprF de *P. aeruginosa*).

Por exemplo, em *Escherichia coli* as proteínas OmpF, OmpC e OmpE são vulgarmente associadas a resistência aos antibióticos. A perda destas, por mutação dos genes, pode verdadeiramente causar a diminuição da susceptibilidade a vários antibióticos. A *Pseudomonas aeruginosa* não possui porinas clássicas na membrana externa, como tal,

os canais de porina específicos (ex: OprD-canal de aminoácidos básicos) têm um papel importante na entrada de nutrientes. Os antibióticos carbapenemos também atravessam a membrana externa através dos canais OprD, por isso a modificação da expressão das OprD2 ou a ausência que ocorre em algumas estirpes de *P.aeruginosa* justificam a sua resistência aos carbapenemos (Sousa, 2006; Livermore, 2003).

III - Beta-lactamases

1 – Síntese e modo de transferência

A síntese das beta-lactamases poderá ser cromossômica (constitutiva), como em *Pseudomonas aeruginosa*, ou mediada por plasmídeos (induzível), como em *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* (Samaha-Kfoury e Araj, 2003). Os plasmídeos são a principal via de resistência bacteriana, uma vez que podem ser transferidos entre bactérias Gram negativo por conjugação e entre bactérias Gram positivo por vírus bacterianos chamados de transdução de fagos. Esta transferência é responsável por muitos surtos de resistência, especialmente quando as medidas de controlo de infecção são violados em ambientes hospitalares (Samaha-Kfoury e Araj, 2003).

2- Localização

As beta-lactamases de bactérias Gram positivo são segregadas para o meio ambiente, como as exoenzimas. Nas bactérias Gram negativo, estas enzimas ficam retidas no espaço periplásmico, onde atacam os antibióticos antes de poderem alcançar o local dos receptores (Stratton, 2000).

3- Classificação

A detecção da primeira beta-lactamase foi identificada num isolado de *E. coli* em 1940, antes do uso generalizado da penicilina na prática clínica (Abraham e Chain, 1940).

Ao longo dos anos, a produção de beta-lactamases constitui o mecanismo mais comum de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos e o mais representativo em bactérias de Gram negativo, tendo apresentado um impacto considerável na actividade daqueles antibióticos (Livermore, 1995).

Têm sido propostas várias classificações para as beta-lactamases, tendo cada uma delas surgido devido a necessidade de corrigir falhas deixadas pelas classificações anteriores e com o intuito de caracterizar e integrar novas beta-lactamases. Estas classificações dividem as enzimas de acordo com a sua estrutura molecular, perfil do seu substrato e sensibilidade aos inibidores das beta-lactamases (Sousa, 2006).

Tabela 1 - Evolução da classificação funcional das beta-lactamases (adaptado de Samaha-Kfoury e Araj, 2003; Mascaretti, 2003).

Ano	Autor	Base de Classificação das beta-lactamases
1968	Sawai <i>et al</i>	Cefalosporinas vs penicilinas como substratos.
1973	Richmond e Sykes	Perfil de substrato alargado e sugestão de cinco grupos (Ia-d, II, III, IV e V).
1976	Richmond e Matthew	Distinção das enzimas plasmídicas através de pI .
1980	Ambler	Separação das enzimas em quatro classes moleculares (A-D)
1981	Mitsuhashi e Inoue	Adição da categoria “B-lactamase que hidrolisa cefuroxima”.
1989	Bush	Expansão do perfil de substratos, inserção da reacção com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) , correlação entre classificação molecular e funcional.
1995	Bush, Jacoby e Medeiros	Expansão do esquema de Bush e uso de propriedades bioquímicas, estrutura molecular e sequência nucleotídica. Sugestão de classificação em quatro grupos (1-4) e subgrupos(a-f) com base no espectro de actividade.

As duas classificações em vigor nos dias de hoje, baseiam-se nas quatro classes moleculares (A-D) definidas por Ambler e os grupos funcionais estabelecidos por Bush, Jacoby e Medeiros.

A classificação molecular baseia-se na sequência de nucleotídeos e dos aminoácidos destas enzimas. As enzimas de classe A, C e D são as mais comuns e possuem um resíduo serina no centro activo para hidrolisar os beta-lactâmicos. Nas metalo-beta-lactamases, classe B, é requerido um ião Zinco (Zn^{2+}), ou outro metal pesado, no seu centro activo para a actividade de catálise.

A classificação funcional baseia-se nas propriedades bioquímicas, na estrutura molecular e na sequência de nucleotídeos. Esta classificação é composta por quatro grupos (1-4) e por subgrupos (a-f) (Ambler, 1980; Livermore, 1995; Bush e Jacoby, 2010).

Tabela 2 - As duas classificações de beta-lactamases bacterinas em vigor nos dias de hoje (adaptado de Bush, Jacoby e Medeiros, 1995 e Iwahara, 2006).

Grupo Bush- Jacoby- Medeiros	Classe Molecular (Ambler)	Perfil de hidrólise	Perfil de inibição		Enzimas representativas
			Ácido clavulâmico	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	-	-	AmpC, MIR-1
2 a	A	Penicilinas	+	-	Penicilinas de Gram positivos – <i>Staphylococcus aureus</i>
2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilinas, cefalosporinas, Monobactâmicos	+	-	TEM-3 a TEM-26, SHV- 2 a SHV-6, K1 de <i>Klebsiella oxytoca</i>
2br	A	Penicilinas	±	-	TEM-30 a TEM-36, TRC1
2c	A	Penicilinas, Carbencilinas	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penicilinas, Cloxacilina	±	-	OXA-1 a OXA-11, PSE-2
2e	A	Cefalosporinas	+	-	Cefalosporinas de <i>Proteus vulgaris</i> CfxA e CfxA2 – <i>Prevotella spp.</i>
2f	A	Penicilinas, Cefalosporinas, carbapenemes	+	-	NMC-Ade <i>Enterobacter cloacae</i> , SME-1 de <i>Serratia marcescens</i>
3	B	Maioria beta- lactâmicos, inclui do Carbapenemos	-	+	L1 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , CcrA de <i>Bacteroides fragilis</i>
4	ND	Penicilinas	-	?	Penicilinase de <i>Burkholderia cepacia</i>

4- Beta-lactamases de bactérias Gram negativo

4.1 Beta-lactamases de largo espectro (ESBLs)

Um grupo importante de enzimas são as beta-lactamases de largo espectro (ESBLs), têm a capacidade de hidrolisar e causar resistência às penicilinas, às oximinocefalosporinas (cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, cefpiroma) e aos monobactâmicos (aztreonam). Não são activas contra as cefamicinas (cefotetan e cefoxitina), os inibidores das beta-lactamases e os carbapenemos (Livermore, 2008).

A primeira beta-lactamase de largo espectro (ESBLs) foi identificada na Europa em 1980 e a sua incidência tem vindo a aumentar, sendo inicialmente frequentes em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* e ultimamente também em outras Enterobactérias, em *Pseudomonas aeruginosa* e em *Acinetobacter baumannii*. (Sousa, 2006).

Estas beta-lactamases são mediadas por genes plasmídeos e são derivadas das enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 que sofreram mutações pontuais no seu centro activo (contêm serina) e pertencem à classe molecular A de Ambler. Entre elas encontram-se as do tipo TEM e SHV (derivadas de enzimas com menor espectro de hidrólise), a família CTX-M (derivadas de beta-lactamases cromossómicas do género *Kluyvera*), e outras menos prevalentes como PER, VEB, BES, GES, TLA e SFO, incluídas todas elas no grupo funcional 2be de Bush e Jacoby (Bradford, 2001; Bush e Jacoby, 2010).

As beta-lactamases CMT (complexo mutante TEM) e as TEM-50, também pertencem à classe A, mas ao subgrupo 2ber, e conferem uma certa resistência à inibição pelo ácido clavulânico e com uma maior actividade frente às oximino-cefalosporinas (Cantón *et al*, 2008). Algumas enzimas da família OXA (classe D de Ambler e grupo funcional 2de), também se consideram beta-lactamases de largo espectro e são descritas com maior frequência em *P. aeruginosa*.

A incidência de ESBLs varia de acordo com o local geográfico e o tempo (Bradford, 2001).

Desde a sua descrição inicial, que se tem identificado mais de 300 ESBLs diferentes e a maioria pertence às famílias TEM, SHV e CTX-M (<http://www.lahey.org/webt.asp>).

4.2 Beta-lactamases AmpC

As beta-lactamases da classe molecular C de Ambler (grupo 1 da classificação de Bush-Jacoby-Medeiros) hidrolisam as cefalosporinas de primeira e segunda geração, incluindo as cefamicinas, e são muito pouco eficazes a hidrolisar as cefalosporinas de terceira e quarta geração e os carbapenemos (Navarro, Miró e Mirelis, 2010; Jacoby, 2009). A cloxacilina e o aztreonam, bem como o ácido borónico e seus derivados (ácido fenil-borónico), inibem as beta-lactamases AmpC, enquanto o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam não são bons inibidores.

A produção de AmpC pode ser constitutiva ou induzível, sendo os níveis de produção dependentes do grau de expressão do gene *bla_{AmpC}* (Jacoby, 2009). Quando o gene *bla_{AmpC}* se expressa de forma constitutiva (ausência de genes reguladores do tipo *ampD* e *ampR*) pode fazer para níveis mais baixos, conferindo um fenótipo de resistência, ou para níveis muito superiores (sobreexpressão de *bla_{AmpC}* mediada por mutações no atenuador e/ou promotor de *bla_{AmpC}*, aquisição de promotores fortes para a expressão de *bla_{AmpC}*) produzindo quantidades elevadas de AmpC (hiperprodução de AmpC).

Em determinadas espécies bacterianas como a *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros, o gene *bla_{AmpC}* se expressa de forma induzível. Nos isolados que tem um gene *bla_{AmpC}* induzível, sua expressão pode estar desreprimida estabelecendo de forma parcial ou total (mutações em genes reguladores do tipo *ampD* e *ampR*), dando lugar à produção estável de grandes quantidades de AmpC (hiperprodução parcial ou total de AmpC (Navarro, Miró e Mirelis, 2010; Bush e Jacoby, 2010; Jacoby, 2009).

Independentemente do mecanismo que leva à hiperprodução de AmpC, os isolados hiperprodutores de AmpC apresentam um fenótipo de resistência (fenótipo AmpC) às penicilinas, às associações de beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamases, cefalosporinas de primeira e segunda geração, incluindo as cefamicinas, bem como as de terceira geração, mas em graus variados, dependendo do nível de hiperprodução. Os

isolados com este fenótipo AmpC são muitas vezes sensíveis às cefalosporinas de quarta geração e aos carbapenemos, embora esta sensibilidade se reduza significativamente se se produzir a perda de alguns porinas associadas à resistência antimicrobiana (Navarro, Miró e Mirelis, 2010; Jacoby, 2009).

Um grupo de beta-lactamases AmpC está codificado por genes bla_{AmpC} associados com integrões, como os da classe 1, ou transposões localizados em plasmídeos conjuntivos (AmpC plasmídicas). Estes genes bla_{AmpC} plasmídicos vêm do cromosoma bacteriano e são classificados em 6 famílias que se diferenciam pela homologia dos seus genes: CIT (derivadas de AmpC cromossômica de *Citrobacter freundii*), DHA (derivadas de AmpC cromossômica de *M. morgani*), ACC (cuja origem está relacionada com AmpC cromossômica de *Hafnia alvei*), FOX (derivadas provavelmente de AmpC cromossômica de *Aeromonas media*), MOX (presumivelmente derivadas de AmpC cromossômica de *Aeromonas caviae*), EBC (derivadas das AmpC cromossômicas de *E. cloacae* e/ou *Enterobacter asburiae*) (Navarro, Miró e Mirelis, 2010; Bush e Jacoby, 2010; Jacoby, 2009).

As beta-lactamases do tipo AmpC plasmídicas podem causar falhas no tratamento, semelhantes às descritas em infecções causadas por isolados hiperprodutores de AmpC cromossômica induzível (selecção de mutantes com desrepressão estável) em tratamentos com beta-lactâmicos (Navarro *et al*, 2011).

4.3 Carbapenemases

Nos últimos anos tem havido um grande alarme e preocupação pela grande dispersão dos bacilos Gram negativo resistentes aos carbapenemos por produção de beta-lactamases capazes de hidrolisar este grupo de antimicrobianos e que se tem associado a elementos genéticos transferíveis (Miriagou *et al*, 2010; Walsh, 2010). As carbapenemases são constituídas por uma combinação heterogénea de beta-lactamases de classe A (penicilinas), classe B (metaloenzimas) e classe D (oxacilinas). Estas enzimas partilham a capacidade de hidrolisar uma classe específica de antibióticos beta-lactâmicos, os carbapenemos. Adicionalmente, podem hidrolisar penicilinas, cefalosporinas ou monobactâmicos (Queenan e Bush, 2007).

O grupo mais importante das carbapenemases são as metalo-beta-lactamases pertencentes à classe B ou grupo 3 de Bush e Jacoby, sendo as enzimas principais as IMP e VIM. As IMP (activa frente ao Imipenemo) mediadas por plasmídeos surgiram na Ásia, especialmente em bactérias de Gram negativo como *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. As VIM (*Verona Integron-encoded beta-lactamase*), por sua vez, foram descritas pela primeira vez na década de 90 e, presentemente, encontram-se disseminadas na Europa, América do Sul e, em particular, na Ásia (Nordmann e Poirel, 2002). Este tipo de enzimas, IMP e VIM, são de largo espectro, abrangendo todos os beta-lactâmicos, excepto aztreonamo. Não são inibidas pelos inibidores das beta-lactamases, mas sim por EDTA, quelante de iões metálicos.

A família GES/IBC (*Guiana Extended Spectrum e Integron-Borne beta-lactamase*) foi descrita pela primeira vez após 2000, em França e na Grécia, respectivamente. Estas enzimas diferem, entre si, apenas em dois aminoácidos e possuem aminoácidos típicos de carbapenemases de Classe A: resíduos de cisteína nas posições 69 e 238 (os quais tem sido encontrados igualmente nas famílias KPC, SME e NMC/IMI). Os genes que codificam GES são, frequentemente, encontrados em integrões e plasmídeos. Uma vez que estas enzimas possuem um espectro de actividade que inclui penicilinas e cefalosporinas de terceira geração foram inicialmente classificadas como ESBL. Contudo, veio a verificar-se que GES-2, com a substituição de um aspartato por uma glicina na posição 170, hidrolisava imipenemo, pelo que a família foi reclassificada (Jacoby e Munoz-Price, 2005; Lee e Jeong, 2005).

O grupo das OXA (classe D de Ambler e 2df de Bush e Jacoby) também se encontra variantes que hidrolisam os carbapenemos. Entre elas destacam-se as variantes dos subgrupos OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143 e, menos relevantes, a OXA-51 descritas em *Acinetobacter* spp. e a OXA-48 descrita nas Enterobacterias em países de ambiente mediterrânico (Queenan e Bush, 2007).

Considerando que os carbapenemos são praticamente os únicos antibióticos possíveis de utilizar no controlo de algumas infecções causadas por bactérias de Gram negativo, nomeadamente *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, o aparecimento de tais enzimas e, de facto, preocupante (Livermore e Woodford, 2006). Embora apresentem um perfil de hidrólise variável entre os diferentes grupos, pode afirmar-se que as

carbapenemases apresentam a capacidade teórica de hidrolisar todos os antibióticos beta-lactâmicos disponíveis na prática clínica.

5- Beta-lactamases de bactérias Gram positivo

No que diz respeito às beta-lactamases de bactérias Gram positivo, e como já foi referido anteriormente, este tipo de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, não é tão frequente como em bactérias de Gram negativo. Na maioria das bactérias Gram positivo existem outros mecanismos de resistência mais frequentes, do que a produção deste tipo de enzimas. No caso de *Staphylococcus aureus*, podemos referir a resistência à meticilina/cloxacilina (MRSA), existindo estirpes que causam infecções desde 1960 (Sousa, 2006).

A resistência à meticilina aparece por mutação do gene *mecA*, que se encontra no cromossoma e que codifica uma alteração da proteína de ligação à penicilina (PBP 2 a), com menor afinidade para os beta-lactâmicos. Como consequência, a cloxacilina não pode unir-se à membrana citoplasmática e inibir a sua síntese. O resultado final é uma estirpe de *S. aureus* resistente a todos os beta-lactâmicos (Leclercq, 2009).

Os glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) foram durante décadas os antimicrobianos utilizados no tratamento de MRSA. Mas como era de esperar, com tempo começaram aparecer estirpes com sensibilidade diminuída a estes antibióticos. Em 1997 se descreve no Japão a primeira estirpe resistente à vancomicina (VRSA) (Hiramatsu *et al*, 1997). Posteriormente também se detectou em outros países asiáticos, na Europa e nos Estados Unidos, com um padrão de resistência que também afecta a teicoplanina. Este tipo de mecanismo de resistência consiste na alteração da parede celular, em que aumenta a incorporação de componentes no peptidoglicano da parede celular e leva à diminuição do cross-linking e do processo de autólise (Hiramatsu *et al*, 1997).

O reservatório deste microrganismo é humano e constituído, ou por doentes infectados ou por portadores assintomáticos, quase sempre portadores nasais, assumindo particular importância o pessoal médico e paramédico.

A transmissão ocorre, na maioria dos casos, por contacto directo e as mãos são o veículo habitualmente implicado. A correcta e escrupulosa lavagem das mãos, sempre antes e após contacto com cada doente, é por isso a medida de prevenção mais eficaz, mas também a que mais vezes não é praticada (Ferreira *et al*, 1998).

Recentemente, tem-se comercializado um novo antibiótico, linezolid, pertencente a uma nova classe de antibióticos, as oxazolidinonas. Apesar de ser recente e do seu uso ser limitado já são descritas estirpes resistentes a ele, devido a mutações genéticas que codificam a subunidade 23s dos ARNr (Tsiodras *et al*, 2001).

A Quinupristina/dalfopristina é outro exemplo de antibiótico recente chegado ao mercado, como alternativa terapêutica para o tratamento de MRSA. Tal como ocorrido com linezolid, se tem descrito estirpes resistentes a este fármaco, praticamente desde o início da sua utilização (Dowzicky *et al*, 2000).

Quanto aos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* que produzem beta-lactamases, normalmente produzem quatro tipos (A, B, C, D) (Richmond, 1965; Rosdahl, 1973). Embora distinguíveis cineticamente, elas diferem da estrutura primária por apenas uns poucos de aminoácidos. Esta nomenclatura não deve ser confundida com as diferentes classes de beta-lactamases, A a D de Ambler, que tem sido usada mais recentemente para o grupo beta-lactamases de todas as espécies bacterianas.

Os genes estruturais e reguladores (*blaZ*, *blaI* e *blaR1*) que codificam os diferentes tipos de beta-lactamases de *S. aureus* estão localizados em plasmídeos (East e Dyke, 1989).

Segundo a classificação de Bush, Jacoby e Medeiros, as beta-lactamases estafilocócicas pertencem ao grupo 2a (classe A de Ambler), porque hidrolisam as penicilinas mais rápido do que as cefalosporinas. As beta-lactamases agem como serina peptidase (Voladri e Kernodle, 1998).

Quanto aos *Enterococcus*, esta bactéria pode adquirir múltiplas resistências, aos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, bem como aos glicopeptídeos, nomeadamente à vancomicina e teicoplanina.

Nos últimos anos, o género *Enterococcus* apresenta especial relevância clínica, devido à frequência com que os isolados apresentam resistência adquirida aos antimicrobianos.

A presença de determinadas resistências é mais frequente em *E. faecium* do que em *E. faecalis*. A aquisição de genes de resistência por parte dos *Enterococcus* é favorecida pela sua elevada capacidade de troca de material genéticos com outros microrganismos. A mobilização destes genes de resistência se realiza frequentemente através de plasmídeos, de transposões ou por troca cromossômica (Murray, 1990).

Os *Enterococcus* possuem resistência intrínseca aos beta-lactâmicos devido à baixa afinidade dos seus PBP para este tipo de antibióticos. As penicilinas são os beta-lactâmicos com maior actividade intrínseca frente a estes microrganismos. As cefalosporinas são ineficazes no tratamento das infecções por *Enterococcus*; na verdade, o tratamento com cefalosporinas pode levar a sobre infecções enterocócicas. Nos últimos anos tem havido um aumento das resistências de *E. faecium* (raramente em *E. faecalis*) a ampicilina, em relação as alterações das PBP. Nos Estados Unidos há referências bibliográfica de estirpes de *E. faecalis* (raramente de *E. faecium*) produtoras de beta-lactamases (Shepard e Gilmore, 2002).

O género *Enterococcus* apresenta resistência intrínseca de baixo nível aos aminoglicosídeos por um transporte deficiente destes ao interior da bactéria. Contudo, a associação de um aminoglicosídeo com um antibiótico que actue sobre a parede celular (penicilinas ou glicopeptídeos) provoca um efeito sinérgico de utilidade a tratar infecções graves como as endocardites. Os *Enterococcus* podem apresentar resistência de alto nível aos aminoglicosídeos (concentração mínima inibitória > 2000 µg/ml), devido geralmente à produção de enzimas modificadoras, o que leva à perda do seu efeito sinérgico (Shepard e Gilmore, 2002).

Nos finais da década de 1980, apareceu a primeira descrição de resistência à vancomicina de *Enterococcus*, e desde então tem-se observado um aumento do número de estirpes resistentes. Têm sido descritos distintos fenótipos e mecanismos de resistência a glicopeptídeos (*VanA*, *VanB*, *VanC*, *VanD*, *VanE* e *VanG*), e é o fenótipo *VanA*, que está envolvido na resistência cruzada da vancomicina e teicoplanina, que é o mais frequentemente detectado. O mecanismo *VanC* é intrínseco à espécie *E. gallinarum* (*VanC-1*) e *E. casseliflavus* (*VanC-2*); este, como os outros fenótipos enunciados, comporta resistência à vancomicina.

Os Enterococcus apresentam também com frequência resistência a um grupo de antimicrobianos macrólidos, lincosamidas e Streptograminas (MLS), e o fenótipo de resistência mais frequente é o denominado MLS_B (resistência cruzada aos macrólidos, lincosamidas e streptograminas B). Também se tem descrito estirpes esporádicas do fenótipo M por expressão de bombas de efluxo activo (Shepard e Gilmore, 2002).

6- Inibidores de beta-lactamases

Para superar a resistência dos beta-lactâmicos às beta-lactamases têm sido utilizadas duas estratégias bacterianas. A primeira é a modificação da estrutura do antibiótico de forma que não haja mais substrato para a enzima hidrolisar, e a segunda pela inibição da enzima por um composto que seja estruturalmente relacionado ao substrato beta-lactâmico.

O uso de inibidores de beta-lactamases tem-se revelado o mais bem sucedido nos últimos anos, devido à rápida evolução dos agentes patogénicos, que levou ao eventual aparecimento de beta-lactamases que são capazes de hidrolisar os beta-lactâmicos modificados que têm sido desenvolvidos (Sousa, 2006).

Os inibidores de beta-lactamases são estruturalmente semelhantes às penicilinas, contendo a ligação amida do grupo beta-lactâmico, mas possuem uma cadeia lateral modificada, apresentando assim uma estrutura bicíclica. Tais aspectos estruturais permitem aos inibidores ligar-se irreversivelmente às beta-lactamases como substratos suicidas, mantendo-as inactivas.

Existem três inibidores de beta-lactamases que são frequentemente usados na clínica médica são eles o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (Williams, 1999).



Figura 8 - Inibidores de beta-lactamases (adaptado de Williams, 1999).

Em 1976, isolou-se o ácido clavulâmico, a partir de *Streptomyces clavuligerus*. É um fraco inibidor das D-D-carboxipeptidase-transpeptidases (PBPs), actuando como inibidor irreversível das beta-lactamases da classe A. Inibe as enzimas TEM, SHV das Enterobactérias, as beta-lactamases de *Haemophilus influenzae*, de *Neisseria gonorrhoeae*, as ESBLs, as enzimas cromosómicas de *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* e *Moraxella catarrhalis*. Difere das penicilinas pelo facto de apresentar no anel anexo ao anel beta-lactâmico um átomo de oxigénio (O) em vez de enxofre (S), um anel oxazolidínico.

O Sulbactan é uma sulfona do ácido penicilânico e inibe as beta-lactamases da classe A. O tazobactan inibe as beta-lactamases da classe A, algumas da classe D e da classe C (*M.morganii*).

Nenhum dos inibidores inibe as metaloenzimas, nem as beta-lactamases cromosómicas AmpC (excepto Tazobactam com *M.morganii*) (Sousa, 2006).

Na terapêutica, o ácido clavulâmico tem sido associado à amoxicilina e à ticarcilina, o sulbactan associado à ampicilina e à cefoperazona e a tazobactan à piperaciclina (Sousa, 2006).

Pode-se concluir que a combinação de um agente beta-lactâmico e um inibidor de beta-lactamase tem mostrado ser uma boa opção de tratamento, já que o inibidor inactivará a acção da enzima permitindo que as penicilinas, as quais são eficientes e bem toleradas continuem a tratar as mais variadas infecções (Williams, 1999).

IV – Métodos de pesquisa de beta-lactamases em amostras clínicas

Os métodos de detecção de beta-lactamases podem ser, grosseiramente divididos em dois grupos, nomeadamente métodos fenotípicos que usam técnicas não moleculares que detectam a capacidade das enzimas hidrolisarem diferentes antibióticos e os métodos genotípicos que usam as técnicas de biologia molecular, para detectar os genes responsáveis pela produção de beta-lactamases.

Os laboratórios de diagnóstico clínico usam principalmente métodos fenotípicos porque estes métodos são fáceis de executar, tem um custo mais baixo e têm sido incorporados na maioria dos sistemas automatizados, tornando-os muito acessíveis (Wiegand *et al.*, 2007). Contudo, os métodos fenotípicos, não são capazes de distinguir entre as enzimas específicas responsáveis pela produção de beta-lactamases, por exemplo entre ESBLs dos tipos SHV, TEM, e CTX-M.

Normalmente, a investigação e os laboratórios de referência usam métodos genotípicos para identificação de um gene específico e detectam-no mesmo com um baixo nível de resistência apresentada pelo microrganismo, o que pelos métodos fenotípicos seria impossível (Woodford e Sundsfjord, 2005). Além disso, os testes moleculares têm também a vantagem de serem efectuados directamente em amostras clínicas sem recorrer a culturas bacterianas, com o subsequente gasto de tempo (Tenover, 2007).

1-Métodos fenotípicos

1.1 Método acidimétrico

O método acidimétrico detecta o ácido penicilóico que se forma após a hidrólise da penicilina e sua presença é revelada utilizando um indicador de pH. O método é útil para testes em *Staphylococcus spp.*, *Haemophilus spp.* e *Neisseria gonorrhoeae* (Leich e Boonlayangoor, 1992; Livermore e Brown, 2001). Este método pode realizar-se em meio líquido ou utilizando discos ou tiras de papel. No primeiro caso utilizam-se tubos estéreis ou placas de microtitulação com 0,1 ml de uma solução penicilina G (1.000.000 U / ml) pH 8,5 e vermelho de fenol (0,5%). Esta solução pode ser preparada pela adição

de 2 ml de vermelho de fenol a 5%, 16,6 ml de água destilada e 1,2 g penicilina G (1 frasco de 20 milhões de U). O pH é ajustado com hidróxido de sódio (NaOH) a 1N. A solução resultante apresenta uma cor violeta e os tubos uma vez preparados podem ser armazenados a - 20 ° C (Livermore e Brown, 2001).

De seguida realiza-se uma suspensão com 4-5 colónias de uma cultura pura de bactérias, ao fim de 15 minutos, se houver mudança de cor desta solução de violeta a amarelo, indicará a produção de beta-lactamases (Hayes, Thomson e Amyes, 1996). Se não houver mudança de cor durante este tempo indicará que não há produção destas enzimas. As possíveis mudanças de cor ao fim desses 15 minutos podem ser inespecíficos ou produzidas pela deterioração do reagente. No entanto, algumas estirpes de *Staphylococcus*, geralmente sem indução prévia podem requerer mais de 15 minutos para demonstrar sua capacidade de produzirem beta-lactamases. Não devem ser adicionadas culturas líquidas sobre a solução de penicilina, pois podem alterar o pH e mudar o resultado do teste (Rodríguez *et al*, 2000).

Os sistemas acidimétricos comerciais normalmente usam discos ou tiras de papel impregnados com uma solução alcalina (1,25 mmol / L NaOH) de penicilina G (125 ug / ml) e 0,1% de azul bromocresol. Uma vez secas podem ser armazenadas a 4°C até 6 meses. Antes de se utilizarem devem ser rehidratadas com 1-2 gotas de água destilada, mas é essencial que a água não seja ácida, para não levar a falsos-positivos (Livermore, 1995). O aparecimento da cor amarelo dentro de 5 minutos, após a colocação 2-3 colónias de uma cultura pura na superfície dos discos ou das tiras rehidratadas, indicará a presença de beta-lactamases. Como no caso anterior, não devem ser utilizadas culturas líquidas (Oberhofer e Towle, 1982; Tu, Jorgensen e Stratton, 1981).

As tiras de papel que estão disponíveis no mercado são, por exemplo, “IntraLactam” (Mast Diagnostics, Bootle, UK) ou “Beta-Test” (Medical wire and Equipment, Corsham, UK) (Livermore e Brown, 2001).

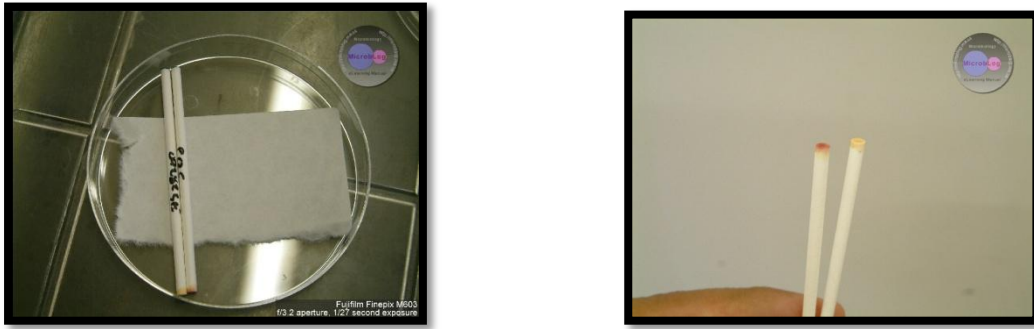


Figura 9 - Tiras de papéis comerciais - "IntraLactam" (Mast Diagnostics, Bootle,UK) (<http://microblog.me.uk/taxonomy/term/1?page=16>).

1.2 Método iodométrico

O método iodométrico utiliza a benzilpenicilina (penicilina G) como substrato, embora também tenha sido descrito com algumas cefalosporinas. Na presença de beta-lactamases produz-se o ácido penicilóico ou o cefalosporânico. Este diminui o pH do meio e reduz o iodo da mistura iodo-amido, desaparecendo o azul intenso desse complexo. Na ausência de beta-lactamase não se descolora a mistura do iodo-amido.

Estes testes são particularmente sensíveis para a penicilinase estafilocócica, mas são menos sensíveis e específicos que os métodos acidimétrico e cromogénicos para a maioria das beta-lactamases de bactérias Gram-negativo e, portanto, menos utilizado (Livermore e Brown, 2001).

Pode realizar-se em tubo ou em tiras de papel. No tubo, faz parte das alíquotas 0,1 ml de uma solução de penicilina G (6 mg / ml) dissolvida em tampão fosfato 0,1 M pH 6,0 (Catlin, 1975). Os tubos são inoculados com colónias de cultura a estudar, até obter uma turvação de cerca de 10^9 UFC / ml (unidades formadoras de colónias). A solução é mantida em temperatura ambiente cerca de 30-60 minutos, de seguida adiciona-se 20-25 μ l de uma solução de amido 1% e 20-25 μ l de uma solução de iodo (2%) - iodeto de potássio (53%). Agita-se a mistura durante 1 minuto e deve desaparecer a cor azul (característica do iodo) em menos de 10 minutos, se o organismo produzir beta-lactamases.

Também se utilizam discos ou tiras de papel secas. Estas são impregnadas numa solução de amido (0,2%) e de penicilina G (1%), sendo armazenadas a -20°C até ao seu uso. Posteriormente são rehidratadas com uma solução de iodo (2%) - iodeto de potássio (53%) e colocam-se algumas colónias, se observará a mudança de cor como nos tubos (Jorgensen, Lee e Alexander, 1977).

O método iodométrico não deve realizar-se a partir de meios líquidos. Podem existir falsos-positivos por reduzir o iodo (Rodríguez *et al*, 2000).

1.3 Método cromogénico

Ao contrário dos métodos acidimétrico e iodométrico, o método cromogénico é altamente específico, mas é limitado pela capacidade de hidrólise exercida pela beta-lactamase cromogénica usada. A mais utilizada é a nitrocefina, uma cefalosporina descrita pela primeira vez pela Glaxo Research (Middiesex, Inglaterra). Normalmente é comercializada numa lâmina descartável, que possui quatro áreas de reacção de papel de filtro que contêm nitrocefina. A lâmina coloca-se numa placa de petri e é rehidratada com 1-2 gotas de água destilada. De seguida, na área de reacção humedecida coloca-se as colónias isoladas que se pretendem testar. Se a beta-lactamase for produzida, hidrolisará o anel beta-lactâmico da nitrocefina, produzindo o ácido cefalosporânico (Lee e Rosenbatt, 1983). Após a hidrólise, a nitrocefina de cor amarela-pálida muda para cor-de-rosa (O'Callaghan *et al*, 1972). Para a maior parte das estirpes bacterianas, um resultado positivo desenvolver-se-á num prazo de 5 minutos, ou para outros casos, num tempo máximo de 1 hora a 37°C.

Por vezes, utiliza-se uma solução de 0,5 mM de nitrocefina preparada pela dissolução de 2,58 mg nitrocefina em 9,5 ml de 0,1 M tampão fosfato pH 7,0 e em 0,5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Normalmente, a prova realiza-se emulsificando as colónias do microorganismo a estudar em 20 µl de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 depositados sobre uma placa de Petri. Em seguida, adiciona-se 20 µl da solução de nitrocefina. O aparecimento de uma coloração vermelha intensa dentro de 1-2 minutos indicará a presença de beta-lactamases (Rodríguez *et al*, 2000; Livermore e Brown 2001).

Algumas bactérias (por exemplo, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* e *Enterococcus*) produzem beta-lactamases, outras (por exemplo, *Staphylococcus*) podem

produzir quantidades detectáveis de enzima somente após a exposição a um agente indutor, que é geralmente um beta-lactâmico. Se *Staphylococcus* produzir um resultado positivo sem indução, os resultados podem ser relatados. No entanto, se nenhuma beta-lactamase é detectada, então o teste deve ser realizado com células que tenham sido expostas a um agente indutor antes do resultado negativo ser descrito. Pode ser feito por meio de organismos que foram cultivadas na presença de concentrações sub-inibitórias de um agente beta-lactâmico (por exemplo, 0,25 µg de cefoxitina por ml) num sistema de caldo ou em ágar. Alternativamente, o crescimento em torno da periferia da zona circundante de um disco de beta-lactâmicos (por exemplo, um disco de 1µg de oxacilina ou de 30 µg cefoxitina) pode ser testado. Um resultado positivo pode demorar mais tempo a desenvolver para estafilococos do que para outros organismos, e o teste não deve ser considerado negativo até que tenha reagido durante pelo menos 60 minutos (Murray *et al*, 2007). Também, algumas enzimas como a ROB-1 de *H. influenzae*, determinadas carbapenemases de *Aeromonas* spp. e algumas beta-lactamases de largo espectro apenas conseguem mudanças lentas de cor amarela escura da solução nitrocefin ao fim de mais tempo. Além disso, por vezes, alguns PBP podem ter alguma acção "beta-lactamase" sobre o nitrocefin e induzir mudanças de cor após 10 minutos (Rodríguez *et al*, 2000).

Os testes cromogénicos à base de cefalosporina fornecem resultados fiáveis com a *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus* spp., *Branhamella catarrhalis*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides* spp. e outras Gram negativo anaeróbias (nomeadamente da cavidade oral), excepto o grupo *Bacteroides fragilis*, pois neste último a resistência aos fármacos beta-lactâmicos nem sempre é mediada pela produção de beta-lactamases, como acontece com *Bilophila wadsworthia*, *Bacteroides gracilis* e algumas estirpes de *Bacteroides distasonis* e *B.fragilis* (Murray *et al*, 2007). Mais especificamente, é detectada a resistência de *N. gonorrhoeae*, *Haemophilus* spp. e *B. catarrhalis* à penicilina, ampicilina e amoxicilina. É detectada a resistência à penicilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, mezlocilina, piperacilina e ticarcilina para *Enterococcus* e *Staphylococcus* (Murray *et al*, 1986; Bush *et al*, 1989; Patterson, Masecar e Zervos, 1988).

O composto PADAC (piridina-2-azo-p-dimetil-alinina cromóforo) é outra cefalosporina cromogénica que também é utilizada para a detecção rápida da produção de beta-

lactamases. É pior substrato que o nitrocefim e, portanto, menos sensível e não está tão disponível (Barlam e Neu, 1984). É usado em solução (250 mg / ml em tampão fosfato 50 mM pH 7,0) ou em discos ou em tiras da mesma maneira que o nitrocefim.

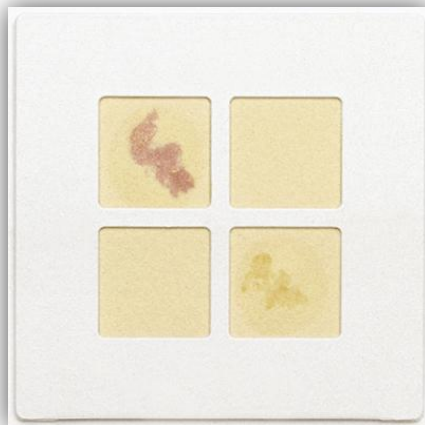


Figura 10 - Teste de Nitrocefim - Becton Dickinson BBL DrySlide Nitrocefim (<http://www.issb.biz/Export/BBL-Clinical/3797-BBL-Dryslide-Nitrocefim.asp>).

Tabela 3 - Métodos rápidos utilizados para a detecção de beta-lactamases (adaptado de Leitch e Boonlayangor, 1992).

Microorganismo	Método			Resistencia a
	Acidimétrico	Yodométrico	Cromogénico	
Staphylococcus spp.	X	X	X	Penicilina Ampicilina Amoxicilina Piperacilina Ticarcilina
Enterococcus faecalis			X	
Haemophilus spp.	X		X	
Neisseria gonorrhoeae	X	X	X	
Moraxella catharralis			X	
Bacteroides spp.			X	

Estes testes de detecção da produção de beta-lactamase não fornecem qualquer informação acerca do tipo de beta-lactamase presente (testes qualitativos), por isso

apenas são mais utilizados no início da tipagem em vez de serem usados como rotina. A sua principal limitação é o aumento do número de isolados que tem múltiplas beta-lactamases e isso pode obviamente distorcer os padrões de inibição observados (Livermore, 1995).

1.4 Método de difusão por discos (métodos de Kirby-Bauer)

Neste tipo de técnica utiliza-se o meio de cultura Mueller-Hinton Agar, distribuído em placas de Petri com uma espessura de meio de cultura de 4mm. A densidade de suspensão bacteriana a inocular deve ser equivalente a 0,5 unidades MacFarland (padrão). Discos de papel (conservados a 4°C protegidos da humidade) impregnados com os diferentes antibióticos usando concentrações pré definidas (CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute) são aplicados à superfície do meio de cultura. Após o tempo de incubação (37°C/18-24 horas) medem-se com craveira os halos de inibição de crescimento bacteriano à volta dos discos (Sousa, Cerqueira e Abreu, 2005).

Este método é adequado, unicamente, para bactérias patogénicas de crescimento rápido. Uma incubação mais prolongada pode dar lugar a erros de interpretação. O resultado é expresso em Sensível (S), Intermédio (I) e Resistente (R) por comparação dos resultados obtidos com os resultados publicados nas normas de CLSI. A concentração de cada antibiótico nos discos de papel é determinada segundo as normas do CLSI (Ferreira *et al*, 1998).

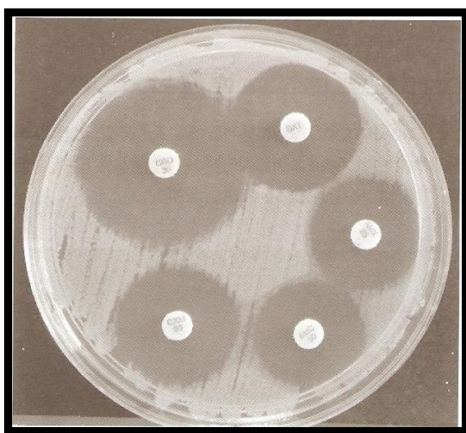


Figura 11 - Antibiograma de uma estirpe bacteriana, pelo método de difusão por discos (adaptado de Sousa, Cerqueira e Abreu, 2005).

1.5 Teste do duplo disco

O teste do duplo disco foi o primeiro método de detecção proposto para detecção fenotípica de ESBLs (Jarlier *et al*, 1988). Este tipo de método é realizado numa placa de ágar inoculada com uma estirpe bacteriana que se pretende estudar. Nesta mesma placa coloca-se um disco contendo cefotaxima (30 µg) e um disco contendo amoxicilina / ácido clavulânico (20 µg/10 µg, respectivamente), colocado a uma distância aproximada de 30 mm (centro a centro), sendo posteriormente a placa incubada a 37°C. A ampliação do halo de inibição do disco de cefotaxima nas proximidades do disco de amoxicilina / ácido clavulânico indica a presença de ESBLs.

Para melhorar a sensibilidade, o disco de cefotaxima pode ser substituído por discos contendo outras oximino-cefalosporinas (ceftriaxona, ceftazidima, ceftazidima) ou por discos de aztreonamo, aplicar os discos mais próximos uns dos outros, usar cefepime (cefalosporina de quarta geração), em vez das cefalosporinas de terceira geração quando é aplicada para produtores de AmpC em *Enterobacteriaceae*, pois este é estável às AmpC e lábil as ESBLs (Sousa, 2006). Se o resultado for negativo apesar de haver suspeita da produção de ESBLs, o ajuste do espaçamento de discos é recomendado. (Thomson e Sanders, 1992; Tzelepi *et al*, 2000).

Este tipo de teste também pode ser utilizado para detectar beta-lactamases AmpC, para isso utilizam-se discos de cloxacilina ou ácido borónico, e para detectar carbapenemases, em que se utiliza o ácido borónico para detectar carbapenemases da classe A e ácido dipicolínico ou EDTA para detectar carbapenemases da classe B.

Relativamente a este tipo de teste, existem vantagens e desvantagens. Por um lado é um método simples e de baixo custo. Por outro, é preciso reduzir a distância entre os discos para haver maior sensibilidade na detecção.

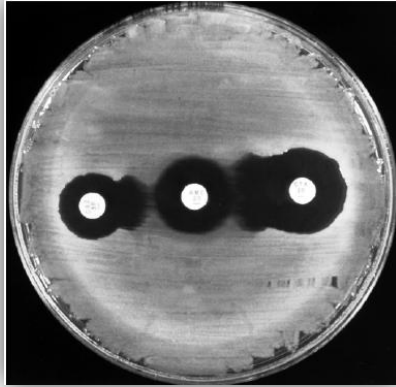


Figura 12 - Detecção da produção de ESBLs no teste do duplo disco. Discos: esquerda- ceftazidima 30 µg; centro - amoxicilina + ácido clavulânico 20 + 10 µg; direita- cefotaxima 30 µg. O organismo é *E. coli* com enzima do tipo TEM-5 (Livermore e Brown, 2001).

O CLSI recomenda um método de “screening” em todos os isolados de *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* que apresentem valores de CMI (concentração mínima inibitória) de cefpodoxima, cefotaxima, ceftazidima ou qualquer outra cefalosporina de terceira ou quarta geração ou aztreonamo maior do que o habitual ($> 1 \mu\text{g} / \text{ml}$). Inicialmente estabelece a utilização de placas de ágar Mueller-Hinton ajustadas com catiões que contenham $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ de cefpodoxima, ceftazidima, aztreonamo, cefotaxima ou ceftriaxona. Uma diminuição da sensibilidade a um ou mais dos antimicrobianos utilizados, pode indicar a presença de ESBLs. As colónias que crescem nestas placas devem ser submetidas a uposterior confirmação da presença de ESBLs.

Também se recomenda o estudo quantitativo dos valores de CMI de cefotaxima ou ceftazidima na presença e ausência de $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido clavulânico (prova de confirmação fenotípica). A diminuição em 3 ou mais diluições quando se acrescenta o ácido clavulânico seria compatível com a produção destas enzimas. Embora não se pronuncia para *Salmonella* spp. e *Proteus mirabilis*, estas recomendações seriam igualmente válidas nestas duas espécies. Pelo contrário estariam limitadas em outras Enterobacterias, especialmente aquelas que produzem beta-lactamases cromossómicas do tipo AmpC (Rodríguez *et al*, 2000).

Uma vez que haja suspeita da presença de ESBLs também pode ser confirmado pelos testes de sinergismo, por exemplo, entre ceftazidima e cefotaxima com o ácido clavulânico – teste do duplo disco.

Tabela 4- Recomendações de CLSI para a detecção de ESBLs em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (adaptado de Sousa, 2006).

Método dos discos	critério	E teste	critério
cefepodoxima (10g)	<17mm		
cefotaxima (30g)	<27mm	+ácido clavulânico (30+10g)	≥5mm
ceftriaxona (30µg)	<25mm		
ceftazidima (30µg)	<22mm	+ácido clavulânico (30+10g)	≥5mm
Aztreonamo (30µg)	<27mm		
Diluição em caldo:			
Cefepodoxima	≥8µg/ml		
Cefotaxima	≥2µg/ml	+ácido clavulânico	≥3 dil.
Ceftriaxona	≥2µg/ml		
Ceftazidima	≥2µg/ml	+ácido clavulânico	≥3 dil.
Aztreonamo	≥2µg/ml		

1.6 Teste de Etest

No método Etest (AB Biodisk, Suécia) pode-se por leitura directa, determinar a concentração mínima inibitória (CMI). Consiste numa tira de plástico que numa das extremidades tem um gradiente de concentração de cefotaxima, ceftazidima ou cefepima e do outro lado contém um gradiente da cefalosporina com uma concentração fixa de ácido clavulânico (4µg/ml). Uma vez que a placa de ágar está inoculada com o microorganismo, coloca-se a tira de Etest na sua superfície, produzindo uma difusão imediata de antibióticos desde a parte superior até ao ágar, criando assim uma faixa ao longo de um gradiente exponencial da concentração de antibióticos. Após a incubação das placas, aparece uma elipse de inibição, simetricamente centrada. Os valores de CMI são reprodutíveis e directamente proporcionais em relação ao método das diluições preconizados pelo CLSI (Rodríguez *et al*, 2000).

Para a detecção de metalo-beta-lactamases utilizam-se tiras que possuem num lado um carbanepeno (por exemplo, imipenemo) e do outro lado imipenemo mais EDTA ou ácido 2-mercaptopropiónico, já que este tipo de beta-lactamases é inibida por EDTA (quelante de iões metálicos).

Este método apresenta a vantagem de ser simples, fácil de usar, mas por outro para detecção de ESBLs do tipo CTX-M deve-se usar preferencialmente tiras de cefotaxima e cefotaxima com ácido clavulânico e se se colocar a faixa no sentido inverso não

é observado a elipse de inibição, pois o gradiente de concentração está localizado apenas em um lado da tira (Livermore e Brown, 2001; Navarro *et al*, 2011).

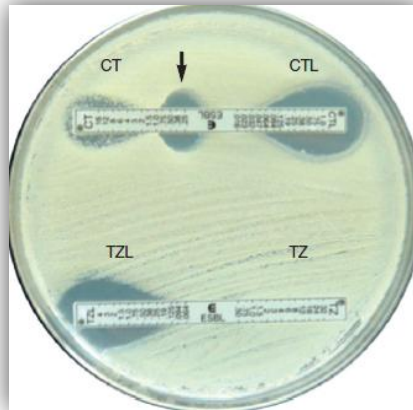


Figura 13 - E-test - ESBLs positivo. MICs são Cefotaxima > 16 mg/L, Cefotaxima/ácido clavulânico 0,064 mg/L, ceftazidima >32µg/ml, e ceftazidima/ácido clavulânico 0,25 µg/ml (Sohei Harada, Yoshikazu Ishii e Keizo Yamaguch, 2008).

A detecção de ESBLs usando estes procedimentos tem algumas limitações, decorrentes principalmente da presença de outros mecanismos de resistência no mesmo organismo, como alterações na permeabilidade ou produção simultânea de outros beta-lactamases.

Algumas *Enterobacteriaceae* possuem beta-lactamases cromossômicas que hidrolizam as cefalosporinas e são inibidas pelo ácido clavulânico. Quando existe hiperprodução dá lugar a um padrão fenotípico de resistência compatível com a presença de uma ESBLs. Entre elas se encontra a hiperprodução de beta-lactamase K1 de *Klebsiella oxytoca* (ceftazidima se mantém sensível e não se produz sinergia entre esta e amoxicilina-ácido clavulânico, mas sim com outras cefalosporinas de terceira geração, aztreonamo e cefepima), hiperprodução da enzima SHV-1 de *K. pneumoniae* e outras espécies (sinergia entre ceftazidima e amoxicilina-ácido clavulânico), hiperprodução de beta-lactamases cromossômicas de *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri* e *Citrobacter koseri* (sinergia entre cefotaxima e amoxicilina- ácido clavulânico) e a hiperprodução de enzimas do tipo OXA não ESBLs como OXA-1 (sinergia entre cefepima e amoxicilina- ácido clavulânico). Além disso, as ESBLs do tipo OXA (OXA -11, -14, -18, -28, etc.) podem não ser detectadas por estes métodos, porque são inibidas pelo ácido clavulânico.

Todos estes testes fenotípicos para detecção de ESBLs exigem pelo menos 48 horas desde que o produto chega ao laboratório (Navarro *et al*, 2011).

1.7 Método do ácido borónico

O ácido borónico (ácido 3-aminofenilborónico) é um inibidor de AmpC e vários estudos relataram a sua utilidade na detecção de organismos que produzem tanto beta-lactamases AmpC e ESBLs (Jeong *et al*, 2008; Song *et al*, 2007).

As associações de ácido borónico com ceftazidima ou ácido borónico com cefotaxima em discos de papel permitem o alargamento do diâmetro de inibição ($\geq 5\text{mm}$), quando comparado com os halos obtidos com as cefalosporinas isoladamente. É de prever que AB BIODISK crie tiras de E-test[®] com cefotaxima num lado da tira e no lado oposto cefotaxima com ácido borónico, de um modo semelhante ao conseguido com as tiras E-test[®] para a detecção de ESBLs e metaloenzimas, tornando possível avaliar a variação das CMI (Yagi *et al*, 2005; Sousa, 2006).

O uso do ácido borónico reduz a especificidade na detecção, pois também pode dar resultados positivos em estirpes produtoras de carbapenemases da classe, como as KPC (Navarro *et al*, 2011).

1.8 Teste de Hodge

O teste de Hodge modificado é a técnica que o CLSI recomenda para detecção fenotípica de carbapenemases. A inactivação dos carbapenemos por estirpes produtoras de carbapenemases permite o crescimento de um microorganismo num dos lados de uma estria efectuada com uma estirpe produtora, numa placa com um disco de um carbapenemo. Esta técnica permite detectar a produção de carbapenemases mas não fornece informações sobre a classe a que pertencem (Lee *et al*, 2001).

Este tipo de teste é aplicável a isolados da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e bacilos Gram negativo que mostram um padrão fenotípico compatível com a produção de carbapenemases (diminuição da sensibilidade ou resistência a cefalosporinas de terceira geração e carbapenemos).

A principal desvantagem do teste de Hodge modificado é a sua baixa especificidade, uma vez que também pode ser positivo em estirpes com a hiperprodução de beta-lactamase AmpC ou na produção de beta-lactamases de largo espectro (ESBLs) do tipo CTX-M, juntamente com alterações nas porinas. Se bem que as beta-lactamases AmpC podem ser inibidas com adição de cloxacilina ao meio de cultura ou aos discos, em áreas com elevada prevalência de ESBLs do tipo CTX-M os resultados positivos devem ser confirmados com outros métodos.



Figura 14 - Teste modificado de Hodge onde se observam estirpes positivas (Navarro *et al*, 2011).

1.9 Métodos automáticos

Cada vez mais se desenvolvem novos métodos para reduzir o tempo de espera do resultado, tais como, os métodos automáticos.

Os métodos Vitek 1, Vitek 2 (bioMérieux, Marcy l’Etoile, França) e Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA) são sistemas automatizados que são usados para detecção de ESBLs.

O sistema Vitek 1 possui cartões com cefalosporinas (ceftazidima e cefotaxima) isoladas e combinações de cefalosporinas com ácido clavulânico. O Vitek 2 possui um sistema “expert” (AES- Advanced Expert System) que é baseado num banco de dados que relaciona, para cada espécie, possíveis mecanismos de resistência com possíveis perfis de susceptibilidade (Hall *et al*, 2002; Sanders *et al*, 1996; Sanders *et al*, 2000).

Estes painéis são armazenados a -70°C até serem utilizados. Posteriormente, as cartas são inoculadas com diferentes estirpes bacterianas de acordo com as instruções do fabricante. Estes possuem ainda sistemas especializados em que fazem a respectiva leitura e os valores obtidos são interpretados (Thomson *et al*, 2007).

Vários estudos têm avaliado o desempenho destes sistemas automatizados para detecção de organismos produtores de ESBLs. Num estudo, utilizando Vitek 2, a percentagem de acertar na identificação dos mecanismos de resistência nas amostras testadas pode variar de 92% para *Enterobacter* spp. e de 74% para *Escherichia coli* e *Citrobacter freundii*. Neste mesmo estudo, cinco amostras de *K.pneumoniae* (12%) que possuíam a enzima AmpC foram classificadas como portadoras de ESBL (Sanders *et al*, 2000). No sistema Vitek 1, realizaram um estudo com *Enterobacter* spp. e o sistema mostrou-se pouco sensível para detectar ESBL nestas espécies, detectando apenas 6.4% dos isolados (Tzelepi *et al*, 2000).

O sistema Phoenix usa cefpodoxima como antibiótico “screening” para detecção de ESBL, seguida de um teste de sinergismo entre oximino-cefalosporinas (ceftazidima, ceftriaxona e cefotaxima) e ácido clavulânico e estes resultados passam pela análise do “BDXpert System” (Hall *et al*, 2002; Stürenburg e Mack, 2003). Num estudo, o sistema Phoenix apresentou uma sensibilidade de 95,8% e uma especificidade de 96,3% na detecção de ESBL em amostras da família *Enterobacteriaceae* e as duas amostras de *Enterobacter cloacae* que não foram identificadas como ESBL expressavam a enzima AmpC induzível (Stefaniuk *et al*, 2003). Por outro lado, noutro estudo que avaliou apenas amostras de *E.coli*, *K.pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*, a sensibilidade e a especificidade foram mais altas (98,0% e 98,7%, respectivamente) (Menozzi *et al*, 2006).

Num estudo comparativo entre Vitek 2 e Phoenix, este último identificou correctamente 34 isolados produtores de ESBL enquanto que o Vitek 2 identificou apenas 29 (Stürenburg e Mack, 2003).

Comparando os sistemas Vitek 1, Vitek 2 e Phoenix para *E. coli* e *Klebsiella* spp, quando foram avaliadas amostras controles, os sistemas apresentam a mesma especificidade (87%) e uma sensibilidade variada (78%, 100% e 89%, respectivamente). Avaliando a detecção de ESBL em isolados clínicos, a especificidade dos três sistemas

diminuiu (82% - Vitek 1, 85% - Vitek 2 e 82% - Phoenix), a sensibilidade do Vitek 2 também diminuiu (68%) ao contrário da sensibilidade do Vitek 1 e do Phoenix que aumentou (84% e 93%, respectivamente) (Hall *et al*, 2002).

Estes tipos de métodos oferecem importantes vantagens ao técnico do laboratório, ao clínico e também ao paciente. Além de uma grande fiabilidade, o técnico pode detectar as resistências de mais fraca expressão. O clínico dispõe de um relatório validado no próprio dia e será alertado em caso de resistência aos antibióticos. Esse relatório permite ao clínico aferir o seu diagnóstico e, se necessário, modificar a antibioterapia o mais cedo possível. Quanto ao paciente, ele será rapidamente tratado com um antibiótico adequado. Este tipo de método pode ainda contribuir para a detecção de infecções relacionadas com Cuidados de Saúde, de modo a rapidamente colocar em prática medidas preventivas (Ferraro e Jorgensen, 1999).

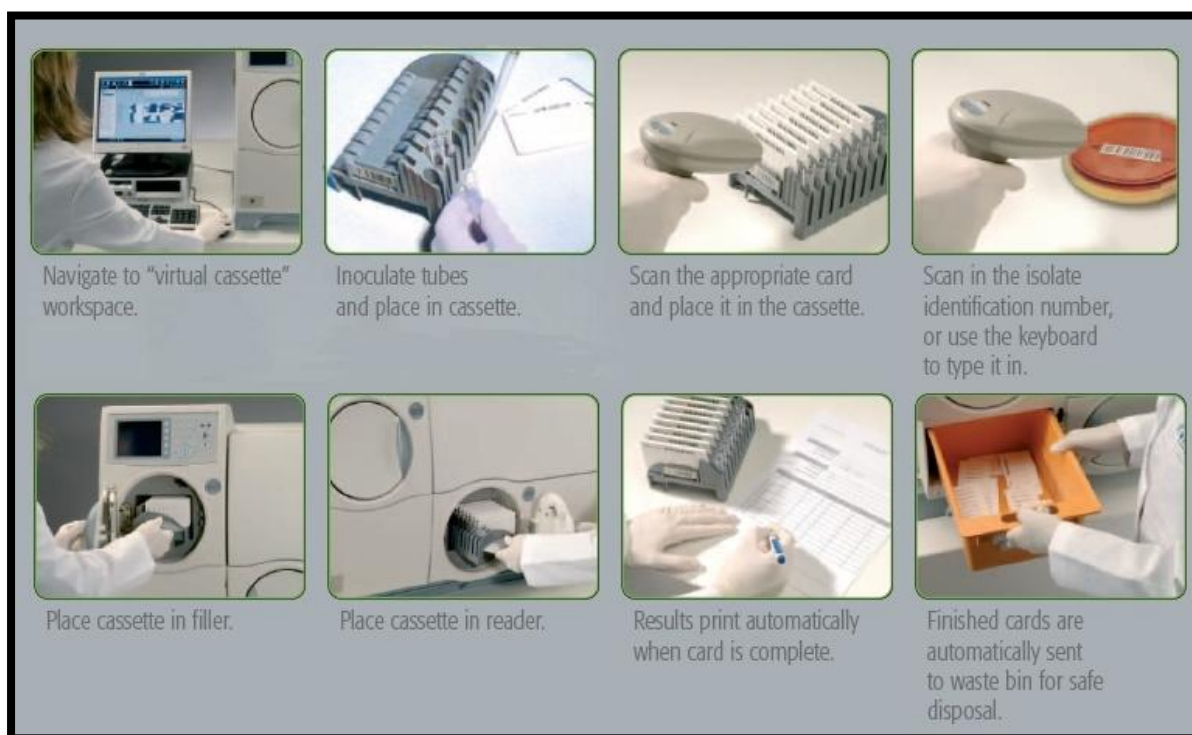


Figura 15 - As diferentes etapas do método automático VITEK 2 (Adaptado de http://www.biomerieuxindustry.com/servlet/srt/bio/industry microbiology/dynPage?open=NDY_IND_FDA_PRD&doc=NDY_FDA_PRD_G_PRD_NDY_34&pubparams.sform=4&lang=en).



Figura 16 - Aparelho e cartas de identificação utilizados no método VITEK 2 (adaptado de http://www.biomerieuxindustry.com/servlet/srt/bio/industry microbiology/dynPage?open=NDY_IND_FDA_PRD&doc=NDY_FDA_PRD_G_PRD_NDY_34&pubparams.sform=4&lang=en).

2. Métodos moleculares

Os testes já referidos baseiam-se na detecção da presença da enzima através das suas características fenotípicas. Contudo, outros mecanismos de resistência podem estar presentes interferindo no resultado desses testes (Rice e Bonomo, 2007). Além disso, há casos em que as enzimas conferem baixos níveis de resistência e não são detectadas por testes fenotípicos. Nestes casos, o ideal é utilizar técnicas que detectem especificamente as enzimas responsáveis pela resistência ou os genes responsáveis pela produção da enzima (Pitout e Laupland, 2008).

As técnicas moleculares também são importantes a nível epidemiológico, para saber qual a enzima mais prevalente em determinada região. Além disso, há casos em que um mesmo isolado clínico expressa diferentes beta-lactamases, sendo necessárias técnicas moleculares para detectar quais as enzimas que estão presentes nos microrganismos. Convém salientar que algumas técnicas moleculares podem ser realizadas a partir do material clínico do paciente, não sendo necessária a cultura bacteriana, o que acarreta um menor tempo no diagnóstico (Pitout e Laupland, 2008).

Os testes mais específicos incluem as técnicas que detectam os genes responsáveis pela produção da enzima, como o método da Reacção de Polimerização enzimática em cadeia (PCR) bem como técnicas para detecção directa da enzima em extractos celulares através da determinação de ponto isoeléctrico (Isoelectric Focusing- IEF) (Stürenburg e Mack, 2003).

Na determinação do ponto isoeléctrico (o pH no qual existe um equilíbrio entre as cargas positivas e negativas) deve-se cultivar uma estirpe num meio em que foi adicionado cefalosporinas (que se tem mostrado resistentes a esta), com o fim de se produzir uma maior quantidade de enzima. Depois lisa-se o cultivo por sonicação e purifica-se o extracto proteico por ultracentrifugação, submete-se o sonicado à electroforese (PhastSystem apparatus, Pharmacia, Uppsala, Suecia) em gel de poliacrilamida por gradiente de pH, com um intervalo entre 3 e 9 (PhastGel 3-9, Pharmacia) e utiliza-se a nitrocefina (500 µg/ml; Oxoid) para comparar os pontos isoeléctricos (pI) obtidos com outras beta-lactamases conhecidas (Oliver e Cantón, 2003; Peña *et al*, 1998; Huovinen, Huovinem e Jacoby, 1988). As ESBLs derivadas de TEM têm um pI entre 5,2-6,5, as derivadas de SHV têm pI 7,0-8,2 e as CTX-M têm um pI entre 7,6-9,0 (Sousa, 2006).

Actualmente, a focalização isoeléctrica utiliza-se pouco devido à descrição de diferentes ESBLs que compartilham o mesmo ponto isoeléctrico. Apesar de não ser possível definir a ESBL específica, esta técnica é útil para definir se há uma enzima prevalente num dado local ou região (García, Gándara e García, 2010).

A técnica de PCR utiliza primers que são específicos para os genes que codificam a beta-lactamase, seguida de uma sequenciação. Os primers podem ser escolhidos a partir de sequências disponíveis em bancos de dados públicos como o Genbank (Genbank, Centro Nacional de Biotecnologia, informações em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). Porém, a técnica de PCR não diferencia os diferentes tipos de enzimas em cada família das beta-lactamases (Mabilat e Goussard, 1993; Nüesch-Inderbinen e Hächler, 1996). Este tipo de método pode ser utilizado para detectar todo tipo de beta-lactamases, pesquisando os genes que foram referidos na Tabela 2.

Outra técnica molecular para caracterizar os genes das beta-lactamases, denomina-se PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*). Consiste em associar a análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição ao PCR (Arlet e Philippon, 1991). Neste teste, os produtos amplificados por PCR, são submetidos à digestão com várias endonucleases de restrição e posteriormente os fragmentos são separados por electroforese. O tamanho dos fragmentos gerados por cada enzima de restrição indicam mutações pontuais dentro do gene estrutural.

Outras técnicas de biologia molecular utilizadas são as sondas de DNA e técnicas de amplificação. No entanto as sondas são pouco utilizadas pois requerem múltiplos ensaios e originam falsos-positivos. Nestes casos seria necessário transferir a resistência para uma estirpe padrão e fazer a detecção sobre o recombinante. As técnicas de amplificação têm o mesmo inconveniente, mas permitem à posteriori sequenciar o produto de PCR, sendo portanto mais úteis para a caracterização da enzima (Arlet e Philippon, 1991; Gallego *et al*, 1990; Huovinen, Huovinen e Jacoby, 1988; Sousa, 2006).

Contudo, o aumento do número de novos subtipos que se descreve constantemente dentro de cada família das diferentes beta-lactamases tem colocado limitações nestas técnicas, no que diz respeito à sua capacidade de abranger toda a gama de variantes com diferentes mutações pontuais. No entanto, a amplificação por PCR seguida de sequenciação permanece, ainda, uma boa metodologia para a identificação de mutações pontuais específicas dos diferentes genes, apesar dos resultados nem sempre se apresentarem claros, devido às múltiplas cópias de genes que os isolados clínicos frequentemente possuem (Pitou e Laupland, 2008).

As técnicas moleculares têm potencial para desempenhar uma parte essencial no laboratório colocando em tempo real o rastreio e a monitorização da disseminação de um grande número de organismos produtores de beta-lactamases a partir da comunidade e do hospital (Pitou e Laupland, 2008).

Tabela 5 - Técnicas de detecção de beta-lactamases (adaptado de Samaha-Kfoury e Araj, 2003).

Testes	Método e interpretação
Testes de “screening”	<p>Numa placa de ágar colocam-se oximinocefalosporinas, uma sensibilidade menor ou maior indica presença de beta-lactamases</p> <p>Explora a sensibilidade a cefotaxima e ceftazidima com e sem ácido clavulânico mediante difusão em ágar com discos ou microdiluição em caldo</p>
Teste do duplo disco	Disco de cefalosporinas de terceira geração colocado com 30 mm de distância amoxicilina-ácido clavulânico. Inibição avançada indica produção de beta-lactamases
Etest	Numa das extremidades da tira contém ceftazidima e na outra ceftazidima-ácido clavulânico. A relação entre a CMI da combinação com ceftazidima se for > 8, ou existir a presença de uma zona fantasma (ou ambos)
Métodos automáticos (por exemplo, VITEK)	Medidas de CMI e comparar o crescimento de bactérias na presença de ceftazidima versus ceftazidima-ácido clavulânico
Métodos moleculares (Sondas de DNA, PCR, PCR-RFLP)	Alvos específicos para detectar sequências de nucleotídeos de diferentes genes, que codificam a beta-lactamase .

Tabela 6 - Vantagens e Desvantagens das técnicas de detecção de beta-lactamases (Adaptado de Bradford, 2001).

Tipo de técnica	Teste	Vantagens	Desvantagens
<u>Microbiologia clínica</u>	Prova de confirmação fenotípica	Fácil de usar e de interpretar	A sensibilidade depende da oximino-cefalosporina escolhida
	Teste duplo disco	Fácil de usar e de interpretar	A distância da colocação do disco para uma maior sensibilidade
	Etest	Fácil de usar	Nem sempre fácil de interpretar e não é tão sensível como teste de duplo disco
Métodos automáticos(VITEK, Phoenix)		Fácil de usar e interpretar	Sensibilidade reduzida
<u>Deteção molecular</u>	Focalização isoeléctrica	É útil para definir se há uma enzima prevalente num dado local ou região	Descrição de diferentes beta-lactamases que compartilham o mesmo ponto isoeléctrico
	Sondas de DNA	Específico para família de genes	Trabalho intensivo, não pode distinguir entre as variantes dos diferentes genes; Requer sondas para cada gene
	PCR	Fácil de executar, específico para família de genes	Não pode distinguir entre as variantes dos diferentes genes; Requer primers específicos
	PCR-RFLP	Fácil de executar, pode detectar alterações específicas de nucleotídeos	As mudanças dos nucleotídeos são necessário haver alteração do sítio de restrição para se detectar

V – Conclusão

A detecção rápida e precisa dos agentes patogénicos é fundamental para a instauração e monitorização das medidas terapêuticas, e para o controlo e vigilância epidemiológica das doenças infecciosas.

Contudo, o uso excessivo e inadequado dos antibióticos criou novos tipos de problemas, causando doenças emergentes com bactérias resistentes aos antibióticos utilizados. Num estudo sobre o uso de antibióticos na Europa, Portugal está entre um dos países que consome mais antibióticos, com uma dose diária de 28,8 por 1000 habitantes (Cars, Mölsted e Melander, 2001).

A escolha do antibiótico para a terapêutica das doenças infecciosas não é um acto gratuito e a sua escolha deve ser meditada de acordo com critérios científicos. Requerem o conhecimento dos seus mecanismos de acção, se são bactericidas ou bacteriostáticos, os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos, as características farmacológicas das moléculas, os efeitos adversos, a incompatibilidade entre medicamentos e a história clínica (anamnese) dos doentes, nomeadamente a idade, o estado da função renal e hepática, o local e a etiologia da infecção (Sousa, 2006).

O significado clínico destes microrganismos e seus mecanismos de resistência torna-se essencial para o laboratório desenvolver técnicas adequadas para a detecção e identificação e facilitar a implementação de medidas de vigilância epidemiológica para impedir a sua divulgação.

A detecção da resistência aos antibióticos por métodos fenotípicos convencionais pode ser problemática, por ser longa e o seu atraso significar que o paciente pode estar exposto a terapêuticas inadequadas. Mas o aparecimento de tecnologias de biologia molecular tornou possível o diagnóstico rápido, o que levará a uma melhoria no tratamento podendo evitar a transmissão da multirresistência (Navarro *et al*, 2011 e Rodríguez *et al*, 2000).

As bactérias vão continuar a escapar ao efeito dos antibióticos, tornando-se mais “inteligentes” que o próprio Homem. A melhor solução é usar os antibióticos quando necessários e restringir a sua utilização na pecuária, evitar a sua eliminação para o

ambiente, evitar a automedicação e o cumprimento de regras rígidas com fins profiláticos (Sousa, 2006).

“Não existe uma categoria de ciência que se pode chamar de aplicada. Existe ciência e aplicação da ciência ligadas entre si como o fruto e a árvore de que dependem.”

Louis Pasteur, 1871

VI- Bibliografia

Abraham, E. e Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146, pp. 837.

Ambler, R. (1980). The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc London Ser B*, 289, pp. 321-331.

Arias, J. (2001). *La prodigiosa penicilina. Fleming*. Madrid, Nivola libros y ediciones, S.L.

Arlet, G. e Philippon, A. (1991). Construction by polymerase chain reaction and intragenic DNA probes for three main types of transferable β -lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiol. Lett.*, 82, pp. 19–26.

Barlam, T. e Neu, H. (1984). Pyridinium 2-azo-p-dimethylaniline chromophore, a chromogenic reagent for β -lactamase testing compared to nitrocefin. *European Journal of Clinical Microbiology*, 3, pp. 185-189.

Biomerieux-industry. (2011). [Em linha] Disponível em <http://www.biomerieux-industry.com/servlet/srt/bio/industrymicrobiology/dynPage?open=NDY_IND_FDA_PRD&doc=NDY_FDA_PRD_G_PRD_NDY_34&pubparams.sform=4&lang=en>. [Consultado em 13/09/2011].

Bradford, P. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *ClinMicrobiol Rev*, 14, pp. 933 – 951.

Bush, L. *et al* (1989). High-level penicillin resistance among isolates of *Enterococci*. *Ann Intern Med*, 110, pp. 515-520.

Ferreira, W. *et al* (1998). Microbiologia, Vol. I e II. Lisboa – Porto, Lidel.

Gallego, L. *et al* (1990). Digoxigenin-labeled DNA probe to detect TEM type β -lactamases. *J. Microbiol. Methods*, 11, pp. 261–267.

García, C., Gándara, M. e García, F. (2010). Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28(1), pp. 12-18.

Georgopapadakou, N. e Liu, F. (1980). Penicillin-binding proteins in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 18, pp. 148-157.

Georgopapadakou, N. (1993). Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother*, 37, pp. 2045-2053.

Hall, M. *et al* (2002). Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, Vitek 1 and Vitek 2 automated instruments for detection of extended.spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. *Journal of clinical Microbiology*, 40, pp. 3703-3711.

Harbottle, H. *et al* (2006). Genetics of antimicrobialresistance. *Anim Biotechnol*, 17, pp. 111-124.

Hayes, M., Thomson, C. e Amyes, S. (1996). The 'hidden' carbapenemase of *Aeromonas hydrophila*. *J Antimicrob Chemother*, 37 (1), pp. 33-44.

Hiramatsu, K. *et al* (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother*, 40, pp. 135-146.

Huovinen, S., Huovinen, P. e Jacoby, G. (1988). Detection of plasmid mediated β -lactamases with DNA probes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32, pp. 175–179.

Internacional scientific supply services (2011). [Em linha] Disponível em <<http://www.issc.biz/Export/BBL-Clinical/3797-BBL-Dryslide-Nitrocefim.asp>> [Consultado em 14/09/2011].

Iwahara, K. *et al* (2006). Detection of *cfxA* and *cfxA2*, β -lactamase Genes of *Prevotella* spp., in Clinical Samples from Dentoalveolar Infection by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, pp.172-176.

Jacoby, G. e Munoz-Price, M. (2005). The new beta-lactamases. *N Eng J Med*, 352, pp. 380-391.

Jacoby, G. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Ver*, 22, pp. 161–82.

Jarlier, V. *et al* (1988). Extended broadspectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis*, 10, pp. 867-78.

Jeong, S. *et al* (2008). Boronic acid disk tests for identification of extended-spectrum β -lactamase production in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing chromosomal AmpC β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents*, 31, pp. 467-471.

Jorgensen, J., Lee, J. e Alexander, G. (1977). Rapid penicillinase paper strip test for detection of β -lactamase producing *Haemophilus influenzae* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11, pp. 1087-1088.

Kucers, A. *et al* (1997). *The use of antibiotics*. Oxford. U.K., ButterWorth-Heineman.

Leclercq, R. (2009). Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant *Staphylococci* and *Enterococci*. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, pp. 224-231.

Lee, D. e Rosenblatt, J. (1983). A comparison of four methods of detecting β -lactamase in anaerobic bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1, pp.173-175.

Lee, K. *et al* (2001). Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.*, 7, pp. 88–91.

Lee, S. e Jeong, S. (2005). Nomenclature of GES-type extended-spectrum betalactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, pp. 2148-2150.

Leich, C. e Boonlayangoor, S. (1992) β -lactamases tests. *In: Isenberg, H. (Ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM, Washington, pp. 5.3.1-5.3.8.

Livermore, D. (1995). β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8, pp.557-584.

Livermore, D. e Brown, D.(2001). Detection of β -lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother*, 48(1), pp. 59-64.

Livermore, D. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis*, 36, pp.S11-S23.

Livermore, D. e Woodford, N. (2006). The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*, 14, pp. 412-420.

Livermore, D. (2008). Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect*, 14, pp.3 –10.

Mabilat, C. e Goussard, S. (1993). PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases. *In: Persing, D., Smith, T., Tenover, T. e White, T. (Ed.). Diagnostic molecular microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 553-559.*

Mascaretti, O. (2003). *Bacteria versus Antibacterial Agents*. Washington, D.C., ASM Press.

Menozi, M. *et al* (2006). Two-center collaborative evaluation of performance of the BD Phoenix automated Microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative bacteria. *Journal of clinical Microbiology*, 44, pp.4085-4095.

Microblog (2011), [Em linha]. Disponível em <<http://microblog.me.uk/taxonomy/term/1?page=16>> [Consultado em 13/09/2011].

Miriagou, V. *et al.* (2010). Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect*, 16, pp. 112–122.

Murray, B. *et al* (1986). Comparison of two β -lactamase-producing strains of *streptococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 30, pp.861-864.

Murray, B. (1990). The life and times of *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev*, 3, pp. 46-65.

Murray, P. *et al* (2007). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, ASM Press.

Navarro, F., Miró, E. e Mirelis, B. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28, pp. 638–645.

Navarro, F. *et al* (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos Gram negativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29(7), pp. 524-534.

Nikaido, H. (2009). Multidrug Resistance in Bacteria. *Anual Review of Biochemistry*, 78, pp. 8-28.

Nordmann, P. e Poirel, L. (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*, 8, pp. 321-331.

Normark, B. e Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252, pp. 91-106.

Nüesch-Inderbilen, M. e Hächler, F. (1996). Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the Etest. *Eur.J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* ,15, pp. 398–402.

O'Callaghan, C. *et al* (1972). Novel method for detection of β -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother*, 1(4), pp.283-288.

Oberhofer, T. e Towle, D. (1982). Evaluation of the rapid penicillinase paper strip test for detection of betalactamase. *J Clin Microbiol*, 15(2), pp. 196-199.

Oliver, A. e Cantón, R. (2003). Enterobacterias productoras de beta-lactamasas plasmídicas de espectro extendido. [Em linha]. Disponível em <<http://www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/Blees.pdf>>. [Consultado em 31 de Agosto].

Patterson, J., Masecar, B. e Zervos, M. (1988). Characterization and comparison of two penicillinase-producing strains of *streptococcus (Enterococcus) faecalis*. *Antimicrob Agents and Chemother*, 32, pp. 122-124.

Peña, C. *et al* (1998). Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, pp. 53-58.

Pitout, J. e Laupland, K. (2008). Extended-Spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infectious Diseases*, 8, pp. 159-166.

Poole, K. (2004). Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, pp. 2200-2223.

Queenan, A. e Bush, K. (2007) Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.*,20, pp. 440–458.

Rice, L. e Bonome, R. (2007). Mechanisms of resistance to antibacterial agents. *In*: Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Landry, M., Tenover, P., Tenover, M. (Ed.). *Manual of clinical Microbiology*. Washington, ASM Press, pp.1114-1145.

Richmond, M. (1965). Wild type variants of exopenicillinase from *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.*, 88, pp. 452–459.

Rodríguez, J. *et al* (2000). Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. [Em linha]. Disponível em <<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>> [Consultado em 26/11/10].

Rosdahl, V. (1973). Naturally occurring constitutive β -lactamase with novel serotype in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, 77, pp. 229–231.

Samaha-Kfoury, J. e Araj, G. (2003). Recent developments in β -lactamases and extended spectrum β - lactamases. *BMJ* , 327, pp. 1209–1213.

Sanders, C. *et al* (1996). Detection of Extended.spectrum- β -lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* with the Vitek ESBL test. *Journal of clinical Microbiology*, 34, pp. 2997-3001.

Sanders, C. *et al*, (2000). Ability of the Vitek 2 Advanced Expert System to identify β -lactam phenotypes in isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical Microbiology*, 38, pp.570-574.

Shepard, B. e Gilmore, M. (2002). Antibiotic-resistant *Enterococci*: the mechanisms and Dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect*, 4, pp. 215-224.

Sohei Harada, M., Yoshikazu Ishii, M. e Keizo Yamaguchi, M. (2008). Extended-spectrum β -Lactamases: Implications for the Clinical Laboratory and Therapy. *Korean J Lab Med* , 28, pp. 401-12.

Song, W. *et al* (2007). Detection of extended-spectrum β -lactamases by using boronic acid as an AmpC β -lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 45, pp.1180-1184.

Sousa, J., Cerqueira, F. e Abreu, C. (2005). *Microbiologia protocolos laboratoriais*. Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa.

Sousa, J. (2006). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa.

Stefaniuk, E. *et al* (2003). Evaluation of the BD Phoenix Automated Identification and susceptibility testing system in clinical microbiology laboratory practice. *European Journal of clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 22, pp.479-485.

Stratton, C. (2000). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Leb Med J*, 48, pp. 186-98.

Stürenburg, E. e Mack, D. (2003). Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *Journal of infection*, 47, pp.273-295.

Tenover, F. (2007). Rapid detection and identification of bacterial pathogens using novel molecular technologies: infection control and beyond. *Clin Infect Dis*, 44, pp. 418-423.

Thomson, K. e Sanders, C. (1992). Detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother*, 36, pp- 1877-1882.

Thomson, K. *et al* (2007) Comparison of Phoenix and VITEK 2 extended-spectrum- β -lactamase detection tests for analysis of *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates with well-characterized beta-lactamases. *J Clin Microbiol*, 45, pp. 2380-2384.

Tokar, K. (2008). Bacterial Resistance to Antibiotics. [Em linha]. Disponível em <[http:// www.textbookofbacteriology.net/resantimicrobial.html](http://www.textbookofbacteriology.net/resantimicrobial.html)>. [Consultado em 07/10/10].

Tsiodras, S. *et al* (2001). Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 358, pp. 207-208.

Tu, K., Jorgensen, J. e Stratton, C. (1981). A rapid paperdisc test for penicillinase. *Am J Clin Pathol*, 75(4), pp. 557-559.

Tzelepi, E. *et al* (2000). Detection of Extended-spectrum- β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *Journal of clinical Microbiology*, 38, pp.542-546.

Voladri R. e Kernodle, D. (1998). Characteristics of a chromosomal gene encoding type β -lactamase in phage group II isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(12), pp. 3163-3168.

Walsh, T. (2010). Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents*, 36, pp. 8–14.

Wiegand, I. *et al* (2007). Detection of extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *J Clin Microbiol*, 45, pp. 1167-1174.

Willians, J. (1999). β -lactamases and β -lactamase inhibitors. *Inter. J. Antimicrob. Agents*, 12, pp. 3-7.

Woodford, N. e Sundsfjord, A. (2005). Molecular detection of antibiotic resistance: whenand where? *J Antimicrob Chemother*, 56, pp. 259-261.

Yagi, T. *et al* (2005). Practical Methods Using Boronic Acid Compounds for Identification of Class C -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 43, pp. 2551-2558.