

**Teresa Maria Pinto Gonçalves**

Caracterização de genes que codificam para beta-lactamases de espectro alargado em  
*Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

Universidade Fernando Pessoa

Porto 2010



Caracterização de genes que codificam para ESBLs em *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

**Teresa Maria Pinto Gonçalves**

Caracterização de genes que codificam para beta-lactamases de espectro alargado em  
*Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

Universidade Fernando Pessoa

Porto 2010

**Teresa Maria Pinto Gonçalves**

Caracterização de genes que codificam para beta-lactamases de espectro alargado em  
*Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

Assinatura

Trabalho apresentado à Universidade Fernando  
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do  
grau de Licenciatura em Ciências Farmacêuticas.

Universidade Fernando Pessoa

Porto 2010

## Sumário

Os antibióticos do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos encontram-se entre os mais utilizados no tratamento de infecções causadas por *Enterobacteriaceae*. Contudo, a produção de beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs) nestas bactérias diminui a sua eficácia clínica, restando poucas alternativas terapêuticas, visto que estas bactérias acumulam frequentemente resistência a outras famílias de antibióticos. A produção de ESBLs constitui por isso um dos mecanismos de resistência com maior importância e impacto clínico em *Enterobacteriaceae*. É essencial detectar no laboratório de microbiologia clínica todos os isolados produtores de ESBLs, assim como proceder à caracterização dos genes que codificam para estas enzimas, de forma a detectar precocemente a emergência de novos genes de resistência e determinar os genes que se encontram mais disseminados entre diferentes espécies bacterianas.

Em Portugal a ocorrência, diversidade e relevância clínica das ESBLs são ainda pouco estudadas, existindo apenas relatos esporádicos em hospitais específicos ou estudos efectuados em períodos de tempo relativamente curtos. Mudanças na epidemiologia das ESBLs impõem novas abordagens terapêuticas e de controlo da infecção, justificando a sua vigilância periódica e o presente estudo. Assim, com esta monografia pretendeu-se investigar a ocorrência e a diversidade de genes que codificam para ESBLs ( $bla_{ESBL}$ ) em *Enterobacteriaceae* isoladas de um hospital Português entre Junho de 2006 e Junho de 2007, comparando com dados de anos anteriores (2002-2004), assim como avaliar a co-resistência a antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos nos isolados produtores de ESBLs. Para isso, foram utilizados métodos universalmente aceites para a identificação das espécies e avaliação da susceptibilidade a antibióticos. A caracterização de ESBLs incluiu a realização do teste do duplo sinergismo e a identificação de genes  $bla_{ESBL}$  ( $bla_{TEM}/bla_{SHV}/bla_{CTX-M}$ ) por PCR e sequenciação. A presença do gene  $bla_{OXA-1}$  e  $qepA$  entre os isolados produtores de ESBLs foi também pesquisada por PCR. A expressão de ESBLs foi observada em 5% (81/1486) dos isolados clínicos analisados, os quais foram identificados como *Escherichia coli* (n=48), *Enterobacter cloacae* (n=14), *Klebsiella pneumoniae* (n=10), *Klebsiella oxytoca* (n=4), *Morganella morganii* (n=2), *Enterobacter asburiae* (n=1), *Proteus mirabilis* (n=1) e *Serratia marcescens* (n=1). As ESBLs detectadas incluíram representantes de enzimas do tipo TEM (18/81, 22%), SHV (18/81, 22%) e CTX-M (38/81, 47%), correspondendo a oito tipos de ESBLs distintos: TEM (-10, -52, -116), SHV (-12, -64) e CTX-M (-14, -15, -32). As ESBLs

mais comuns foram CTX-M-15 (35/81, 43%) identificada em *E. coli*, e SHV-12 (17/81, 21%) detectada em diferentes espécies. *bla*<sub>OXA-1</sub> e *bla*<sub>TEM-1</sub> foram detectadas na maioria dos isolados produtores de CTX-M-15 (20/32, 63%). Não foi detectada a presença do gene *qepA* entre as *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs. A co-resistência a antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos foi frequentemente observada, maioritariamente a tetraciclina (86%), canamicina (85%), gentamicina (78%), tobramicina (77%), estreptomicina (61%), ciprofloxacina (65%) e sulfonamidas (59%).

Conclui-se que ocorreu um aumento na ocorrência e na diversidade de ESBLs e de espécies produtoras de ESBLs no hospital analisado. CTX-M-15 e SHV-12 foram os tipos de ESBLs mais frequentes, tendo sido a espécie *E. coli* a mais comumente identificada como produtora de ESBLs. A disseminação de clones e plasmídeos que albergam estas ESBLs e que conferem resistência a antibióticos de outras famílias parecem estar a contribuir para este cenário, embora estudos moleculares mais aprofundados devam ser realizados para confirmar o seu envolvimento na situação epidemiológica actual.

### **Abstract**

$\beta$ -lactams are among the most widely used antibiotics to treat infections caused by *Enterobacteriaceae*. However, production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) reduces their clinical efficacy, leaving few therapeutic alternatives, since these bacteria often accumulate resistance genes to antibiotics of other groups. Therefore, production of ESBLs constitutes one of the mechanisms of resistance with greater importance and clinical impact in *Enterobacteriaceae*. It is essential to detect in the clinical microbiology laboratory all isolates producing ESBLs, as well as to characterize the genes coding for these enzymes, in order to early detect the emergence of new resistance genes and determine the genes that are most widespread among different bacterial species.

In Portugal the occurrence, diversity and clinical significance of ESBLs are still poorly studied, with only sporadic reports on individual hospitals or studies in relatively short time periods. Shifts in ESBL-epidemiology might impose new therapeutic approaches and infection control measures, justifying their periodic surveillance and the present

study. The main objectives of this monograph were to investigate the occurrence and diversity of genes coding for ESBLs ( $bla_{ESBL}$ ) among *Enterobacteriaceae* recovered at a Portuguese hospital between June 2006 and June 2007, comparing data with previous years (2002-2004), as well as to evaluate the co-resistance to non- $\beta$ -lactam antibiotics in ESBL-producing isolates. To accomplish these goals, we used standard methods for species identification and evaluation of susceptibility to antibiotics. The characterization of ESBLs included detection of expression by the double disc synergy test and identification of  $bla_{ESBL}$  genes ( $bla_{TEM}/bla_{SHV}/bla_{CTX-M}$ ) by PCR and sequencing. The presence of  $bla_{OXA-1}$  and  $qepA$  among ESBL-producing isolates was also investigated by PCR. Expression of ESBLs was observed in 5% (81/1486) of the clinical isolates analyzed, which were identified as *Escherichia coli* (n=48), *Enterobacter cloacae* (n=14), *Klebsiella pneumoniae* (n=10), *Klebsiella oxytoca* (n=4), *Morganella morganii* (n=2), *Enterobacter asburiae* (n=1), *Proteus mirabilis* (n=1) and *Serratia marcescens* (n=1). The ESBLs detected included enzymes representatives of TEM- (18/81, 22%), SHV- (18/81 22%) and CTX-M-types (38/81, 47%), corresponding to eight different types of ESBLs: TEM (-10, -52, -116), SHV (-12, -64) and CTX-M (-14, -15, -32). The most common ESBLs were CTX-M-15 (35/81, 43%) identified in *E. coli*, and SHV-12 (17/81, 21%) detected in different species.  $bla_{OXA-1}$  and  $bla_{TEM-1}$  were detected in almost all isolates producing CTX-M-15 (20/32, 63%). The presence of the gene  $qepA$  was not detected among *Enterobacteriaceae* producing ESBLs. Co-resistance to non- $\beta$ -lactam antibiotics was frequently observed, mostly to tetracycline (86%), kanamycin (85%), gentamicin (78%), tobramycin (77%), streptomycin (61%), ciprofloxacin (65%) and sulfonamides (59%).

It is concluded that happened an increase in the occurrence and diversity of ESBLs and ESBLs-producing species in the hospital analyzed. CTX-M-15 and SHV-12 were the most frequent ESBL types and *E. coli* was the species most commonly identified as ESBL producer. The spread of clones and plasmids harboring ESBLs and conferring resistance to antibiotics of other groups seems to contribute for this scenario, although more detailed molecular studies should be conducted to confirm their involvement in the current epidemiological situation.

### **Agradecimentos**

Considero que uma Monografia é um produto colectivo, embora a sua redacção, responsabilidade e *stress* sejam predominantemente individuais. Várias foram as pessoas que contribuíram para que este trabalho chegasse a bom termo. A todas elas fica o registo da minha gratidão:

à *Professora Doutora Elisabete Machado*, orientadora deste trabalho, e sem medo de o escrever, agradeço do fundo do meu coração, todo o tempo e compreensão dedicados. Sem si nada disto teria sido igual;

ao *Técnico Ricardo Silva* pelo esforço em me facultar todos os dados laboratoriais necessários ao complemento desta Monografia e pela sua preciosa ajuda em laboratório;

à futura Doutora, *Maria Eduarda Silveira*, amiga e companheira de carteira, pela sua disponibilidade para ouvir todas as minhas preocupações, para me facultar artigos e, por mais uma vez, me acompanhar numa etapa da minha vida;

ao meu *irmão*, por me ter incentivado a mudar de curso. Sem ti não saberia o que era ser Farmacêutica;

aos meus *pais* por tudo terem feito para concretizar este objectivo;

e, finalmente, ao meu futuro marido, *Nuno Ribeiro*, que me transmitiu uma confiança e apoio incomparáveis.

**Muito Obrigada!**

## Índice

<b><u>LISTA DE ABREVIATURAS.....</u></b>	<b><u>13</u></b>
<b><u>I. INTRODUÇÃO .....</u></b>	<b><u>15</u></b>
<b><u>1.1 – A PROBLEMÁTICA DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS .....</u></b>	<b><u>15</u></b>
<b><u>1.2 – A FAMÍLIA <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>.....</u></b>	<b><u>16</u></b>
<b><u>1.3 – MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> ....</u></b>	<b><u>18</u></b>
<b><u>1.3.1 RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS <math>\beta</math>-LACTÂMICOS .....</u></b>	<b><u>18</u></b>
<u>1.3.1.1 BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ALARGADO (ESBLs).....</u>	<u>23</u>
A. <u>TEM E SHV .....</u>	<u>24</u>
B. <u>CTX-M .....</u>	<u>25</u>
<u>1.3.1.2 OUTRAS BETA-LACTAMASES ADQUIRIDAS E CLINICAMENTE RELEVANTES DESCRITAS EM <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> .....</u>	<u>27</u>
<b><u>1.3.2 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS NÃO <math>\beta</math>-LACTÂMICOS .....</u></b>	<b><u>29</u></b>
<b><u>1.4 – EPIDEMIOLOGIA DE <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> PRODUTORAS DE ESBLs E/OU GENES <i>bla</i><sub>ESBL</sub> .....</u></b>	<b><u>30</u></b>
<b><u>1.4.1 EPIDEMIOLOGIA NO MUNDO.....</u></b>	<b><u>30</u></b>
<b><u>1.4.2 EPIDEMIOLOGIA NA EUROPA .....</u></b>	<b><u>32</u></b>
<b><u>1.4.3 EPIDEMIOLOGIA EM PORTUGAL .....</u></b>	<b><u>34</u></b>
<b><u>1.4.4 FACTORES QUE CONTRIBUEM PARA A EMERGÊNCIA, MANUTENÇÃO E DISSEMINAÇÃO DE ESBLs.....</u></b>	<b><u>34</u></b>
<u>1.4.4.1 MECANISMOS DE DISSEMINAÇÃO DE ESBLs EM <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> .....</u>	<u>35</u>
A. <u>DISPERSÃO CLONAL .....</u>	<u>36</u>
B. <u>TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES .....</u>	<u>36</u>
<u>B1. PLASMÍDEOS .....</u>	<u>37</u>
<u>B2. INTEGRÕES .....</u>	<u>38</u>
<u>B3. TRANSPOÇÕES .....</u>	<u>38</u>
<u>B4. BACTERÍOFAGOS .....</u>	<u>39</u>
<b><u>1.5 – RESERVATÓRIOS DE <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> PRODUTORAS DE ESBLs E/OU GENES <i>bla</i><sub>ESBL</sub> .....</u></b>	<b><u>40</u></b>

<b>1.6 – CONTROLO DA DISSEMINAÇÃO DE ESBLs EM ENTEROBACTERIACEAE</b> .....	<b>41</b>
<b>II. OBJECTIVOS</b> .....	<b>43</b>
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
1. <u>ISOLADOS BACTERIANOS</u> .....	44
2. <u>IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA</u> .....	44
3. <u>AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS</u> .....	44
4. <u>DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DE ESBLs</u> .....	45
5. <u>DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENES QUE CODIFICAM PARA ESBLs (<i>bla</i><sub>ESBL</sub>)</u> .....	45
A. <u>EXTRACÇÃO DE DNA BACTERIANO</u> .....	45
B. <u>PCR (Reacção de amplificação em cadeia)</u> .....	45
C. <u>ELECTROFORESE</u> .....	46
D. <u>PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS</u> .....	46
E. <u>SEQUENCIAÇÃO</u> .....	46
<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
1. <u>OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE ESBLs</u> .....	49
2. <u>ENTEROBACTERIACEAE PRODUTORAS DE CTX-M</u> .....	53
3. <u>DISTRIBUIÇÃO DE ESBLs PELAS DIFERENTES ESPÉCIES DE ENTEROBACTERIACEAE</u> .....	53
4. <u>DISTRIBUIÇÃO DE ENTEROBACTERIACEAE PRODUTORAS DE ESBLs PELAS DIFERENTES AMOSTRAS CLÍNICAS</u> .....	56
5. <u>RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS <math>\beta</math>-LACTÂMICOS EM ENTEROBACTERIACEAE PRODUTORAS DE ESBLs</u> .....	57
6. <u>CO-RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS NÃO <math>\beta</math>-LACTÂMICOS</u> .....	58
7. <u>OCORRÊNCIA DO GENE <i>qepA</i> EM ENTEROBACTERIACEAE PRODUTORAS DE ESBLs</u> .....	60
<b>V. CONCLUSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>62</b>
<b>VII. ANEXOS</b> .....	<b>86</b>
ANEXO 1. <u>Marcador de Peso Molecular</u> .....	87
ANEXO 2. <u>POSTER apresentado no 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2009), Helsínquia, Finlândia, 16-19 Maio 2009</u> ...	89

## Índice de Figuras e Gráficos

1.2	<u>Fig. 1.2.1 – A família <i>Enterobacteriaceae</i> .....</u>	<u>16</u>
1.3	<u>Fig.1.3.1 – Mecanismos de resistência aos antibióticos <math>\beta</math>-lactâmicos .....</u>	<u>19</u>
	<u>Fig.1.3.2 – Árvore filogenética representando os seis grupos de beta-lactamases do tipo CTX-M e os níveis de similaridade aminoacídica .....</u>	<u>26</u>
1.4	<u>Fig.1.4.1 – Ocorrência e diversidade de ESBLs do tipo CTX-M em diferentes áreas geográficas .....</u>	<u>31</u>
	<u>Fig.1.4.2 – Distribuição de ESBLs do tipo CTX-M em diferentes áreas geográficas da Europa .....</u>	<u>33</u>
	<u>Fig. 1.4.3 – Emergência e persistência de genes <i>bla</i><sub>ESBLs</sub> em bactérias .....</u>	<u>35</u>
	<u>Fig.1.4.4 – Transferência horizontal da resistência aos antibióticos através de plasmídeos .....</u>	<u>37</u>
	<u>Fig.1.4.5 – Representação esquemática da estrutura de integração e cassete de genes detectados em <i>Vibrio cholerae</i> O1 .....</u>	<u>38</u>
	<u>Fig.1.4.6 – Estrutura de uma sequência de inserção e de um transposão composto .....</u>	<u>39</u>
	<u>Fig.1.4.7 – Mecanismo de transdução.....</u>	<u>40</u>
1.5	<u>Fig.1.5.1 – Vias de transmissão de bactérias resistentes e de genes de resistência a antibióticos .....</u>	<u>41</u>
IV	<u>Gráfico 1 – Ocorrência de diferentes espécies de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs .....</u>	<u>54</u>
	<u>Gráfico 2 – Ocorrência de diferentes espécies de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs no estudo efectuado no período 2002-2004 (Machado <i>et al.</i>, 2007) e no presente trabalho.....</u>	<u>55</u>
	<u>Gráfico 3 – Distribuição de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs pelas diferentes amostras clínicas .....</u>	<u>56</u>
	<u>Gráfico 4 – Resistência aos antibióticos <math>\beta</math>-lactâmicos .....</u>	<u>57</u>
	<u>Gráfico 5 – Co-resistência aos antibióticos não <math>\beta</math>-lactâmicos em <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs .....</u>	<u>59</u>

## **Índice de Tabelas**

<b>1.3</b>	<b><u>Tabela 1 – Esquema de classificação de <math>\beta</math>-lactamases .....</u></b>	<b><u>22</u></b>
<b>III.</b>	<b><u>Tabela 2 – <i>Primers</i> e condições de PCR usados no estudo.....</u></b>	<b><u>48</u></b>
<b>IV.</b>	<b><u>Tabela 3 – Distribuição dos tipos de ESBLs pelas espécies de <i>Enterobacteriaceae</i> incluídas no estudo.....</u></b>	<b><u>50</u></b>

### **Lista de Abreviaturas**

attI – Local de Integração da Cassete Genética

AC – Ácido Clavulânico

al. – *alli*

AMC - Amoxicilina associada ao Ácido Clavulânico

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CMT – Complex Mutant TEM

CS- Conserved Sequences

CTX-M – Cefotaximase

DDST - Double Disc Sinergy Test

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EARSS - The European Antimicrobial Resistance Surveillance System

ESBL – Beta-Lactamase de Espectro Alargado

*E. cloacae* – *Enterobacter cloacae*

*E. coli* – *Escherichia coli*

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

etc. – *et caetera*

EUA – Estados Unidos da América

IR – Sequências de Repetição Invertidas

IRT – Inhibitor Resistant TEM

IS – Sequência de Inserção

ITR – Sequências Terminais de Repetição Invertidas

*K. oxytoca* – *Klebsiella oxytoca*

*K. pneumoniae* – *Klebsiella pneumoniae*

*M. morganii* – *Morganella morganii*

mL – Mililitro

MR- Multiresistentes

ND – Não Determinado

NI – Não Incluído

*P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*

*P. mirabilis* – *Proteus mirabilis*

PBPs - Penicillin Binding Proteins

PCR – Reacção de Amplificação em Cadeia

qac – Gene que codifica para resistência a Compostos de Amônio Quaternário

ROAR - Reservoirs of Antibiotic Resistance

r.p.m. – Rotações Por Minuto

*S. marcescens* – *Serratia marcescens*

SMART - Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends

sul – Gene que codifica para resistência a sulfonamidas

Tn – Transposição

tnp – Transposase

TZB – Tazobactam

UCIs – Unidades de Cuidados Intensivos

UCIP – Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos

µg – Micrograma

µL - Microlitro

UV – Ultravioleta

V – Volt

## **I. INTRODUÇÃO**

### **1.1 A PROBLEMÁTICA DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS**

O universo bacteriano dispõe de vários mecanismos de resistência aos antibióticos. A produção de beta-lactamases constitui um dos aspectos mais marcantes dessa mesma resistência em algumas espécies bacterianas, sobretudo em *Enterobacteriaceae*.

A descoberta da penicilina G por Alexander Fleming, em 1928, criou a falsa expectativa de que as doenças infecciosas teriam finalmente um fim. Contudo, e aquando da introdução das penicilinas no uso clínico, começaram a ser isoladas bactérias produtoras de beta-lactamases, enzimas capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico deste grupo de antibióticos, inactivando-os. À medida que novos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (e de maior espectro de acção) foram sendo sintetizados e introduzidos na prática clínica, foram surgindo também novas beta-lactamases capazes de os hidrolisar (Sousa, 2006). Actualmente, as beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs) representam, sem dúvida, o primordial mecanismo de resistência em *Enterobacteriaceae*, sendo os plasmídeos apontados como os principais responsáveis pela ampla disseminação deste tipo de resistência (Coque *et al.*, 2008). As opções terapêuticas dentro do grupo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos ficam bastante condicionadas, como será referido adiante, e para agravar a situação, muitos desses plasmídeos acumulam ainda genes de resistência a outras famílias de antibióticos.

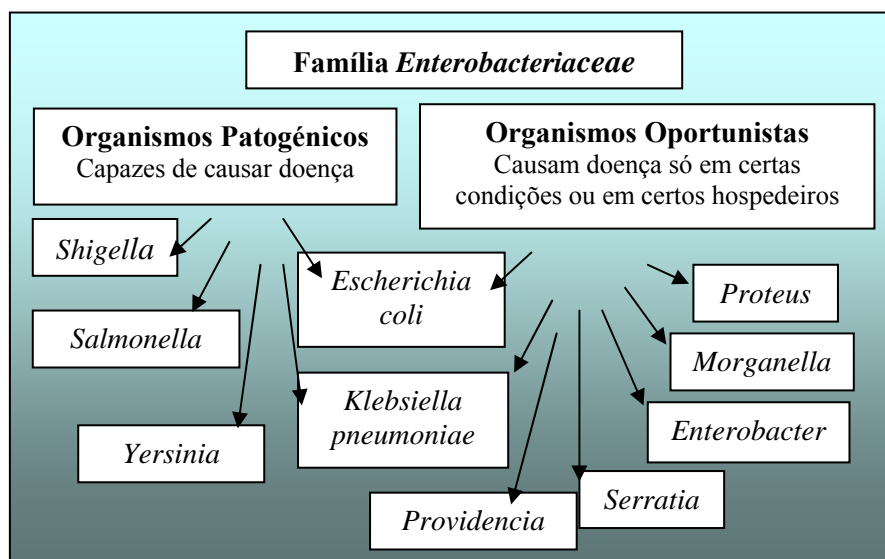
O uso incorrecto, abusivo e indiscriminado de antibióticos em medicina humana e animal, e o seu uso durante algum tempo na agropecuária como promotores de crescimento, tem fomentado o aparecimento e disseminação de bactérias multiresistentes aos antibióticos (Witte, 2000).

O aumento assustador das taxas de resistência bacteriana aos antibióticos a que se assiste na actualidade constitui um grave problema de Saúde Pública. Resta-nos esperar e observar quem ganhará esta guerra: “Bactérias *versus* Antibióticos”.

## **1.2 A FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE**

As *Enterobacteriaceae* constituem a maior e mais heterogênea família de bacilos de Gram negativo clinicamente importantes (Murray *et al.*, 2003). Os membros desta família têm a forma de bacilos e coram de Gram negativo, medindo em média 1 a 5 µm de comprimento (Murray *et al.*, 2003). Todos são anaeróbios facultativos e fermentadores da glucose, sendo a fermentação de outros açúcares variável. Ao contrário da maioria de bactérias similares, as *Enterobacteriaceae* são oxidase negativas (excepção: *Plesiomonas shigelloides*). A maior parte possui ainda flagelos peritricos usados na locomoção (Ferreira *et al.*, 2000).

Os principais gêneros pertencentes a esta família são *Escherichia* sp., *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Morganella* sp., *Yersinia* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp. e *Serratia* spp. Alguns destes gêneros estão sempre associados a doença (por exemplo, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp.), outros pertencem à flora comensal do Homem ou de outros mamíferos e/ou causam infecções oportunistas (por exemplo, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) (Murray *et al.*, 2003) (Figura 1.2.1). Esta família bacteriana apresenta ainda uma distribuição ubiqüitária na Natureza, podendo algumas espécies ser encontradas no solo e em águas (*E. coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp.) (Ferreira *et al.*, 2000; Lösch *et al.*, 2008).



**Fig.1.2.1** – A família *Enterobacteriaceae* (adaptado de *Faculty.irsc.edu.*).

Uma característica importante desta família bacteriana é a sua resistência natural ou adquirida a antibióticos (Ferreira *et al.*, 2000). A maioria das espécies desta família, já por si, possui uma grande variedade de padrões de resistência natural (Livermore, 2003), pelo que a aquisição de outros genes de resistência, provenientes de bactérias da mesma espécie ou de espécies e/ou géneros diferentes, irá complicar o tratamento de infecções por elas provocadas (Murray *et al.*, 2003).

A elevada taxa de resistência aos antibióticos, associada a diversos factores de virulência (produção de toxinas, cápsula, factores de aderência, entre outros), converte as *Enterobacteriaceae* num problema muito relevante em ambiente hospitalar. Esta família de bactérias é responsável por uma grande variedade de infecções nosocomiais, desde infecções urinárias, a pneumonias, infecções do tracto respiratório, do tracto gastrointestinal, septicémias, entre outros (Cornaglia *et al.*, 2008; Pitout *et al.*, 2008). Estudos recentes têm indicado que actualmente *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são as duas espécies desta família que mais frequentemente aparecem associadas a infecções nosocomiais (Cantón *et al.*, 2008; Coque *et al.*, 2008; Falagas *et al.*, 2009). A elevada prevalência de *Enterobacteriaceae* multiresistentes em ambiente hospitalar deve-se principalmente à pressão selectiva exercida pelos antibióticos usados (Perez *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2008). Os  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenems), assim como as fluoroquinolonas, são dos grupos de antibióticos mais usados, e consequentemente mais associados a mecanismos de resistência em *Enterobacteriaceae* (Goossens *et al.*, 2005; Coenen *et al.*, 2006; Vander Stichele *et al.*, 2006; Van de Sande-Bruinsma *et al.*, 2008). Na comunidade, a automedicação e o uso de antibióticos em medicina veterinária e agricultura favorecem também emergência e disseminação de *Enterobacteriaceae* resistentes a antibióticos (Witte, 2000; Schwarz *et al.*, 2001; Goossens *et al.*, 2005; Carattoli, 2008).

Para além de dificultar o tratamento de infecções nosocomiais graves, esta situação poderá conduzir ao surgimento de espécies resistentes a todos os agentes antimicrobianos actualmente disponíveis (Falagas *et al.*, 2009; Zahar *et al.*, 2009). Uma melhor gestão no uso de antibióticos e um maior controlo da infecção e da disseminação de estirpes multiresistentes aos antibióticos são necessários para impedir a propagação de beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs) e de outras formas de resistência em *Enterobacteriaceae* em todo o mundo.

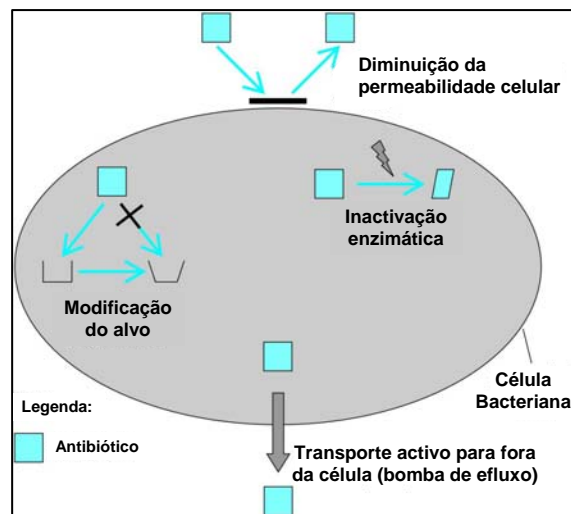
### **1.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM ENTEROBACTERIACEAE**

#### **1.3.1 Resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos**

Os antibióticos do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos constituem opções terapêuticas de primeira linha no tratamento de infecções por *Enterobacteriaceae*, mas a resistência a estes compostos bacteriolíticos tem sido progressivamente relatada nas últimas décadas. Diferentes mecanismos de resistência aos antibióticos desta família têm sido descritos e incluem (Figura 1.3.1):

- Modificação dos alvos, designados de *Penicillin Binding Proteins* (PBPs). As transpeptidases e carboxipeptidases, colectivamente conhecidas por PBPs, são os alvos letais dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Mutações que alterem a estrutura de um ou de vários PBPs podem ocasionar resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. A alteração dos PBPs não assume um elevado significado clínico em *Enterobacteriaceae* (Tomasz, 1986; Livermore, 1987; Poole, 2004);
- Impermeabilização da membrana externa por alterações nos canais de porina. A membrana externa da parede celular das bactérias de Gram negativo constitui uma barreira entre o antibiótico  $\beta$ -lactâmico e os seus alvos letais localizados no folheto externo da membrana citoplasmática. No entanto, o peso molecular e a natureza hidrofílica da maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos permitem o seu movimento para o periplasma através de canais de porina. Alterações na permeabilidade da membrana externa por modificação nos canais de porina têm sido apontadas como responsáveis pela redução da susceptibilidade de algumas *Enterobacteriaceae* aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Sousa, 2006);
- Bombas de efluxo. Algumas espécies da família *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, entre outras) possuem bombas de efluxo com funções fisiológicas (Vila *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2009), algumas delas responsáveis também pela expulsão de antibióticos do periplasma/citoplasma para o meio extracelular (Chevalier *et al.*, 2008; Pagès *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2009). Algumas bombas de efluxo excretam antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, em alguns casos com efeitos pleiotrópicos, devido ao espectro extremamente amplo de substratos, que inclui não só várias classes de antibióticos, mas também antissépticos, corantes e/ou detergentes (Mahamoud *et al.*, 2007).

- Alteração enzimática. A produção de enzimas capazes de hidrolisar antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, designadas de Beta-Lactamases, constitui um dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em *Enterobacteriaceae* (Cantón *et al.*, 2008). Estas enzimas constituem uma família de proteínas com a capacidade de modificar os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos antes destes conseguirem atingir os seus locais-alvo, inactivando assim a sua acção bacteriolítica (Sousa, 2006).



**Fig.1.3.1** – Mecanismos de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos

(adaptado de *The Free Dictionary*, img.tfd.com)

Estes mecanismos de resistência podem surgir quer por *mutações* de genes localizados no cromossoma bacteriano, quer por *aquisição* de genes de resistência aos antibióticos a partir de outros microrganismos por conjugação, transformação e/ou transdução.

Em *Enterobacteriaceae*, a produção de beta-lactamases constitui o mecanismo de resistência mais comum aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Rossolini *et al.*, 2006; Livermore, 2009). Diferentes famílias de beta-lactamases têm sido descritas de acordo com a constituição química do seu local activo, a capacidade hidrolítica sobre os diferentes  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactams, carbapenems) e a sua inactivação por inibidores de beta-lactamases (por exemplo, ácido clavulânico) (Bush *et al.*, 1995; Bush *et al.*, 2010). Ao longo do tempo, vários foram os esquemas

propostos com o objectivo de agrupar de uma forma facilmente compreensível e prática as centenas de beta-lactamases que iam sendo descobertas, embora actualmente apenas dois sejam os mais aceites e utilizados. Inicialmente, começou-se por fazer uma classificação funcional das beta-lactamases. Esta forma de classificar as beta-lactamases teve início quando as cefalosporinas (enzimas com elevada capacidade de hidrólise sobre as cefalosporinas) foram distinguidas das penicilinas (enzimas com boa actividade hidrolítica sobre as penicilinas) (Bush *et al.*, 1995) e foi proposta por Sawai *et al.* (1968). À medida que iam sendo caracterizadas novas beta-lactamases, foram propostos esquemas de classificação cada vez mais complexos: Richmond *et al.* (1973), Sykes *et al.* (1976), Ambler (1980), Mitsuhashi *et al.* (1981) e Bush (1989). Bush (1989) propõe o primeiro esquema de classificação das beta-lactamases que tenta relacionar o perfil hidrolítico sobre diversos substratos e as propriedades inibitórias das enzimas, com a sua estrutura molecular.

Actualmente, as beta-lactamases são geralmente classificadas segundo dois esquemas gerais (Paterson *et al.*, 2005): a classificação molecular de Ambler (Ambler, 1980) e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.*, 1995; Bush, 2001). Mais recentemente, foi feita uma actualização a este último esquema de classificação funcional por Karen Bush e George Jacoby (Bush *et al.*, 2010).

O esquema de Ambler (Ambler, 1980) classifica as beta-lactamases em quatro grandes grupos (A, B, C e D), de acordo com a sua sequência de aminoácidos. As beta-lactamases incluídas nas classes A, C e D são enzimas que contêm serina no seu local activo, enquanto as do grupo B contêm aí um ião zinco, sendo por isso consideradas metalo-beta-lactamases. Na altura em que foi criada esta classificação, apenas quatro sequências aminoacídicas de beta-lactamases eram conhecidas, tendo sido todas elas incluídas na Classe A da classificação de Ambler (Ambler, 1980). Em 1981, Jaurin *et al.* descreve a Classe C, onde passaram a figurar enzimas que também continham serina no local activo, mas com grande actividade hidrolítica sobre cefalosporinas (incluindo as cefamicinas). Já nos finais de 1980 foram descritas algumas beta-lactamases que foram incluídas na classe D desta classificação (enzimas que hidrolisam a oxacilina, mas que foram retiradas da classe A) (Ouellette *et al.*, 1987; Huovinen *et al.*, 1988).

Os esquemas de classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.*, 1995) e Bush-Jacoby (Bush *et al.*, 2010) classificam as beta-lactamases segundo um esquema funcional dos grupos de Ambler. Baseiam-se na similaridade funcional (perfil de substrato e de inibição) das enzimas incluídas em cada grupo da classificação de Ambler. Segundo este tipo de classificação, as beta-lactamases são divididas em quatro grupos principais e vários subgrupos, tal como pode ser observado na Tabela 1:

- i) O grupo 1 corresponde ao grupo das cefalosporinases dos bacilos de Gram negativo, que hidrolisam todos os  $\beta$ -lactâmicos excepto os carbapenemos, e que não são inibidas pelo ácido clavulânico. As enzimas deste grupo, caracterizadas a nível molecular, pertencem à classe C de Ambler (beta-lactamases do tipo serina).
- ii) O grupo 2 inclui diferentes tipos de beta-lactamases inibidas pelo ácido clavulânico e que fazem parte da classificação molecular A e D de Ambler. Este grupo compreende uma grande variedade de enzimas que se dispõem em vários subgrupos de acordo com o seu perfil de substratos (penicilinases, cefalosporinases, oxacilinases e carbapenemases). As Beta-Lactamases de Espectro Alargado (ESBLs) estão incluídas neste grupo.
- iii) O grupo 3 inclui as metalo-enzimas, enzimas que contêm um ião zinco no local activo e que são capazes de hidrolisar os carbapenemos. Ao contrário de outras carbapenemases incluídas noutros grupos, as metalo-carbapenemases não são inibidas pelos inibidores de beta-lactamases (ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam) e não hidrolisam os monobactamos. Fazem parte da classe B de Ambler.
- iv) O grupo 4 compreende as penicilinases não inibidas pelo ácido clavulânico, as quais não são vulgarmente encontradas e do ponto de vista molecular estão pouco definidas.

**Tabela 1** – Esquema de classificação de beta-lactamases (adaptado de Bush *et al.*, 2010).

Bush-Jacoby (2010)	Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Ambler	Substratos	Inibição por:		Algumas enzimas representativas
				AC ou TZB <sup>a</sup>	EDTA <sup>b</sup>	
1	1	C	Cefalosporinas	-	-	AmpC de bactérias de Gram negativo;
1e	NI <sup>c</sup>	C	Cefalosporinas	-	-	CMY-2; DHA-1
2a	2a	A	Penicilinas	+	-	Penicilinas de bactérias de Gram positivo; PC1
2b	2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas	+	-	TEM-1; TEM-2; SHV-1
2be	2be	A	Penicilinas, Cefalosporinas de largo espectro, Monobactamos	+	-	TEM-3 a TEM-178; SHV-2 a SHV-131; <i>K. oxytoca</i> K1; PER-1; VEB-1; CTX-M-1 a CTX-M-93
2br	2br	A	Penicilinas	±	-	TEM-30 a TEM-36; TEM-38 a TEM-40; TEM-44; TEM-59; TEM-65; SHV-10
2ber	NI <sup>c</sup>	A	Cefalosporinas de largo espectro, Monobactamos	-	-	TEM-50 (CMT-1)
2c	2c	A	Penicilinas, Carbenicilina	+	-	PSE-1; CARB-3
2ce	NI <sup>c</sup>	A	Carbenicilina, Cefepime	+	-	RTG-4 (CARB-10)
2d	2d	D	Cloxacilina	±	-	OXA-1 a OXA-10 (PSE-2)
2de	NI <sup>c</sup>	D	Cefalosporinas de largo espectro	±	-	OXA-11; OXA-15
2df	NI <sup>c</sup>	D	Carbapenemos	±	-	OXA-23; OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de largo espectro	+	-	Cefalosporinas induzidas de <i>Proteus vulgaris</i> ; Cep-A
2f	2f	A	Carbapenemos	±	-	NMC-A de <i>Enterobacter cloacae</i> , SME-1 de <i>Serratia marcescens</i> , KPC-1; GES-2
3a	3	B (B1)	Carbapenemos	-	+	IMP-1; VIM-1; CcrA
3b	3	B (B3)	Carbapenemos	-	+	L1; CAU-1; GOB-1
NI <sup>c</sup>	4	B (B2)	Carbapenemos	-	+	CphA; Sfh-1
NI <sup>c</sup>	4	ND <sup>d</sup>	Penicilinas	-	?	Penicilinase de <i>Burkholderia cepacia</i>

<sup>a</sup>AC, ácido clavulânico; TZB, tazobactam; <sup>b</sup>EDTA, ácido etilenodiaminotetracético. <sup>c</sup>NI, não incluído. <sup>d</sup>ND, não determinado.

### 1.3.1.1 Beta-Lactamases de Espectro Alargado (ESBLs)

Apesar de todos os grupos de beta-lactamases já terem sido descritos em *Enterobacteriaceae*, as beta-lactamases de espectro alargado são as mais frequentemente encontradas nesta família. A primeira beta-lactamase de espectro alargado foi identificada numa *Enterobacteriaceae* isolada na Alemanha, em 1983, poucos anos depois da introdução das cefalosporinas de largo espectro na prática clínica (Knothe *et al.*, 1983; Drieux *et al.*, 2008). Desde essa altura, a incidência de beta-lactamases de espectro alargado tem vindo a aumentar em todo o mundo, sendo frequentemente descritas em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Cantón *et al.*, 2006; Livermore *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2008), mas também noutras espécies de *Enterobacteriaceae* (Coudron *et al.*, 1997; Perilli *et al.*, 1997; Pitout *et al.*, 1998). Mais recentemente, as ESBLs têm sido descritas em outras famílias de bactérias, como por exemplo *Pseudomonadaceae* e *Aeromonadaceae* (Marchandin *et al.*, 2003; Fosse *et al.*, 2004; David *et al.*, 2008; Woodford *et al.*, 2008). Estas enzimas têm uma grande importância a nível clínico, uma vez que conferem resistência bacteriana a penicilinas, cefalosporinas (excepto cefamicinas) e monobactams, por hidrólise destes antibióticos, e são inactivadas por inibidores de beta-lactamases, tais como o ácido clavulânico, tazobactam ou sulbactam (Drieux *et al.*, 2008). Apenas os carbapenems são estáveis às ESBLs (Cornaglia *et al.*, 2008). É recomendável reportar as *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs como resistentes a todos os antibióticos deste grupo (excepto aos carbapenems), mesmo quando as estirpes são susceptíveis *in vitro* a algum deles, devido ao risco de insucesso no tratamento (Paterson *et al.*, 2001; Paterson *et al.*, 2005, <http://www.sfm.asso.fr/>). A introdução na prática clínica de cefalosporinas de largo espectro constituiu o maior factor de selecção para a emergência e disseminação das ESBLs (Rossolini *et al.*, 2008), embora outros factores também tenham um papel essencial, como será discutido mais adiante.

As ESBLs são classificadas em diferentes tipos de acordo com a sua sequência de aminoácidos e a sua actividade hidrolítica sobre diversos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Bush *et al.*, 1995; <http://www.lahey.org/studies/temtable.htm>). Os tipos de ESBL mais frequentes são o TEM, SHV e CTX-M, mas outras variantes são também frequentemente encontradas em *Enterobacteriaceae*, como as enzimas do tipo PER, GES ou VEB (Poirel *et al.*, 1999; Bonnet, 2004; Jacoby *et al.*, 2005; Paterson *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2007; Libisch *et al.*, 2008; Zong *et al.*, 2009). A nomenclatura,

assim como algumas características das ESBLs, encontram-se detalhadas no *site* dedicado às ESBLs, criado por George Jacoby e Karen Bush (<http://www.lahey.org./studies/temtable.htm>). A sua denominação tem sido, contudo, anárquica, sendo designadas de acordo com o nome do doente em que foram detectadas (por exemplo, TEM, de *Temoniera*), o seu substrato (por exemplo, OXA, de actividade hidrolítica sobre a *oxacilina*), as suas propriedades bioquímicas (por exemplo, CTX-M devido à maior capacidade de hidrólise sobre a *cefotaxima*), entre outros.

#### A. TEM e SHV

As ESBLs do tipo TEM e SHV têm sido tradicionalmente consideradas como as mais disseminadas (Tzouveleakis, 1999; Bradford *et al.*, 2001, Paterson *et al.*, 2005). A designação de TEM deriva do nome da paciente (*Temoniera*) a partir da qual foi obtido o primeiro isolado de *E. coli* produtor destas enzimas (Atenas, 1965) (Datta *et al.*, 1965), estando o nome SHV relacionado com as propriedades bioquímicas destas enzimas (**S**ulph**H**ydryl **V**ariable). As primeiras enzimas do tipo TEM e SHV a serem descritas foram TEM-1, TEM-2 e SHV-1, nenhuma considerada ESBL devido ao facto de não exibirem actividade hidrolítica sobre cefalosporinas de largo espectro. TEM-1 e TEM-2 possuem o mesmo perfil hidrolítico, diferindo apenas no promotor (mais activo em TEM-2) e no ponto isoeléctrico (5.6 e 5.4, respectivamente) (Livermore, 1995). SHV-1 encontra-se actualmente presente em mais de 90% dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* (Bradford, 2001). As ESBLs do tipo TEM e SHV derivam destas beta-lactamases por mutações pontuais em genes que afectam o seu centro activo e consequentemente aumentam o seu espectro hidrolítico (Paterson *et al.*, 2005).

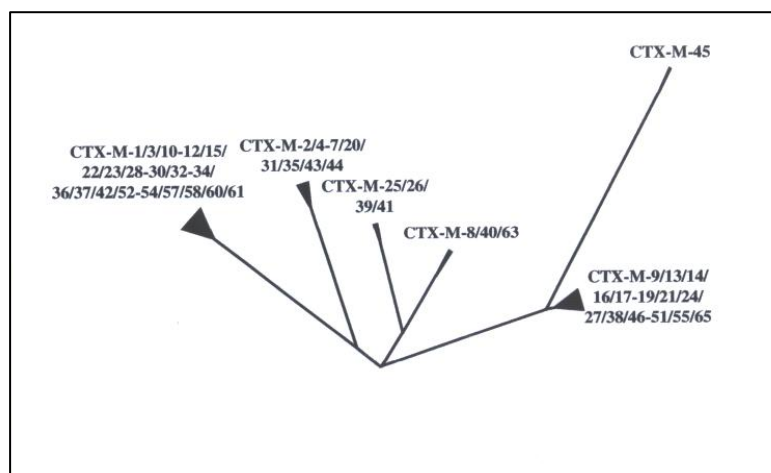
A primeira descrição de uma ESBL do tipo TEM ocorreu em 1988, quando foi descrita uma TEM-3 num isolado de *K. pneumoniae* detectado em França (Sougakoff *et al.*, 1988). Contudo, TEM-3 poderá não ter sido a primeira ESBL do tipo TEM a ser descoberta, uma vez que em 1982, em Inglaterra, foi obtido um plasmídeo de *Klebsiella oxytoca* contendo um gene *bla* codificando para uma enzima com elevada actividade hidrolítica sobre a ceftazidima, denominada de TEM-12 (DuBois *et al.*, 1995). A primeira descoberta de uma ESBL do tipo SHV (SHV-2) ocorreu em 1983, na Alemanha, numa *Klebsiella ozaenae*.

Actualmente, são conhecidas mais de 170 ESBLs do tipo TEM. Como a maioria degrada mais eficazmente a ceftazidima, são também conhecidas por ceftazidimases (Sousa, 2006). Os seus pontos isoeléctricos variam normalmente entre 5.2 e 6.5. As diferenças na sequência de aminoácidos entre elas podem ser encontradas em <http://www.lahey.org/studies/temtable.htm>. É importante referir que, embora a maioria das enzimas do tipo TEM sejam consideradas ESBLs, algumas variantes têm reduzida afinidade para os inibidores de beta-lactamases (IRT - Inhibitor-Resistant TEM) (Chaibi *et al.*, 1999) e/ou actividade hidrolítica quase nula sobre cefalosporinas de largo espectro (CMT - Complex Mutant TEM), não sendo por isso consideradas ESBLs (Robin *et al.*, 2006). No caso das ESBLs do tipo SHV, o número de variantes é também já muito elevado, estando descritas cerca de 130 variantes alélicas.

### B. CTX-M

O aumento dramático de ESBLs que se tem verificado sobretudo na última década deve-se em parte à emergência e disseminação de enzimas do tipo CTX-M (Cantón *et al.*, 2006). Estas enzimas foram inicialmente designadas de CTX-M (CefoTaXiMases) devido à sua maior actividade sobre a cefotaxima, em comparação com a ceftazidima. Isto era verdade para a primeira enzima a ser descrita e para algumas outras que foram posteriormente descobertas (Walther-Rasmussen *et al.*, 2004). Contudo, actualmente existem diversas enzimas do tipo CTX-M que hidrolisam também eficazmente a ceftazidima (Bonnet, 2004; Soderblom *et al.*, 2007). É exemplo disso a CTX-M-15, actualmente a ESBL do tipo CTX-M mais disseminada pelo mundo (Cantón *et al.*, 2006; Lartigue *et al.*, 2007; Naseer *et al.*, 2007).

A primeira enzima do tipo CTX-M a ser descrita foi a CTX-M-1, isolada na Alemanha no final dos anos 80 (Bauernfeind *et al.*, 1989). A partir desta altura várias foram as enzimas do tipo CTX-M a serem descritas. Actualmente existem já mais de 90 variantes alélicas agregadas em cinco grupos, denominados CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25, com base na sua sequência de aminoácidos (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>). Há autores que agrupam as CTX-Ms em 6 e não em 5 grupos, por inclusão da CTX-M-45 (Rossolini *et al.*, 2008) (Fig.1.3.2).



**Fig.1.3.2** - Árvore filogenética representando os seis grupos de beta-lactamases do tipo CTX-M e os níveis de similaridade aminoacídica (adaptado de Rossolini *et al.*, 2008).

O comprimento das ramificações é proporcional ao número de alterações aminoacídicas. Foi construída com o programa TREEVIEW (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>), através do alinhamento múltiplo das sequências de CTX-M publicadas (<http://lahey.org/Studies/>). A divergência entre as sequências aminoacídicas dos diferentes grupos varia entre 9.3% e 32% (não considerando a enzima mais divergente, CTX-M-45), sendo  $\leq 3.5\%$  dentro de cada grupo. CTX-M-14 é idêntica à CTX-M-18, sendo que apenas a antiga é referida. CTX-M-44 corresponde à Toho-1, CTX-M-45 corresponde à Toho-2, CTX-M-15 corresponde à UOE-1 e CTX-M-14 corresponde à Toho-3.

As beta-lactamases do tipo CTX-M estão estreitamente relacionadas com as beta-lactamases que existem no cromossoma de *Kluyvera* sp. (Paterson *et al.*, 2005). Diversos estudos apontam para uma origem a partir destas bactérias, largamente disseminadas no ambiente (Cantón *et al.*, 2006; Livermore *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2008; Rossolini *et al.*, 2008). Por exemplo, *Kluyvera georgiana* contém uma beta-lactamase cromossômica, KLUG-1, que partilha 99% de identidade aminoacídica com CTX-M-8 e CTX-M-9 (Humeniuk *et al.*, 2002; Poirel *et al.*, 2002). Precusores de genes que codificam para enzimas do tipo CTX-M-1 e CTX-M-2 também foram detectados em estirpes de *Kluyvera ascorbata* (Bonnet, 2004; Cantón *et al.*, 2006). A confirmar esta possível origem, está o facto das beta-lactamases do tipo CTX-M terem menos de 40% de identidade com as ESBLs do tipo TEM ou SHV, o que sugere uma origem diferente para estas enzimas (Paterson *et al.*, 2005). Recombinações mediadas por ISCR1, ISEcp1 ou por elementos genéticos relacionados com fagos parecem ser os responsáveis pela mobilização destes genes para outras espécies de *Enterobacteriaceae* (Bonnet, 2004; Oliver *et al.*, 2001; Toleman *et al.*, 2006; Lartigue *et al.*, 2004).

### **1.3.1.2 Outras beta-lactamases adquiridas e clinicamente relevantes descritas em *Enterobacteriaceae***

Outras beta-lactamases adquiridas pertencentes à classe A da classificação de Ambler, assim como beta-lactamases de classe B (carbapenemases), C (AmpC cromossômicas/plasmídicas) ou D (oxacilinas) têm também relevância clínica em *Enterobacteriaceae* (Cantón *et al.*, 2003).

Outras beta-lactamases de classe A. Para além de beta-lactamases do tipo TEM, SHV ou CTX-M, têm também sido descritas em *Enterobacteriaceae* de diferentes regiões geográficas, embora com menos frequência, beta-lactamases de classe A do tipo PER, VEB, TLA, GES, BES e SFO (Sousa 2006).

Carbapenemases. Estas beta-lactamases são assim designadas por hidrolisarem significativamente o imipenemo e/ou outros carbapenemos (para além de penicilinas e cefalosporinas) (Nordmann *et al.*, 2002). As carbapenemases são distribuídas por três das quatro classes moleculares de Ambler, de acordo com a composição do seu centro activo e as suas propriedades hidrolíticas sobre  $\beta$ -lactâmicos e inibidores de beta-lactamases: classes A e D, e classe B (metalo-carbapenemases). O perfil hidrolítico destas enzimas pode ser consultado na Tabela 1 (Bush *et al.*, 2010). Até à data, apenas as carbapenemases de classe A e B foram descritas em *Enterobacteriaceae* (Bush *et al.*, 2010). A prevalência de metalo-carbapenemases transferíveis, sobretudo do tipo IMP e VIM, tem vindo a aumentar (Queenan *et al.*, 2007), o mesmo acontecendo para carbapenemases de Classe A transferíveis (por exemplo, KPC-1) (Yigit *et al.*, 2001; Walther-Rasmussen *et al.*, 2007).

Oxacilinas (beta-lactamases de classe D segundo a classificação de Ambler). A sua designação deriva do facto de serem enzimas com uma elevada actividade hidrolítica sobre a oxacilina e cloxacilina (Sousa, 2006). Foram originalmente descobertas em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, na Turquia (Huovinen *et al.*, 1988), onde ocorrem predominantemente, embora também tenham sido detectadas em outras bactérias de Gram negativo, sobretudo em *Acinetobacter baumannii*. Em *Enterobacteriaceae* são raramente descritas (Bradford, 2001; Brown *et al.*, 2006). A maioria das beta-lactamases do tipo OXA não hidrolisa as cefalosporinas de largo

espectro em grau significativo, sendo também pouco inibidas pelo ácido clavulânico (Tabela 1), daí não serem designadas de ESBLs. Contudo, algumas variantes OXA têm capacidade de hidrolisar fracamente a cefotaxima, a ceftazidima e o aztreonamo (por exemplo, OXA-1) ou os carbapenemos (por exemplo, OXA-50), levando a que a maior parte das bactérias que as expressa tenha uma reduzida susceptibilidade a estes antibióticos, pelo que alguns autores consideram essas variantes OXA como ESBLs ou carbapenemases, respectivamente (Paterson *et al.*, 2005).

Beta-lactamases do tipo AmpC (beta-lactamases de classe C segundo a classificação de Ambler). Têm sido tradicionalmente consideradas enzimas indutíveis e de localização cromossómica, presentes em espécies específicas de certos géneros de *Enterobacteriaceae* (por exemplo, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Serratia* spp.) e também de outras famílias bacterianas (por exemplo, *P. aeruginosa*) (Hanson *et al.*, 1999; Philippon *et al.*, 2002). Em algumas espécies (*Escherichia coli*, *Shigella* spp.) o gene que codifica para este tipo de enzimas (*bla*<sub>AmpC</sub>) não é indutível e a sua expressão é baixa, fazendo com que essas bactérias produzam constitutivamente níveis residuais de enzima (Honoré *et al.*, 1986; Pérez-Pérez *et al.*, 2002; Jacoby, 2009). Nos últimos anos, têm vindo a ser identificadas cada vez com mais frequência beta-lactamases do tipo AmpC plasmídicas em diferentes espécies de *Enterobacteriaceae*, sobretudo em *E. coli* e *K. pneumoniae* (por exemplo, enzimas do tipo CMY, DHA, FOX, LAT) (Philippon *et al.*, 2002; Jacoby, 2009). Estas enzimas parecem derivar de genes *bla*<sub>AmpC</sub> cromossómicos de outros membros da família *Enterobacteriaceae* que os possuem naturalmente, e a sua mobilização parece ocorrer por recombinação genética mediada por sequências de inserção (Pérez-Pérez *et al.*, 2002; Jacoby, 2009). A sua expressão não é inibida pelos inibidores de beta-lactamases e resulta numa hidrólise mais eficiente das penicilinas e cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, incluindo as cefamicinas (cefexitina, cefotetan) (Livermore, 1995).

### **1.3.2 Resistência a antibióticos não $\beta$ -lactâmicos**

É bastante comum, as *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs albergarem genes de resistência a diferentes famílias de antibióticos, para além dos  $\beta$ -lactâmicos, tais como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, trimetoprim e sulfonamidas, entre outras (Cornaglia *et al.*, 2008). Estes isolados bacterianos multiresistentes (MR), apesar de persistirem sobretudo no meio hospitalar, podem também ser encontrados na comunidade (Cantón *et al.*, 2003; Morosini *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2007; Coque *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2008). Na maioria dos casos, esta multiresistência está relacionada com o facto dos genes que codificam para a resistência a antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos se encontrarem no mesmo elemento genético móvel (plasmídeo, transposição) que alberga os genes *bla*<sub>ESBL</sub> (Cantón *et al.*, 2003). Por exemplo, genes que codificam para ESBLs específicas (*bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, entre outras) encontram-se frequentemente em integrões de localização plasmídica, juntamente com cassetes de genes responsáveis pela resistência a aminoglicosídeos (*aadA*, *aadB*, *aacA*, *strA*, *armA*), trimetoprim (*dfr*), cloranfenicol (*cml*, *cat*), sulfonamidas (*sul1*, *sul2*, *sul3*), e mesmo a  $\beta$ -lactâmicos (*bla*<sub>OXA</sub>). A presença de *bla*<sub>ESBL</sub> específicos tem sido também descrita em transposões (por exemplo, *bla*<sub>CTX-M-9</sub> e *bla*<sub>TEM-24</sub> em *Tn21*) (Novais *et al.*, 2006; Novais *et al.*, 2010).

É de destacar o aumento da resistência às quinolonas, mediada por plasmídeos, em *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs, sobretudo em *K. pneumoniae* e *E. coli* (Lautenbach *et al.*, 2001; Mammeri *et al.*, 2005; Cantón *et al.*, 2008; Coque *et al.*, 2008). Neste caso, a diminuição da actividade das quinolonas pode relacionar-se com:

- a produção de proteínas *Qnr*, codificada por genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* ou *qnrS* (Robicsek *et al.*, 2006; Cattoir *et al.*, 2009). Estas proteínas interagem com a girase e topoisomerase IV do DNA, impedindo a ligação da quinolona ao alvo. Protegem assim estes locais da acção inibidora das quinolonas (Sousa, 2006). Conferem resistência ao ácido nalidíxico e susceptibilidade reduzida a fluoroquinolonas (Nordmann *et al.*, 2005). Os genes *qnr*, na sua maioria, encontram-se associados a enzimas dos grupos CTX-M-9 ou CTX-M-1, reflectindo o facto de que genes que codificam para a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e quinolonas estão frequentemente localizados no mesmo plasmídeo (Jones *et al.*, 2008);

- a produção de *acetilases* que podem afectar a actividade de certas fluoroquinolonas, como é o caso de AAC(6')-Ib-cr, codificada pelo gene *aac(6')-Ib-cr*, muito associado a isolados produtores de ESBLs do tipo CTX-M-15 (Cantón *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2006). Esta enzima tem actividade sobre a ciprofloxacina e a norfloxacina, inactivando também aminoglicosídeos (Robicsek *et al.*, 2006);
- a aquisição de genes que codificam para *sistemas de efluxo* de fluoroquinolonas (*qepA*, *oqxAB*) (Strahilevitz *et al.*, 2009). Os transportadores de membrana envolvidos nestes sistemas de exportação activa, podem ser específicos de uma classe de antibióticos ou responsáveis pela resistência a múltiplos fármacos.

#### **1.4 EPIDEMIOLOGIA DE ENTEROBACTERIACEAE PRODUTORAS DE ESBLs e/ou GENES *bla*<sub>ESBL</sub>**

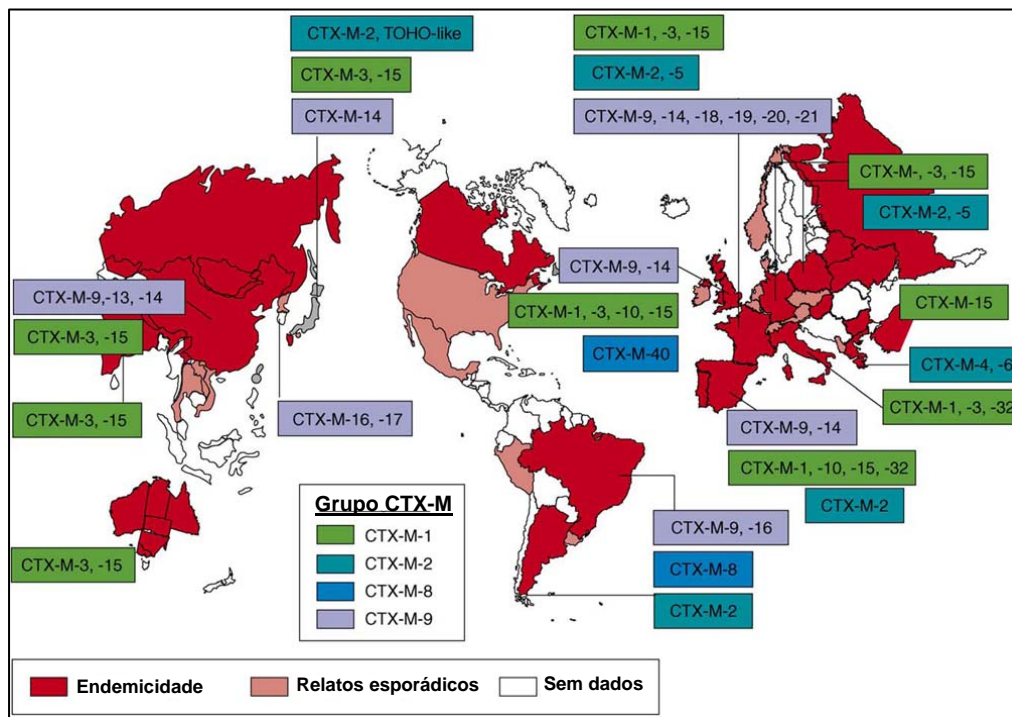
##### **1.4.1 Epidemiologia no Mundo**

Durante os anos de 1990, as ESBLs do tipo TEM e SHV foram as enzimas mais prevalentes em todo o mundo, sendo raramente descritas *Enterobacteriaceae* produtoras de enzimas do tipo CTX-M (Cantón *et al.*, 2006). Por essa altura, a disseminação das ESBLs do tipo TEM e do tipo SHV ocorria maioritariamente através de clones epidémicos, constituindo a bactéria *K. pneumoniae* o principal reservatório de genes *bla*<sub>ESBL</sub> e um paradigma na disseminação nosocomial (Paterson *et al.*, 2005). Os isolados produtores de ESBLs eram fundamentalmente associados a infecções nosocomiais, especialmente em Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs), sendo pouco usual estarem associados a infecções adquiridas na comunidade (Cantón *et al.*, 2008). Actualmente, as ESBLs do tipo TEM e SHV encontram-se por isso largamente distribuídas por todo o mundo, sendo descritas em diversas espécies de *Enterobacteriaceae*, maioritariamente em isolados de *K. pneumoniae* obtidos de pacientes de UCIs de hospitais (Cantón *et al.*, 2008).

Estes padrões foram, contudo, recentemente modificados de forma dramática. ESBLs do tipo CTX-M têm vindo a substituir as variantes do tipo TEM e SHV, e a principal bactéria associada à produção de ESBLs passou a ser a *E. coli* (Cantón *et al.*, 2008). A maioria dos isolados produtores de ESBLs do tipo CTX-M são agora obtidos de

pacientes da comunidade, muitos deles com infecções urinárias, e o número de isolados produtores de ESBLs aumentou também em serviços hospitalares não relacionados com UCIs (Pitout *et al.*, 2004; Ben-Ami *et al.*, 2006; Rodriguez-Baño *et al.*, 2006; Cantón *et al.*, 2008).

A Figura 1.4.1 apresenta a corrente situação da ocorrência e diversidade de ESBLs do tipo CTX-M em diferentes áreas geográficas. Verifica-se uma situação epidémica dominante na maior parte dos países Europeus, na Ásia e na América do Sul. Nos Estados Unidos da América (EUA) são reportados casos esporádicos de isolados produtores de CTX-Ms (Paterson *et al.*, 2005).



**Fig.1.4.1.** – Ocorrência e diversidade de ESBLs do tipo CTX-M em diferentes áreas geográficas (adaptado de Cantón *et al.*, 2006).

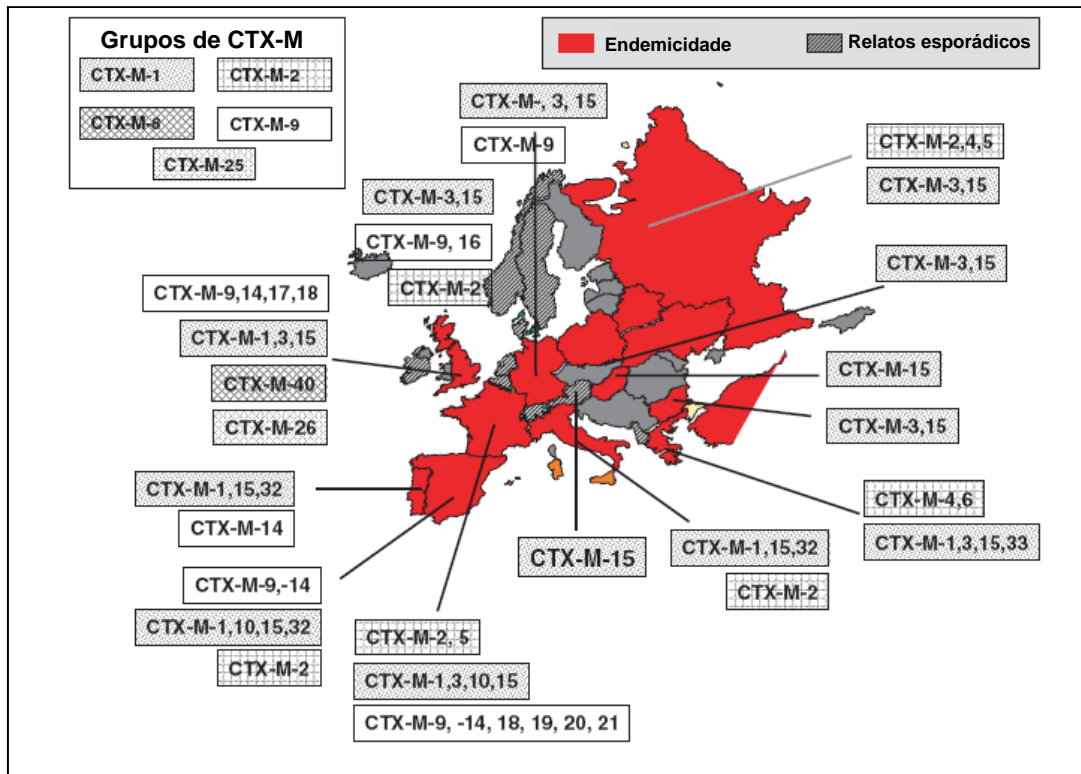
Algumas variantes de enzimas CTX-M estão associadas a países específicos, como é o caso de CTX-M-9 e CTX-M-14 que constituem os tipos mais prevalentes em Espanha (Valverde *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 2005; Novais *et al.*, 2006), CTX-M-1 em Itália (Brigante *et al.*, 2005), e CTX-M-2 na maior parte dos países da América do Sul, Japão e Israel (Bonnet *et al.*, 2004; Ben-Ami *et al.*, 2006). Contudo, certas CTX-Ms, como a CTX-M-15, têm sido detectadas em todo o mundo (Machado *et al.*, 2006; Cantón *et al.*,

2006; Coque *et al.*, 2008; Lewis *et al.*, 2007; Dedeic-Ljubovic *et al.*, 2009; Mshana *et al.*, 2009; Ruppé *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009). Ainda não se conhece uma explicação para o sucesso da pandemia desta enzima, embora se pense que a sua associação a clones de *E. coli* pertencentes ao grupo filogenético B2 (de elevada virulência) e a plasmídeos contendo os genes *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> e *aac(6')-Ib-cr* sejam factores importantes (Cantón *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2006).

#### **1.4.2 Epidemiologia na Europa**

Estudos de vigilância da evolução da resistência aos antibióticos, como o SMART (*Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*), revelaram que as *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs são menos frequentes na Europa do que na América Latina, Ásia e regiões do Pacífico (Coque *et al.*, 2008). Contudo, o mesmo não se passa quando se compara com a América do Norte, onde os organismos produtores de ESBLs são muito menos comuns (Cantón *et al.*, 2008).

O cenário epidemiológico presente inclui um aumento no número de diferentes enzimas do tipo CTX-M e o reconhecimento de múltiplos clones e elementos genéticos que transportam genes *bla*<sub>CTX-M</sub> (Cantón *et al.*, 2008). A rápida disseminação destas enzimas na Europa só é comparável à disseminação de beta-lactamases do tipo TEM nos anos de 1970 (Cantón *et al.*, 2008). Contudo, podem ser observadas diferenças importantes no tipo de CTX-M prevalentes nos diversos países Europeus, como ilustrado na Fig. 1.4.2. Enquanto as ESBLs do grupo CTX-M-1 (por exemplo CTX-M-1, CTX-M-15 e CTX-M-32) predominam em quase todos os países Europeus (Cantón *et al.*, 2008), CTX-M-3 e CTX-M-2 têm sido descritas sobretudo na Europa Oriental (Edelstein *et al.*, 2003; Chmelnitsky *et al.*, 2005; Livermore *et al.*, 2007).



**Fig.1.4.2.** Distribuição de ESBLs do tipo CTX-M em diferentes áreas geográficas da Europa (adaptado de Cantón *et al.*, 2008).

Algumas ESBLs do tipo TEM e SHV têm também vindo a suscitar um interesse renovado na comunidade científica devido a uma ampla e rápida disseminação pela Europa nos últimos anos. É o caso de TEM-4, TEM-24, TEM-52, SHV-5 e SHV-12 (Machado *et al.*, 2007; Markovska *et al.*, 2008; Cantón *et al.*, 2008; Novais *et al.*, 2010). No caso da TEM-24, a sua disseminação pela Europa está relacionada com a confluência de clones de *Enterobacteriaceae*, em especial de *Enterobacter aerogenes*, e um plasmídeo Inc<sub>A/C2</sub>, altamente transmissível (Cantón *et al.*, 2002; Lavigne *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2007; Biendo *et al.*, 2008; Novais *et al.*, 2010). A emergência de novas variantes ESBLs do tipo TEM e SHV continua também a ser observada em diversos países Europeus, como França, Itália, Espanha, Bélgica e Portugal (Machado *et al.*, 2007).

A principal razão que se aponta para o aumento generalizado na Europa de certas ESBLs pertencentes ao grupo TEM (TEM-4, TEM-24 e TEM-52) (Cloeckaert *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2008; Galas *et al.*, 2008), SHV (SHV-5 e SHV-12) (Damjanova *et al.*, 2007; Carrer *et al.*, 2008; Markovska *et al.*, 2008) e CTX-M (CTX-M-9, CTX-M-3,

CTX-M-14 ou CTX-M-15) (Cantón *et al.*, 2008), é a disseminação de clones específicos (ou grupos de clones) e de plasmídeos epidémicos, tanto nos hospitais como na comunidade (animais, humanos saudáveis, ambiente) (Coque *et al.*, 2008).

### **1.4.3 Epidemiologia em Portugal**

Portugal é um dos países Europeus com uma das taxas mais elevadas de ESBLs (Bouchillon *et al.*, 2004). Segundo os estudos que se encontram disponíveis, a prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs tem aumentado ao longo do tempo, com um domínio crescente de isolados de *E. coli* produtores de CTX-M (Machado *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2009; Guimarães *et al.*, 2009). Outros factos revelados por estudos individuais, sobretudo a nível hospitalar, reflectem também uma disseminação comum de CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-32, TEM-24, TEM-52, SHV-12 e GES-1 (Machado *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2007).

É de notar que a maioria dos estudos disponíveis apenas se refere ao aparecimento de tipos particulares de ESBLs, à dispersão de clones específicos produtores de ESBLs ou à ocorrência de ESBLs em hospitais específicos e durante curtos períodos de tempo (Brízio *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2006; Mendonça *et al.*, 2007; Coque *et al.*, 2008). Deveria ser realizado um esforço conjunto no sentido de se averiguar a prevalência e melhor compreender a epidemiologia de *Enterobacteriaceae* produtoras de diferentes tipos de ESBLs em Portugal, quer de origem hospitalar, quer extra-hospitalar, tal como tem sido praticado noutros países Europeus.

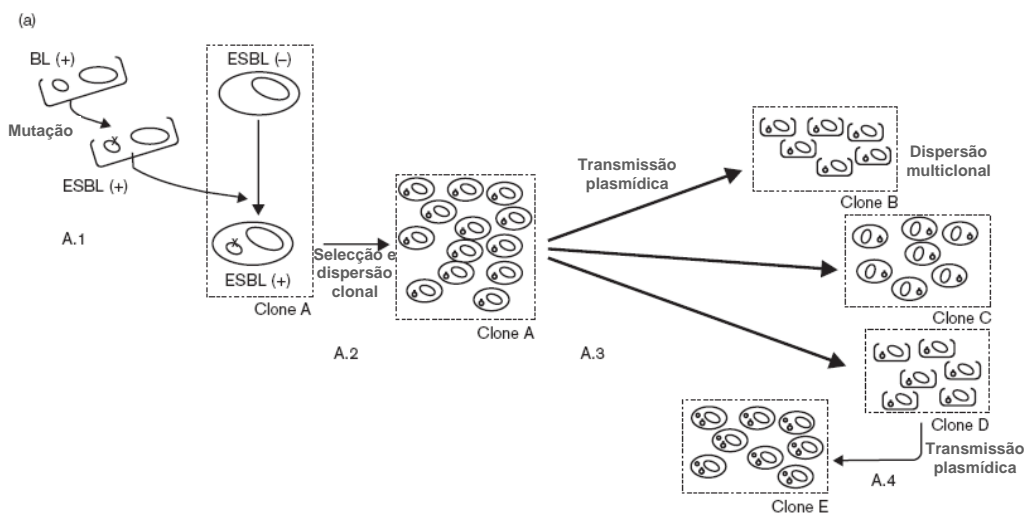
### **1.4.4 Factores que contribuem para a emergência, manutenção e disseminação de ESBLs**

Actualmente a epidemiologia das ESBLs é bastante complexa, pois vários são os factores envolvidos na disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e/ou de genes *bla*<sub>ESBL</sub>. Um uso abusivo de antibióticos em humanos e animais, as infecções cruzadas a nível hospitalar, a mobilidade de pacientes entre instituições de saúde, a cadeia alimentar, o comércio e a migração humana, parecem ter contribuído de algum modo para a rápida disseminação de ESBLs (Coque *et al.*, 2008). Diversos mecanismos

de disseminação têm também cooperado para a sua ampla dispersão em *Enterobacteriaceae* (Cantón *et al.*, 2003), apesar da influência de cada um deles ser variável e associada à epidemiologia local (Coque *et al.*, 2008).

#### 1.4.4.1 Mecanismos de disseminação de ESBLs em *Enterobacteriaceae*

Os principais mecanismos de disseminação de ESBLs envolvem a disseminação de estirpes bacterianas específicas (dispersão clonal) e/ou plasmídeos, transposões ou integrões particulares albergando genes  $bla_{ESBL}$  (transferência horizontal de genes) (Cantón *et al.*, 2003). Em alguns casos está ainda documentado o envolvimento de bacteriófagos na transferência horizontal de genes entre bactérias (Martínez *et al.*, 2002; Oliver *et al.*, 2005). Contudo, este cenário epidemiológico está a tornar-se cada vez mais complexo, envolvendo frequentemente a transferência horizontal de plasmídeos e transposões entre clones independentes e entre clones epidêmicos (Cantón *et al.*, 2003) (Fig.1.4.3). Nesta secção serão referidos sumariamente alguns aspectos relacionados com os mecanismos/elementos genéticos envolvidos na disseminação de genes  $bla_{ESBL}$ .



**Fig. 1.4.3- Emergência e persistência de genes  $bla_{ESBL}$  em bactérias: propagação clonal e modelo de disseminação plasmídica (adaptado de Cantón *et al.*, 2003).** Emergência de uma ESBL devido a uma mutação num gene  $bla$  localizado num plasmídeo pré-existente (A.1); um clone específico (clone A) adquire um plasmídeo contendo o gene  $bla_{ESBL}$  e propaga-se devido à sua seleção (A.2); transmissão do plasmídeo e disseminação de diferentes clones (clones B a D) que albergam o plasmídeo contendo o gene  $bla_{ESBL}$ , podendo coexistir num quadro espaço-temporal, como no ambiente hospitalar (A.3); transmissão do plasmídeo contendo o gene  $bla_{ESBL}$  para outro clone (clone E) que contém outro plasmídeo de resistência (A.4). (Cantón *et al.*, 2003).

### **A. Dispersão clonal**

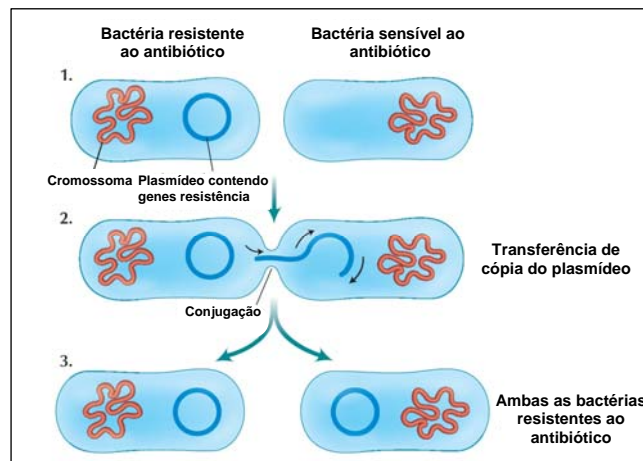
Como os genes que codificam para a resistência aos antibióticos se transmitem à descendência aquando da replicação de DNA, bactérias resistentes que se formem irão ser naturalmente seleccionadas durante a exposição a antibióticos. Estas bactérias podem constituir um importante mecanismo de disseminação de resistência aos antibióticos, quando acumulam uma série de características que contribuem para o seu sucesso epidémico, como por exemplo, alguns factores de virulência ou plataformas genéticas nas quais se localizam genes de resistência que lhes conferem uma vantagem em diferentes ambientes (Morosini *et al.*, 2006; Cantón *et al.*, 2008). Nesta situação, essas estirpes bacterianas ou clones irão disseminar-se em grande escala, disseminando também os genes de resistência que albergam (Hawkey *et al.*, 2009). Este mecanismo de disseminação é por isso designado de dispersão clonal. O exemplo mais representativo deste tipo de dispersão é a recente e rápida disseminação do clone *E. coli* O25:H4-ST131, pertencente ao grupo filogenético B2, que se encontra associado à pandemia de CTX-M-15 (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008; Coque *et al.*, 2008). Este clone tem sido detectado na maior parte dos países Europeus, incluindo França, Grécia, Itália, Noruega, Portugal, Espanha, Suíça, Turquia e Inglaterra, e também em outros continentes (Machado *et al.*, 2006; Nyberg *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2008; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008; Coque *et al.*, 2008; Yumuk *et al.*, 2008). Outro exemplo representativo da expansão clonal relaciona-se com a disseminação de clones epidémicos de *E. aerogenes* produtores de TEM-24 em diversos países Europeus, incluindo Portugal (Dumarche *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2007; Novais *et al.*, 2010).

### **B. Transferência Horizontal de Genes**

A transferência horizontal de genes é um processo em que um organismo transfere material genético para outra célula que não é sua descendente. Os veículos genéticos que podem transportar genes *bla*<sub>ESBL</sub> são diversos e incluem uma variedade de transposões e integrões, os quais podem por sua vez estar localizados em plasmídeos conjugativos, que são também importantes elementos genéticos que facilitam a disseminação de *bla*<sub>ESBL</sub> (Poirel *et al.*, 2000; Partridge *et al.*, 2005; Cantón *et al.*, 2003; Naas *et al.*, 2006; Novais *et al.*, 2006).

## B1. Plasmídeos

Os plasmídeos são moléculas de DNA circular de cadeia dupla, de localização extracromossômica, com capacidade de replicação autónoma (Lodish *et al.*, 1999). Certos plasmídeos contêm genes que codificam para proteínas capazes de favorecer a sua transferência para outras bactérias através da formação de *pili* (Fig. 1.4.4). Estes plasmídeos são designados de *plasmídeos conjugativos* e, ao contrário dos não conjugativos, assumem um importante papel no actual panorama da epidemiologia das ESBLs, uma vez que contribuem para a proliferação de genes de resistência aos antibióticos entre bactérias de uma mesma espécie ou de espécies, géneros e mesmo famílias diferentes (Brown, 2006; Sousa, 2006).

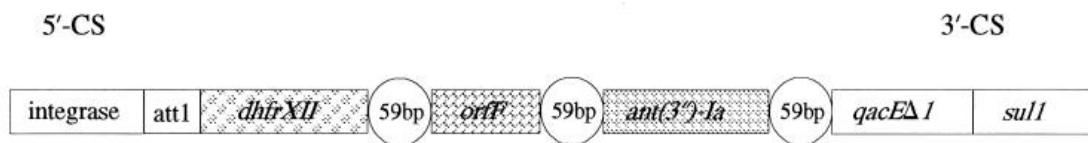


**Fig.1.4.4.** – Transferência horizontal da resistência aos antibióticos através de plasmídeos (adaptado de Griffiths *et al.*, 1999).

Actualmente, os plasmídeos constituem um importante mecanismo de disseminação de genes *bla*<sub>ESBL</sub> em *Enterobacteriaceae* (Coque *et al.*, 2008). Estas plataformas genéticas podem ainda albergar integrões, transposões e/ou sequências de inserção (ver adiante), permitindo a junção de vários determinantes de resistência aos antibióticos num único elemento genético móvel (Novais *et al.*, 2006). Diversos plasmídeos conjugativos têm estado envolvidos na disseminação de várias ESBLs do tipo TEM, SHV e CTX-M, entre outras (Cantón *et al.*, 2003), não só entre *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar, como também da flora comensal de humanos saudáveis, animais e ambiente (Witte, 2000; Carattoli, 2008; Machado *et al.*, 2008).

## B2. Integrões

Os integrões são estruturas de recombinação e expressão genética capazes de capturar genes sob a forma de *cassetes genéticas* deficitárias de promotor (Mazel, 2006). A estrutura de um integrão é flanqueada por duas regiões terminais conservadas (CS, Conserved Sequences) e uma região central altamente variável que compreende as cassetes genéticas do integrão em particular (Fig.1.4.5.) (Hall *et al.*, 1995). Esta região varia consoante o tipo e o número de cassetes genéticas aí inseridas (Hall *et al.*, 1995).



**Fig.1.4.5** – Representação esquemática da estrutura de integrão e cassette de genes detectados em *Vibrio cholerae* O1 (adaptado de Dalsgaard *et al.*, 2000). 5'CS e 3'CS – regiões conservadas; *attI* – local de integração da cassette genética; *qacEΔ1* e *sulI* – genes que codificam resistência a compostos de amónio quaternário e sulfonamidas, respectivamente.

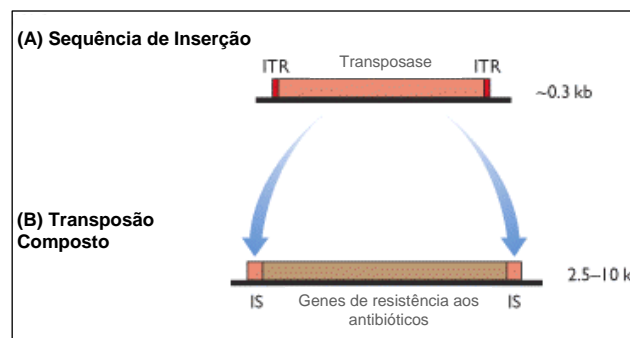
Os integrões por si só não apresentam mobilidade, pois não codificam as proteínas necessárias para a sua transposição. Pelo contrário, as cassetes genéticas por eles capturadas são elementos genéticos móveis (Bennett, 2008). As cassetes genéticas codificam habitualmente para resistência a antibióticos, pelo que múltiplas inserções de cassetes conduzem a integrões multiresistentes (Recchia *et al.*, 1995; Mazel, 2006; Bennett, 2008). Entre os genes que codificam para ESBLs que têm sido associados a estas estruturas, encontram-se *bla<sub>GES</sub>*, *bla<sub>VEB</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>* e *bla<sub>CTX-M-9</sub>*.

## B3. Transposões (sequências de inserção e transposões compostas)

As *sequências de inserção* (ISs) constituem o elemento genético mais simples (700-3200 pares de bases) capaz de se mover no genoma: de uma posição no cromossoma para outra posição ou para um plasmídeo, ou de um plasmídeo para o cromossoma (Griffiths *et al.*, 1999). São, portanto, a forma mais simples de um transposão (Bennett, 2008). A sua região central codifica para a enzima transposase (*tnpA*), a qual é flanqueada por sequências invertidas (IR) características de cada IS em particular (Fig.1.4.6). A transposase reconhece as IR e repetições idênticas noutros locais do genoma, fazendo a excisão ou inserção destes fragmentos de DNA da localização original para um novo local de DNA, promovendo assim a transferência de genes de

resistência aos antibióticos (Sousa, 2006). Existem sequências de inserção associadas à disseminação de genes que codificam para ESBLs e à sua expressão, como é o caso da IS26, ISEcp1 e ISCRI, associadas a genes que codificam para SHV-2, CTX-M-1-like e CTX-M-9-like, respectivamente (Goussard *et al.*, 1991; Toleman *et al.*, 2006).

Os *transposões compostos* não são mais do que um par de ISs a flanquear um segmento de DNA que geralmente contém um ou mais genes, muitas vezes codificando para a resistência a antibióticos (Fig.1.4.6) (Brown, 2002). Vários transposões conjugativos (autotransferíveis) têm sido associados à disseminação de ESBLs, como é o caso do Tn1/Tn3, Tn21 e Tn1213, que contêm os genes *bla*<sub>TEM-1</sub>/*bla*<sub>TEM-2</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> e *bla*<sub>PER-1</sub>, respectivamente (Poirel *et al.*, 2003).

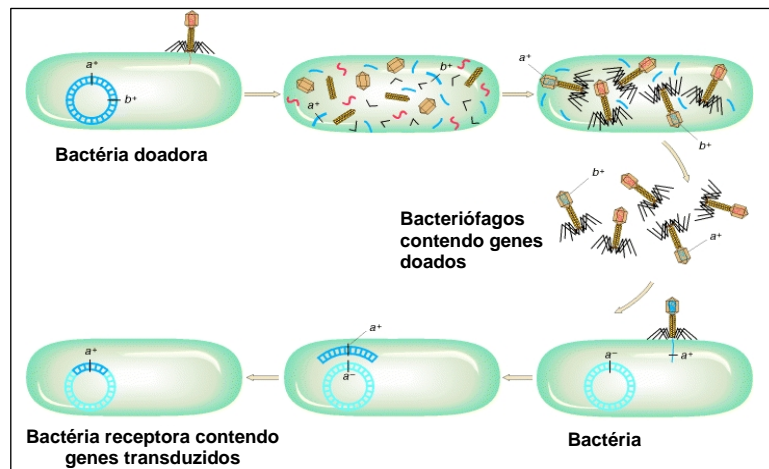


**Fig. 1.4.6** – Estrutura de uma Sequência de Inserção (A) e de um Transposão Composto (B) (adaptado de Brown, 2002). ITR (sequências terminais de repetição invertidas).

#### B4. Bacteriófagos

A maioria das bactérias é susceptível ao ataque por bacteriófagos (vírus que infectam bactérias). Durante a infecção, o bacteriófago ataca a bactéria e injecta o seu material genético para o citoplasma, o qual pode ser posteriormente integrado no cromossoma da bactéria, passando a ser designado de prófago (ciclo lisogénico). Quando a bactéria hospedeira se multiplica, o genoma do prófago é também replicado, passivamente, e distribuído para as bactérias descendentes. Porém, quando o bacteriófago entra no chamado ciclo lítico, os bacteriófagos que se formam poderão conter material genético bacteriano, como por exemplo genes de resistência a antibióticos. Quando infectar uma segunda bactéria, o seu DNA será injectado nesta, conferindo-lhe também resistência a antibióticos aos quais anteriormente seria sensível (mecanismo de transdução) (Fig.

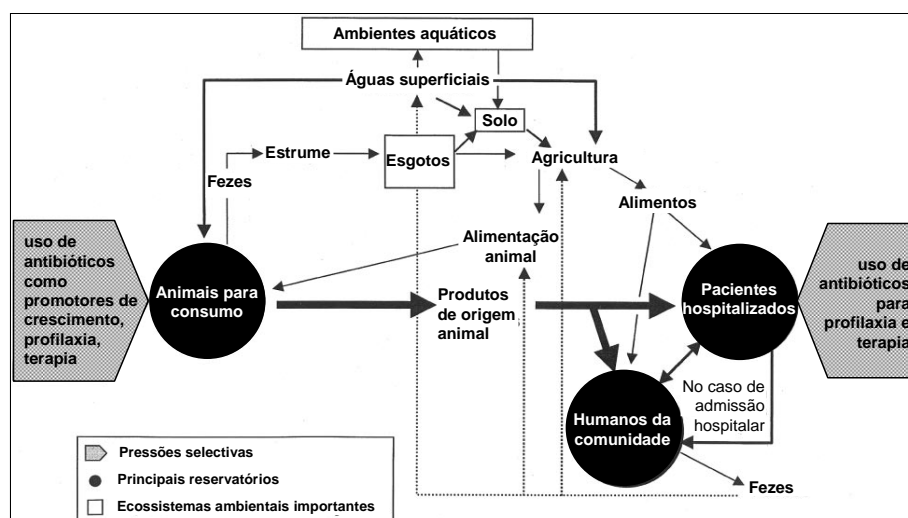
1.4.7). Oliver *et al.*, em 2005, descreveu pela primeira vez a disseminação de uma ESBL do tipo CTX-M-10 através de um bacteriófago.



**Fig.1.4.7** – Mecanismo de transdução (adaptado de Griffiths *et al.*, 1999).

## **1.5 RESERVATÓRIOS DE ENTEROBACTERIACEAE PRODUTORAS DE ESBLs E/OU GENES *bla*<sub>ESBL</sub>**

As *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs têm sido frequentemente identificadas em isolados humanos associados a hospitais e/ou comunidade (Coque *et al.*, 2008; Rodríguez-Baño *et al.*, 2008). Para além disso, elas são frequentemente descritas em animais doentes e saudáveis (porcos, galinhas, animais de estimação, gaivotas, coelhos, aves de capoeira, entre outros) (Briñas *et al.*, 2005; Girlich *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2008; Bonnedahl *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 2009; Poeta *et al.*, 2009), em produtos alimentares (Hasman *et al.*, 2005; Carattoli, 2008) e em diversas amostras ambientais (Österblad *et al.*, 1999; Witte, 2000; Machado *et al.*, 2009). Estes diferentes reservatórios de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e/ou genes *bla*<sub>ESBL</sub> poderão interagir de diferentes formas, como ilustrado na Fig.1.5.1, que retrata as diversas vias de transmissão de bactérias e genes de resistência aos antibióticos. A pressão antibiótica exercida em hospitais, veterinária, agricultura e piscicultura parece contribuir para a selecção e difusão de genes de resistência em diferentes nichos ecológicos (Baquero *et al.*, 1998; Hawkey, 2008; Machado *et al.*, 2008).



**Fig.1.5.1** – Vias de transmissão de bactérias resistentes e de genes de resistência aos antibióticos (Witte, 2000).

Uma das principais ameaças epidemiológicas é a disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em pessoas saudáveis da comunidade, sobretudo pela aquisição de genes de resistência por parte da flora comensal, quer por hospitalizações anteriores quer por exposição prévia a antibióticos ou ingestão de alimentos ou águas contaminados com bactérias resistentes aos mesmos (Mesa *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2007; Lavilla *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2008). Um estudo de Valverde *et al.* (2008) destacou o facto de que pacientes da comunidade e seus familiares representam um importante reservatório de genes *bla*<sub>ESBL</sub>.

## **1.6 CONTROLO DA DISSEMINAÇÃO DE ESBLs EM ENTEROBACTERIACEAE**

O aumento dramático de genes *bla*<sub>ESBL</sub> em *Enterobacteriaceae* resistentes a múltiplos antibióticos é hoje alarmante (Stuart *et al.*, 2005). As consequências desta disseminação incluem o aumento da mortalidade e morbidade, falhas no tratamento, aumento do tempo/custos de internamento e recurso a antimicrobianos de reserva, indicados para infecções mais complicadas (Livermore, 2003; Salgado *et al.*, 2005). Apesar da contínua investigação e desenvolvimento de novos antibióticos, a velocidade e escala do seu desenvolvimento são diminutas (Yim, 2009), sendo agravadas por práticas clínicas que insistem num uso abusivo de antibióticos. Tendo em conta todos estes factos, torna-se necessário a implementação de algumas medidas de controlo, tais como:

- Fazer um uso racional dos antibióticos, de modo a evitar pressões selectivas (por exemplo, limitar o uso de cefalosporinas e fluoroquinolonas em humanos e animais) (FAAIR Scientific Advisory Panel, 2002);
- Implementar políticas de controlo de infecção para prevenir a disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs dentro e fora dos hospitais;
- Implementar medidas de isolamento de pacientes colonizados com bactérias produtoras de ESBLs. O estudo do estado de colonização aquando da admissão no hospital e a análise da flora intestinal de pacientes hospitalizados são também acções de grande importância (Bisson *et al.*, 2002; Rodriguez-Baño *et al.*, 2006);
- Implementar métodos de detecção de clones/plasmídeos bacterianos que constituam importantes veículos de disseminação de ESBLs. Idealmente, estes deveriam ser integrados nos laboratórios de análises clínicas, para assegurar intervenções em tempo real (Paterson *et al.*, 2005; Bennett, 2008; Coque *et al.*, 2008).
- Promover estudos de vigilância da resistência aos antibióticos nos hospitais e na comunidade (Williams *et al.*, 1998; Oteo *et al.*, 2003). Neste sentido, estudos sobre a evolução da resistência em *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs dentro e fora do ambiente hospitalar (animais, águas, esgotos, entre outros), podem ser úteis para acompanhar modificações no panorama das ESBLs, para compreender como ocorre a sua emergência e disseminação numa região geográfica particular ou numa instituição de saúde. Nos últimos anos, diversos programas internacionais de vigilância da resistência aos antibióticos têm sido desenvolvidos: INSPAR e SENTRY nos EUA; EARSS (*The European Antimicrobial Resistance Surveillance System*) e ROAR (*Reservoirs of Antibiotic Resistance*) na Europa.

A comunidade científica e os profissionais de saúde pública deverão estar cientes de que as potenciais intervenções para controlar a rápida disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs a nível mundial, têm uma janela de tempo limitada a uma acção efectiva. Uma vez reunidas e cruzadas determinadas situações (disseminação de ESBLs entre diferentes espécies bacterianas, clones e nichos ecológicos), o controlo será simplesmente impossível, mesmo aplicando medidas modelo. Dever-se-á agir agora e estar preparado para um futuro incerto através de formas inovadoras de controlo dos organismos produtores de ESBLs (Coque *et al.*, 2008).

## **II. OBJECTIVOS**

Em Portugal a ocorrência, diversidade e relevância clínica das ESBLs são ainda pouco estudadas, existindo apenas relatos esporádicos em hospitais específicos ou estudos efectuados em períodos de tempo relativamente curtos. Mudanças na epidemiologia das ESBLs impõem novas abordagens terapêuticas e de controlo da infecção, justificando a sua vigilância periódica.

Assim, foram objectivos principais deste trabalho:

- Investigar a ocorrência e a diversidade de genes que codificam para ESBLs (*bla*<sub>ESBL</sub>) em *Enterobacteriaceae* isoladas de um hospital Português entre Junho de 2006 e Junho de 2007, comparando com dados de anos anteriores (2002-2004);
- Avaliar a co-resistência a antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos nos isolados produtores de ESBLs.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Isolados bacterianos

Foram estudados oitenta e um isolados previamente identificados como presumíveis produtores de ESBLs, detectados numa colecção de mil e quatrocentos e oitenta e seis (1486) *Enterobacteriaceae* isoladas durante o período de um ano (Junho 2006-Junho 2007) no Laboratório de Microbiologia de um Hospital Português (região Centro-Interior). Os isolados foram obtidos de pacientes que receberam atendimento nessa instituição hospitalar e incluíram 1212 *Escherichia coli*, 133 *Klebsiella pneumoniae*, 31 *Klebsiella oxytoca*, 1 *Klebsiella ascorbata*, 71 *Enterobacter cloacae*, 30 *E. aerogenes*, 1 *E. asburiae*, 4 *Morganella morganii*, 1 *Proteus mirabilis*, 1 *Serratia marcescens* e 1 *Serratia plymuthica*. Bactérias do mesmo indivíduo mostrando perfis de susceptibilidade idênticos e isolados durante a mesma semana de hospitalização não foram incluídas.

#### 2. Identificação bacteriana

As bactérias incluídas neste estudo foram previamente identificadas pelo sistema automático PHOENIX (*Phoenix Automated System*, Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, EUA) ou através de galerias API ID 32 GN (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France) (Sanguinetti *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2007).

#### 3. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos

A avaliação preliminar da susceptibilidade aos antibióticos foi efectuada através do sistema automático PHOENIX (*Phoenix Automated System*, Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, EUA). Uma avaliação mais alargada da susceptibilidade de certos isolados bacterianos a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e não  $\beta$ -lactâmicos foi posteriormente efectuada através do método de difusão em agar, utilizando discos contendo os antibióticos a testar e seguindo as normas do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2007). Os antibióticos testados incluíram alguns  $\beta$ -lactâmicos [amoxicilina (10  $\mu$ g), amoxicilina/ácido clavulânico (30  $\mu$ g), ceftazidima (30  $\mu$ g), cefotaxima (30  $\mu$ g), cefepime (30  $\mu$ g), aztreonamo (30  $\mu$ g), cefoxitina (30  $\mu$ g), imipenemo (10  $\mu$ g)], aminoglicosídeos [gentamicina (10  $\mu$ g), tobramicina (10  $\mu$ g), ampicacina (30  $\mu$ g), estreptomicina (10  $\mu$ g), netilmicina (30  $\mu$ g),

canamicina (30 µg)], quinolonas [ciprofloxacina (5 µg), ácido nalidíxico (30 µg)], tetraciclina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), sulfonamidas (300 µg) e trimetoprim (5 µg). Os discos de antibióticos utilizados foram adquiridos junto da OXOID (Madrid, Espanha). Todos os isolados com comportamento de sensibilidade intermédia foram considerados como resistentes ao antibiótico testado.

#### 4. Detecção da expressão de ESBLs

A detecção da expressão de ESBLs foi efectuada através do teste do duplo sinergismo (DDST, *Double Disc Sinergy Test*) (Jarlier *et al.*, 1988), utilizando o meio de Muëller-Hinton agar e discos de ceftazidima (30µg), cefotaxima (30µg), cefepime (30µg) e aztreonamo (30µg) colocados a 20 mm de um disco contendo amoxicilina e ácido clavulânico (30µg) (Jarlier *et al.*, 1988). Nos isolados em que se suspeitou da co-produção de beta-lactamases do tipo AmpC, o teste foi ainda realizado em meio de Mueller-Hinton agar contendo cloxacilina (250 mg/L) (Machado *et al.*, 2007).

#### 5. Detecção e caracterização molecular de genes que codificam para ESBLs ( $bla_{ESBL}$ )

##### A. Extracção do DNA bacteriano

Nos isolados em que se detectou a produção de ESBLs, foi efectuada a extracção do DNA bacteriano para posterior caracterização molecular das enzimas. Para isso, foram recolhidas 3-4 colónias da cultura pura de cada isolado clínico, as quais foram colocadas em 300 µL de água ultrapura estéril. Após homogeneização, foi efectuada uma lise bacteriana através de um processo de fervura em banho de água (GFL<sup>®</sup>, Burgwadel, Alemanha) durante 15 minutos (Machado *et al.*, 2007). No final foi efectuada uma centrifugação (Sigma, Osterode am Harz, Alemanha) a 14000 r.p.m. durante 5 minutos. O sobrenadante obtido (contendo o DNA extraído) foi congelado a -20°C para os estudos posteriores.

##### B. Amplificação de ácidos nucleicos por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A caracterização molecular das ESBLs previamente detectadas nos isolados bacterianos foi efectuada através da amplificação de genes que codificam para beta-lactamases (*bla*) por reacção em cadeia da polimerase (PCR), utilizando *primers* e condições de amplificação para a detecção dos genes  $bla_{ESBL}$  mais frequentes:  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$  e  $bla_{CTX-M}$  (Machado *et al.*, 2007). A detecção de genes  $bla_{CTX-M}$  foi um processo bifásico

que incluiu a i) detecção de uma sequência conservada dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> e, no caso do resultado ser positivo, ii) a posterior amplificação de outras regiões do gene *bla*<sub>CTX-M</sub> que permitem a determinação do grupo e/ou tipo a que pertence essa enzima (Machado *et al.*, 2007). Nesta segunda fase foi utilizado um novo conjunto de *primers* para amplificação de regiões genéticas específicas que caracterizam cada grupo CTX-M e/ou para efectuar reacções de sequenciação de alguns tipos específicos de enzimas CTX-M incluídas em cada grupo (Machado *et al.*, 2007). A pesquisa da presença de genes *bla*<sub>OXA-1</sub> e *qepA*, recentemente associados ao ambiente genético de certas ESBLs (Machado *et al.*, 2007; Cattoir *et al.*, 2008), foi também efectuada por PCR. As condições reaccionais e de amplificação, assim como a sequência nucleotídica dos *primers* utilizados, encontram-se indicados na Tabela 2. As reacções de PCR foram efectuadas nos termocicladores My Cycler<sup>TM</sup> (Biorad, Hércules, EUA) e ICycler<sup>TM</sup> (Hércules, EUA).

### C. Electroforese

Após as reacções de amplificação, os produtos de PCR foram analisados através de uma electroforese em gel de agarose a 2%, usando as seguintes condições: 90V, 45 minutos, TAE Buffer 1X. O SYBR Safe<sup>TM</sup> DNA Gel Stain (Invitrogen, Paisly, United Kingdom), a uma concentração de 0,1 µL/mL, foi utilizado como composto intercalador de ácidos nucleicos, o que permitiu a visualização dos produtos amplificados sob luz UV (transiluminador e sistema de aquisição de imagem Molecular Imager ChemiDoc<sup>XRS</sup>, Milão, Itália). O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com o Marcador de Peso Molecular Hyperladder IV (Bioline, Uppsala, UK) (Anexo 1).

### D. Purificação dos produtos amplificados

Os produtos de PCR foram purificados recorrendo ao sistema de purificação Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-UP System (PROMEGA Corporation, Madison, USA), seguindo as instruções do fabricante.

### E. Sequenciação

Os produtos de PCR purificados foram enviados para a empresa STAB VIDA (Oeiras, Portugal) para sequenciação. As reacções de sequenciação foram efectuadas em sequenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA). As sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas com aquelas depositadas

em bancos de dados genéticos mundiais, nomeadamente no GenBank e EMBL, através da ferramenta “BLASTN alignment” que busca sequências iguais ou semelhantes nesses locais. Uma vez que existem mutações que podem conferir variabilidade dentro de um mesmo tipo de ESBL, procedeu-se ainda à tradução das sequências nucleotídicas em sequências de aminoácidos, as quais foram depois comparadas com as de TEM-1, TEM-2 e SHV-1 usando a ferramenta CLUSTALW2, de forma a verificar os locais de mutação e identificar qual o tipo de ESBL em questão. Esta identificação foi feita através do site <http://www.lahey.org/studies>, onde podem ser encontrados os locais de mutação para cada tipo de ESBL.

**Tabela 2** – *Primers* e condições de PCR usados no estudo.

Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho (bp)	Gene (s) <sup>a</sup>	Condições de PCR	[MgCl <sub>2</sub> ]	Referências
CTX-M-F' CTX-M-R'	TTT GCG ATG TGC AGT ACC AGT AA CGA TAT CGT TGG TGG TGC CAT A	590	CTX-M	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 51°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	1,7	Edelstein <i>et al.</i> , 2003
CTX-M-F3 CTX-M-R2	GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC AGC CGC CGA CGC TAA TAC A	499	CTX-M Grupo I	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	1,7	Pitout <i>et al.</i> , 2004
TOHO1-2F TOHO1-1R	GCG ACC TGG TTA ACT ACA ATC C CGG TAG TAT TGC CCT TAA GCC	351	CTX-M Grupo II	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	1,7	Pitout <i>et al.</i> , 2004
CTXM8/25-F CTXM8/25-R	CGC TTT GCC ATG TGC AGC ACC GCT CAG TAC GAT CGA GCC	307	CTX-M Grupo II I	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	1,7	Pitout <i>et al.</i> , 2004
CTXM9/14-F CTXM9/14-R	GCT GGA GAA AAG CAG CGG AG GTA AGC TGA CGC AAC GTC TG	474	CTX-M Grupo IV	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 62°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	1,7	Pitout <i>et al.</i> , 2004
CTX-M-10deg-F CTX-M-10deg-R	ATG GTT AAA AAA TCA CTG CGY C TTA CAA ACC GTY GGT GAC G	876	CTX-M Grupo I (sequenciação)	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55,5°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	2,5	Machado <i>et al.</i> , 2006
CTX-M-9-D CTX-M-9-F	GTG ACA AAG AGA GTG CAA CGG ATG ATT CTC GCC GCT GAA GCC	856	CTX-M Grupo IV (sequenciação)	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 62°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	1,7	Coque <i>et al.</i> , 2002
TEM-F TEM-R	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA	867	TEM	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	1,7	Machado <i>et al.</i> , 2007
SHV-F SHV-R	GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC TTA GCG TTG CCA GTG CTC	930	SHV	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	2	Rasheed <i>et al.</i> , 1997
OXA-Group III-F OXA-Group III-R	TTT TCT GTT GTT TGG GTT TT TTT CTT GGC TTT TAT GCT TG	427	OXA	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 54°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	1,2	Bert <i>et al.</i> , 2002
qepA-F qepA-R	CGT GTT GCT GGA GTT CTT C CTG CAG GTA CTG CGT CAT G	403	qepA	1 ciclo de 10 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 57°C e 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	1,7	Cattoir <i>et al.</i> , 2008

<sup>a</sup>Grupo I inclui CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15 (UOE-1), -22, -23, -28, -29 e -30; Grupo II inclui CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20 e Toho-1; Grupo III inclui CTX-M-8 e CTX-M-25; Grupo IV inclui CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -18, -19, -21, -27 e Toho-2.

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Ocorrência e Diversidade de ESBLs

A expressão de ESBLs foi observada em 5% (81/1486) dos isolados clínicos analisados, os quais foram identificados como *Escherichia coli* (n=48), *Klebsiella pneumoniae* (n=10), *Enterobacter cloacae* (n=14), *Klebsiella oxytoca* (n=4), *Morganella morganii* (n=2), *Enterobacter asburiae* (n=1), *Proteus mirabilis* (n=1) e *Serratia marcescens* (n=1).

As ESBLs detectadas incluíram representantes de enzimas do tipo TEM (18/81, 22%), SHV (18/81, 22%) e CTX-M (38/81, 47%), correspondendo a oito tipos de ESBLs distintos: TEM (-10, -52, -116), SHV (-12, -64) e CTX-M (-14, -15, -32). O tipo SHV-64 nunca foi antes descrito em Portugal, constituindo este estudo a primeira descrição desta enzima no nosso País em *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar. Em 11 isolados (4 *E. coli*, 3 *E. cloacae*, 2 *K. oxytoca*, 1 *K. pneumoniae*, 1 *E. asburiae*) não foram detectados genes *bla*<sub>ESBL</sub> do tipo TEM, SHV ou CTX-M. Nestes casos, outros tipos de ESBLs poderão estar presentes, embora não possa ser totalmente excluída a possibilidade de um resultado falso positivo no teste do duplo sinergismo (CLSI, 2007). A distribuição dos diferentes tipos de ESBLs identificados pelas diferentes espécies de *Enterobacteriaceae* encontra-se na Tabela 3.

**Tabela 3** – Distribuição dos tipos de ESBLs pelas espécies de *Enterobacteriaceae* incluídas no estudo.

Tipo de ESBL*	Espécie (nº. isolados)	Data de isolamento (mês/ano)	Serviço	Amostra clínica
<u>TEM (n=14)</u>				
TEM-10	<i>K. pneumoniae</i> (3)	05/06-05/07	Ortopedia, UCIP, Desconhecido	Expectoração (n=2), Urina (n=1)
	<i>K. oxytoca</i> (1)	11/06	Desconhecido	Expectoração
	<i>S. marcescens</i> (1)	12/06	Pediatria	Aspirado brônquico
TEM-52	<i>E. coli</i> (2)	08/06-11/06	Medicina, Pediatria	Urina
TEM-116	<i>E. coli</i> (2)	01/07-06/07	Medicina, Pediatria	Expectoração, Urina
	<i>E. cloacae</i> (2)	09/06-03/07	Ginecologia, Medicina	Expectoração, Urina
	<i>P. mirabilis</i> (1)	09/06	Pediatria	Urina
	<i>M. organii</i> (2)	11/06	Desconhecido, Medicina	Expectoração
<u>SHV (n=17)</u>				
SHV-12	<i>E. cloacae</i> (8)	05/06-01/07	Medicina (n=4), Fisioterapia (n=2), Pediatria (n=1), Desconhecido (n=1)	Urina (n=4), Expectoração (n=3), Pus (n=1)
	<i>K. pneumoniae</i> (5)	08/06-04/07	Medicina (n=2), Desconhecido (n=2), Pediatria (n=1)	Expectoração (n=1), Pus (n=1), Aspirado brônquico (n=1), Urina (n=2)
	<i>E. coli</i> (2)	08/06-01/07	Fisioterapia	Urina
	<i>K. oxytoca</i> (1)	05/07	Medicina	Urina
SHV-64	<i>K. pneumoniae</i> (1)	02/07	Medicina	Expectoração
<u>CTX-M (n=35)</u>				
CTX-M-15	<i>E. coli</i> (32)	06/06-05/07	Medicina (n=15), Urologia (n=2), Pneumologia (n=2), Outros (n=13)	Urina (n=23), Expectoração (n=6), Sangue (n=2), Desconhecido (n=1)
CTX-M-14	<i>E. coli</i> (2)	07/06-01/07	Medicina	Urina
CTX-M-32	<i>E. coli</i> (1)	08/06	Neonatologia	Urina
<u>Múltiplas ESBLs (n=4)</u>				
CTX-M-15 + TEM-116	<i>E. coli</i> (2)	09/06-02/07	Cirurgia (n=1), Desconhecido (n=1)	Urina
CTX-M-15 + TEM-10	<i>E. coli</i> (1)	01/07	Fisioterapia	Urina
TEM-116 + SHV-12	<i>E. cloacae</i> (1)	01/07	Neurocirurgia	Pus

(\*) Em 11 isolados DDST (+) não foram detectados genes *bla*<sub>ESBL</sub> do tipo TEM, SHV ou CTX-M.

UCIP: Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos.

Comparando estes resultados com os obtidos num estudo publicado em 2007 por Machado *et al.*, observou-se um aumento da ocorrência de ESBLs do grupo CTX-M, o que já seria de esperar, uma vez que nos últimos quinze anos se tem assistido a uma rápida expansão mundial deste tipo de enzimas (Cantón *et al.*, 2006). Diferentes espécies de *Enterobacteriaceae* produtoras de CTX-M têm sido reportadas em quase todos os países e, em alguns casos, as enzimas do tipo CTX-M superam, em número, as clássicas ESBLs do tipo TEM e SHV (Rossolini *et al.*, 2008). São várias as razões que têm sido apontadas para este aumento, designadamente o uso prévio de cefalosporinas de espectro alargado (Oteo *et al.*, 2006) e, mais recentemente, de fluoroquinolonas, descobertas em 1958 e usadas na prática clínica desde 1962 (Sousa, 2006). O uso de antibióticos de outras famílias poderá também seleccionar elementos genéticos que contêm múltiplos genes de resistência a antibióticos, garantindo uma co-selecção de ESBLs em bactérias multiresistentes (Livermore, 2003; Cantón *et al.*, 2008). A associação de genes *bla*<sub>ESBL</sub> a mecanismos de resistência emergentes tem sido descrita, particularmente com enzimas CTX-M. Estes incluem metilases do 16S rRNA (codificadas por genes *armA* e *rtmB*, descritos em *Enterobacteriaceae* produtoras de CTX-M-3), diferentes proteínas Qnr (*qnrA* associado a CTX-M-1, -15 e -9; *qnrB* a CTX-M-15; *qnrS* a CTX-M-9) e acetiltransferases de fluoroquinolonas e aminoglicosídeos [*aac(6')-Ib-cr*, quase sempre descrito em bactérias produtoras de CTX-M-15] (Poirel *et al.*, 2006; Bogaerts *et al.*, 2007; Lavilla *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2006; Pitout *et al.*, 2008; Sabtcheva *et al.*, 2008; Cano *et al.*, 2009; Cattoir *et al.*, 2009; Crémet *et al.*, 2009).

**O tipo de ESBL mais comumente identificado foi CTX-M-15 (35/81, 43%),** tendo sido encontrado exclusivamente em *E. coli*. Pensa-se que a sua expansão neste hospital poderá estar relacionada com uma disseminação clonal, visto que o mesmo é observado nos restantes países da Europa, incluindo outros hospitais Portugueses anteriormente analisados (Boyd *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2006; Mendonça *et al.*, 2006; Cantón *et al.*, 2008). A segunda ESBL mais comum foi SHV-12 (17/81, 21%), a qual foi encontrada em várias espécies, nomeadamente *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. cloacae*. Neste caso, a disseminação da enzima poderá estar relacionada com uma disseminação plasmídica, uma vez que foi detectada em diferentes espécies de *Enterobacteriaceae*. De facto, a dispersão do gene *bla*<sub>SHV-12</sub> tem sido associada a plasmídeos que contêm genes que codificam para mecanismos de resistência às

fluoroquinolonas (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*) (Cattoir *et al.*, 2007; Lavilla *et al.*, 2008), o que poderá também contribuir para a sua disseminação (Cantón *et al.*, 2008). Ambos os tipos de ESBLs foram frequentemente identificados em isolados obtidos do Serviço de Medicina do Hospital, embora também tenham sido detectados noutros serviços hospitalares (Tabela 3).

**A maioria dos isolados bacterianos produtores de ESBLs produziu mais do que uma beta-lactamase:** *bla*<sub>ESBL</sub> e *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>SHV-11</sub> ou *bla*<sub>SHV-1</sub>. Verificou-se ainda a existência de isolados produtores de múltiplas ESBLs: CTX-M-15 e TEM-116 (n=2); CTX-M-15 e TEM-10 (n=1); TEM-116 e SHV-12 (n=1).

Num estudo realizado anteriormente por Machado *et al.* (2007) entre 2002 e 2004, onde também se incluiu o hospital em análise, observou-se uma elevada ocorrência de ESBLs do tipo TEM (46%) em detrimento de CTX-M (22%). Apesar do presente estudo ter sido apenas desenvolvido com dados provenientes de um único hospital, localizado no Interior-Centro do País, tendo em conta que os resultados obtidos são demonstrativos do que ocorre no resto da Europa, poder-se-á supor que, se o estudo de Machado *et al.* (2007) fosse de novo efectuado, os resultados seriam idênticos aos obtidos na presente investigação (aumento do número de ESBLs do tipo CTX-M com decréscimo de TEM).

Quando se comparam os resultados de Machado *et al.* (2007) para o hospital em questão, com os dados obtidos actualmente, observa-se um aumento da diversidade de tipos de ESBLs, ocorrendo o aparecimento de novos tipos, nomeadamente ESBLs do tipo SHV e CTX-M, antes inexistentes no hospital avaliado. É de realçar, contudo, que eram poucos os isolados produtores de ESBLs nesse hospital durante o período entre 2002 e 2004 (apenas cinco isolados, maioritariamente *E. aerogenes* produtores de TEM-24).

## **2. *Enterobacteriaceae* produtoras de CTX-M**

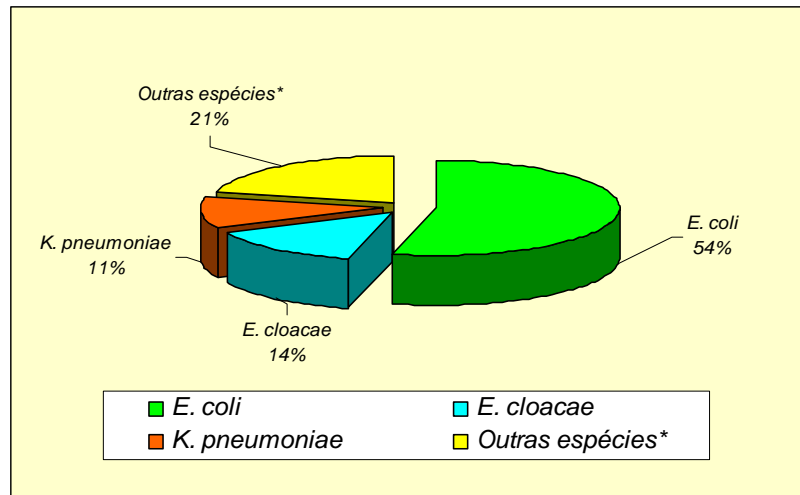
Todos os isolados produtores de ESBLs do tipo **CTX-M-15** continham também *bla*<sub>OXA-1</sub> e *bla*<sub>TEM-1</sub> (n=20), *bla*<sub>OXA-1</sub> e *bla*<sub>TEM-116/10</sub> (n=2), apenas *bla*<sub>OXA-1</sub> (n=5) ou apenas *bla*<sub>TEM-1/116</sub> (n=8). A associação de CTX-M-15 com TEM-116 é observada pela primeira vez neste estudo, nunca tendo sido antes descrita.

Os isolados clínicos produtores de **CTX-M-14** continham também *bla*<sub>TEM-1</sub>. Este tipo de associação foi já anteriormente descrito (Machado *et al.*, 2007; Marcadé *et al.*, 2009).

**CTX-M-32** foi o único isolado em que não se observou a associação de outros tipos de beta-lactamases, o que também está de acordo com publicações anteriores (Oteo *et al.*, 2006; Novais *et al.*, 2007).

## **3. Distribuição de ESBLs pelas diferentes espécies de *Enterobacteriaceae***

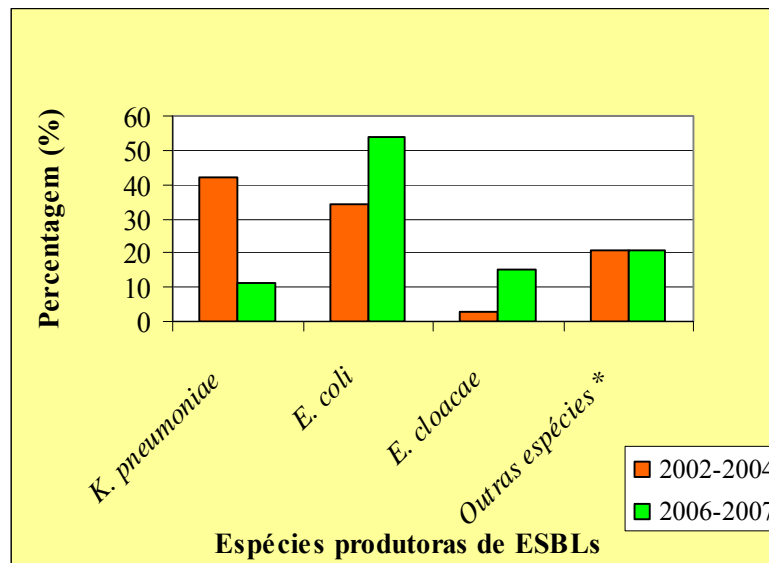
Neste estudo, *E. coli* foi a espécie mais frequentemente identificada como produtora de ESBLs (54%, 44/81) (Gráfico 1 e Tabela 3). O mesmo vem ocorrendo no resto do mundo, tal como foi retratado no Capítulo 1.4 (Coque *et al.*, 2008). *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs foram raramente detectadas (11%, 9/81). Contudo, ocorrência de *E. cloacae* produtores de ESBLs (14%, 11/81) é muito preocupante pois, na maior parte das vezes, esta bactéria para além de expressar o gene *bla*<sub>ESBL</sub>, também expressa beta-lactamases do tipo AmpC indutíveis e/ou adquiridas, o que dificulta a detecção da produção de ESBLs e o controlo da sua disseminação (Paterson *et al.*, 2006; Hanson *et al.*, 2008; Jacoby *et al.*, 2009).



**Gráfico 1** – Ocorrência de diferentes espécies de *Enterobacteriaceae* produtoras de

ESBLs. (\*) Outras espécies: 1 *P. mirabilis* e 2 *M. morgani* produtores de TEM-116; 1 *S. marcescens* e 1 *K. oxytoca* produtores de TEM-10; 1 *K. oxytoca*, produtora de SHV-12; 11 isolados (4 *E. coli*, 3 *E. cloacae*, 2 *K. oxytoca*, 1 *K. pneumoniae*, 1 *E. asburiae*), com resultado positivo no teste do duplo sinergismo e ausência de genes  $bla_{ESBL}$  do tipo TEM, SHV ou CTX-M.

O Gráfico 2 reflecte um pouco o aumento significativo da espécie *E. coli* como produtora de ESBLs que tem ocorrido nos últimos anos em hospitais Portugueses, em detrimento de *K. pneumoniae* (Machado *et al.*, 2007; E. Machado, comunicação pessoal). A ocorrência de *E. cloacae* como espécie produtora de ESBLs tem sofrido também um ligeiro incremento nos últimos anos (Machado *et al.*, 2007; E. Machado, comunicação pessoal). Verificou-se, contudo, uma ausência total de *E. aerogenes* produtores de ESBLs, anteriormente muito frequentes no hospital em estudo (Machado *et al.*, 2007). A emergência de espécies produtoras de ESBLs mais adaptadas ao ambiente hospitalar poderão justificar estas alterações (Hopkins *et al.*, 2006; Lavollay *et al.*, 2006; Cantón *et al.*, 2008).



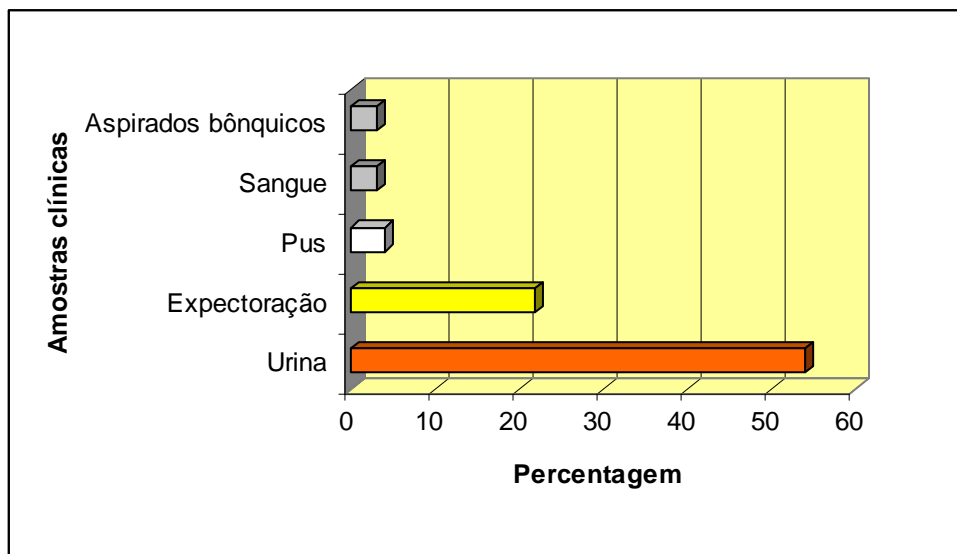
**Gráfico 2** – Ocorrência de diferentes espécies de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs no estudo efectuado no período 2002-2004 (Machado *et al.*, 2007) e no presente trabalho. (\*) Outras espécies: 1 *P. mirabilis* e 2 *M. morgani* produtores de TEM-116; 1 *S. marcescens* e 1 *K. oxytoca* produtores de TEM-10; 1 *K. oxytoca*, produtor de SHV-12; 11 isolados (4 *E. coli*, 3 *E. cloacae*, 2 *K. oxytoca*, 1 *K. pneumoniae*, 1 *E. asburiae*), com resultado positivo no teste do duplo sinergismo e ausência de genes  $bla_{ESBL}$  do tipo TEM, SHV ou CTX-M.

As ESBLs do tipo TEM foram observadas em todas as espécies de *Enterobacteriaceae* analisadas, enquanto ESBLs do tipo CTX-M apenas foram detectadas em *E. coli* (n=38). ESBLs do tipo SHV foram também identificadas em diversas espécies: *E. coli* (n=2), *K. pneumoniae* (n=6), *K. oxytoca* (n=1) e *E. cloacae* (n=9). O facto de ESBLs do tipo CTX-M apenas terem sido detectadas em *E. coli* não é corroborado por outros estudos, que descrevem a sua presença quer em *E. coli*, quer em *K. pneumoniae* (Machado *et al.*, 2006; Rossolini *et al.*, 2008). Contudo, investigações recentes, maioritariamente em isolados bacterianos Europeus, identificaram situações de clones epidémicos de *E. coli* produtores de CTX-M associados a plasmídeos contendo o gene  $bla_{CTX-M}$  (Cantón *et al.*, 2006), o que poderá justificar os resultados obtidos.

De acordo com os resultados observados para o hospital analisado, além de um aumento na ocorrência e variedade de ESBLs, verificou-se também um aumento na diversidade de espécies produtoras de ESBLs durante o período de tempo estudado.

#### 4. Distribuição de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs pelas diferentes amostras clínicas

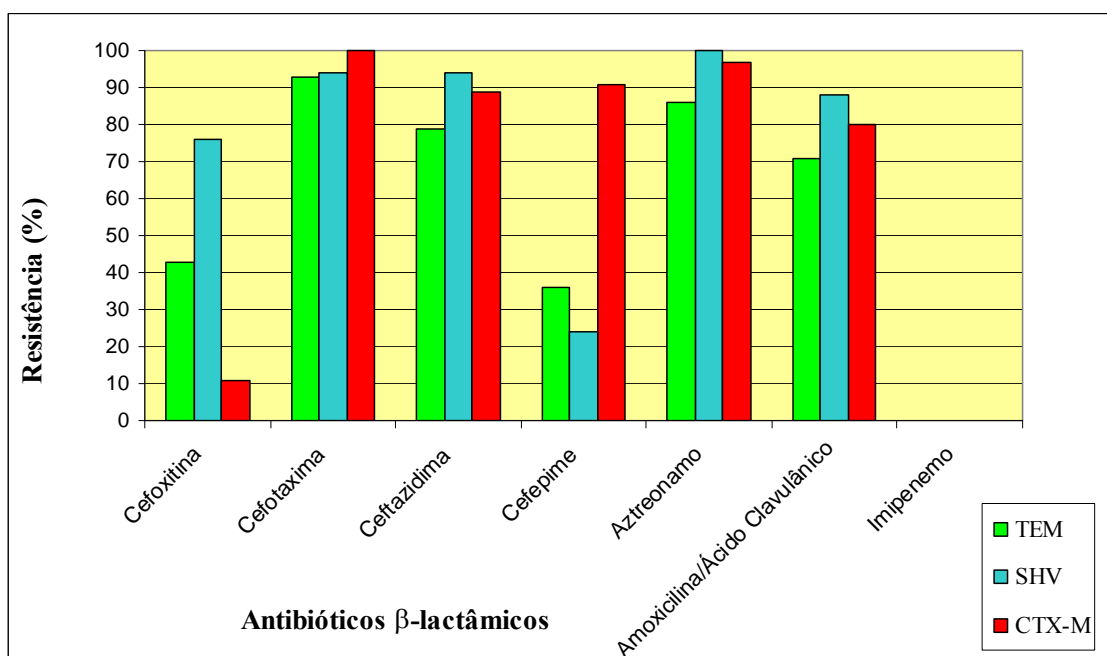
As *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs foram maioritariamente isoladas de amostras de urina (54%, 44/81), embora também tenham sido encontradas em amostras de expectoração (22%, 18/81), aspirados brônquicos (3%, 2/81), pus (4%, 3/81) e sangue (3%, 2/81) (Gráfico 3 e Tabela 3). As bactérias responsáveis por infecções urinárias têm frequentemente origem no intestino, significando que já estão a colonizar o mesmo (Vieira *et al.*, 2007). Assim sendo, a disseminação de ESBLs poderá não estar a ocorrer exclusivamente pela sua aquisição a nível hospitalar. A sua disseminação já estará, muito provavelmente, a ocorrer na comunidade e muitos dos tipos de ESBLs detectados no hospital terão origem na comunidade (por exemplo, através de colonização intestinal), tal como já foi descrito por outros autores (Machado *et al.*, 2004; Rodríguez-Baño *et al.*, 2008; Rossolini *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2008).



**Gráfico 3** – Distribuição de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs pelas diferentes amostras clínicas.

## 5. Resistência a antibióticos $\beta$ -lactâmicos em *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs

Os isolados produtores de ESBLs do tipo TEM, SHV e CTX-M foram maioritariamente não susceptíveis (resistentes ou com susceptibilidade intermédia) a cefalosporinas de largo espectro, nomeadamente, cefotaxima (93% versus 94% versus 100%, respectivamente) e ceftazidima (79% versus 94% versus 89%), a monobactams, como é o caso do aztreonamo (86% versus 100% versus 97%), e a associações de amoxicilina com o inibidor de beta-lactamases ácido clavulânico (71% versus 88% versus 80%), como pode ser observado no Gráfico 4.



**Gráfico 4** – Resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

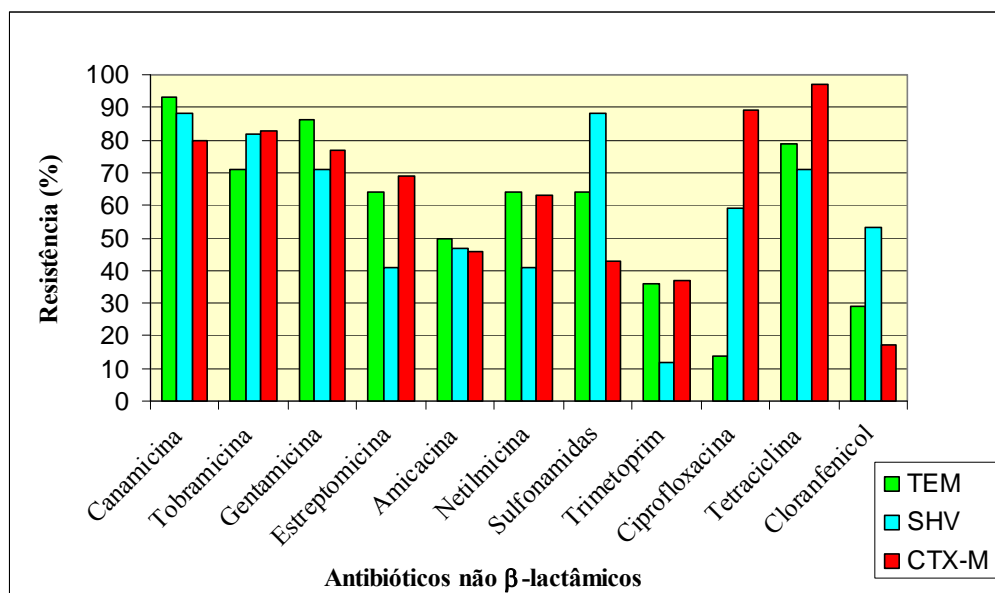
Neste estudo constatou-se que as ESBLs do tipo CTX-M hidrolisaram frequentemente a cefotaxima e a ceftazidima. Actualmente, existem já diversas enzimas do tipo CTX-M que hidrolisam eficazmente a ceftazidima, como é o caso de CTX-M-15 e de CTX-M-32 descritas neste trabalho (*consultar Capítulo 1.3*) (Oteo *et al.*, 2006). A elevada percentagem de isolados não susceptíveis à associação amoxicilina/ácido clavulânico poderá ser justificada pelo co-produção de vários tipos de beta-lactamases na maioria dos isolados produtores de ESBLs e/ou pela co-produção de ESBLs em espécies naturalmente produtoras de beta-lactamases do tipo AmpC, não inibidas pelo ácido clavulânico (Bradford, 2001; Philippon *et al.*, 2002).

**As taxas de resistência para a cefoxitina e cefepime variaram muito entre *Enterobacteriaceae* produzindo diferentes tipos de ESBLs.** Em relação à cefoxitina, a resistência foi de 43% para as ESBLs do tipo TEM enquanto que, para SHV e CTX-M foi de 76% e 11%, respectivamente. Estes valores de resistência poderão ser fundamentados por alterações nos canais de porina (Jacoby *et al.*, 1996) ou até mesmo pela co-produção de AmpCs cromossômicas (*Enterobacter* spp.) e/ou AmpCs plasmídicas (*E. coli*, *K. pneumoniae*) (Susić, 2004). Para o antibiótico cefepime observaram-se taxas de resistência de 36% para ESBLs do tipo TEM, 24% para ESBLs do tipo SHV e 91% para ESBLs do tipo CTX-M.

**O imipenemo foi o único  $\beta$ -lactâmico para o qual a taxa de resistência foi nula** em todas as *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs detectadas neste estudo. Este resultado pode ser fruto do uso mais restrito deste antibiótico. Os carbapenemos apenas devem ser administrados em situações de infecções moderadas a severas, a nível hospitalar, e nunca como antibiótico de primeira escolha (Sousa, 2006; Zhanel *et al.*, 2007). Apesar de já existirem relatos de resistência aos carbapenemos em *Enterobacteriaceae* (Sousa, 2006; Nordmann *et al.*, 2002), o mesmo não se constatou neste estudo, nem no estudo realizado no período 2002-2004 (Machado *et al.*, 2007). Pode-se assim supor que ainda não ocorreu a emergência e disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases no hospital em questão.

## **6. Co-resistência a antibióticos não $\beta$ -lactâmicos**

**Os isolados produtores de ESBLs do tipo TEM, SHV e CTX-M foram frequentemente não susceptíveis (resistentes ou com susceptibilidade intermédia) a tetraciclinas (79% versus 71% versus 97%), sulfonamidas (64%, 88%, 43%, respectivamente) e aminoglicosídeos, nomeadamente, canamicina (93%, 88%, 80%), tobramicina (71%, 82%, 83%), gentamicina (86%, 71%, 77%), e estreptomicina (64%, 41%, 69%), tal como pode ser observado no Gráfico 5.**



**Gráfico 5** – Co-resistência aos antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos em *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs.

A elevada resistência a aminoglicosídeos e sulfonamidas poderá ser um indicador de uma acumulação de plataformas genéticas que habitualmente albergam genes que codificam para mecanismos de resistência a esses antibióticos, como é o caso dos integrões (Livermore, 2003; Coque *et al.*, 2008). Livermore (2003) e Hall (1997) associam a ocorrência de integrões, contidos em plasmídeos e/ou transposões, com a disseminação de cassetes de genes que conferem resistência a sulfonamidas (*sulI*) e estreptomicina (*aadA*) (Hall, 1997), e estudos mais recentes têm vindo a confirmar este facto e a descrever a presença de outras cassetes de genes de resistência em integrões [*bla*<sub>ESBL</sub>, *bla*<sub>AmpC</sub>, *dfrA*, *catB*, *aac*-(6')-*Ib-cr*, entre outros] (Machado *et al.*, 2005; Mazel, 2006; Novais *et al.*, 2006).

**Em isolados de produtores de CTX-M observou-se frequentemente resistência à netilmicina (63%) e à ciprofloxacina (89%).** O comportamento de resistência à ciprofloxacina poderá ser atribuído a um aumento de mecanismos de resistência mediados por plasmídeos, incluindo proteínas Qnr (codificadas por genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* ou *qnrC*) (Wang *et al.*, 2009), acetilases [*aac*-(6')-*Ib-cr*] (Robicsek *et al.*, 2006) e sistemas de efluxo que bombeiam o antibiótico para fora da bactéria (*oqxAB*, *qepA*) (Strahilevitz *et al.*, 2009). Estudos moleculares mais aprofundados deverão ser desenvolvidos futuramente nestes isolados, de forma a identificar quais os genes envolvidos no mecanismo de resistência às quinolonas.

**As taxas de resistência para a ciprofloxacina variaram muito entre *Enterobacteriaceae* produtoras de diferentes tipos de ESBLs.** Em ESBLs do tipo TEM a resistência foi de 14%, enquanto que para SHV e CTX-M foi de 59% e 89%, respectivamente. O mesmo se notou para o cloranfenicol, com taxas de resistência de 29% para ESBLs do tipo TEM, 53% para ESBLs do tipo SHV e 17% para ESBLs do tipo CTX-M.

**A taxa de resistência ao antibiótico amicacina foi a mais baixa (47%), quando comparada com as de outros antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos,** provavelmente devido à sua utilização como antibiótico de reserva (dado o seu amplo espectro de actividade) e ao seu uso exclusivo a nível hospitalar (Sousa, 2006; *Prontuário Terapêutico*, 2010). Contudo, este valor representa por si só uma resistência elevada. Apesar disso, na terapêutica empírica ainda poderá ser visto como uma mais valia, pois o seu uso não tem conduzido a um aumento significativo da resistência.

## **7. Ocorrência do gene *qepA* em *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs**

O gene *qepA* tem sido recentemente associado a *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs do tipo CTX-M (Cattoir *et al.*, 2008; Baudry *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009), sendo um dos mecanismos apontados para a diminuição da susceptibilidade às fluoroquinolonas hidrofílicas em diversos isolados (sobretudo *E. coli* e *E. cloacae*) (Cattoir *et al.*, 2008; Baudry *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009). A elevada taxa de resistência à ciprofloxacina observada entre as *Enterobacteriaceae* produtoras ESBLs incluídas neste estudo, assim como a escassez de trabalhos de pesquisa de *qepA* em colecções de isolados produtores de ESBLs (Cattoir *et al.*, 2008; Crémet *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009), conduziu à investigação da ocorrência deste gene no presente trabalho. Contudo, não foi detectado o gene *qepA* entre os isolados produtores de ESBLs analisados. Outros genes, no entanto, poderão estar envolvidos, como é o caso do gene *aac-(6')-Ib-cr*, muito associado a isolados produtores de ESBLs do tipo CTX-M-15 (Cantón *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2007).

## V. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que no hospital analisado ocorreu um aumento na ocorrência e diversidade de ESBLs, assim como das espécies produtoras destas enzimas, sendo especialmente prevalentes as *Enterobacteriaceae* produtoras de CTX-M-15 e de SHV-12. Estes dados contrastam com estudos anteriores (2002-2004), em que é relatada uma baixa ocorrência de ESBLs neste hospital, correspondendo apenas a *Enterobacter* sp. produtores de TEM (maioritariamente TEM-24) (Machado *et al.*, 2007). A presente informação epidemiológica confirma uma alteração na distribuição de ESBLs no sentido do aumento de CTX-Ms em hospitais Portugueses, já antecipada em trabalhos anteriores e verificada em outras regiões geográficas.

A disseminação de clones epidémicos e de plasmídeos que albergam ESBLs e genes de resistência a outros antibióticos poderão estar a contribuir para este cenário epidemiológico. No futuro serão necessários estudos moleculares aprofundados para recolher dados epidemiológicos mais detalhados, investigar uma possível evolução de genes específicos dentro de um determinado clone ou a disseminação de elementos genéticos entre estirpes bacterianas deste hospital, e delinear políticas de intervenção que previnam a sua disseminação.

## VI. BIBLIOGRAFIA

Ambler, R. P. (1980). The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical transactions of the royal society of London. Series B, Biological sciences*, 289 (1036), pp. 321-31.

Baquero, F. *et al.* (1998). Antibiotic-selective environments. *Clinical Infectious Diseases*, 27 (S1), S5-11.

Barroso, H. *et al.* (2000). Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases at a Portuguese hospital: TEM-10 as the endemic enzyme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45 (5), pp. 611-6.

Baudry, P. J. *et al.* (2009). Mechanisms of resistance and mobility among multidrug-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli* from Canadian intensive care units: the 1st report of *qepA* in North America. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63 (3), pp. 319-26.

Bauernfeind, A., Chong, Y., Scweighart, S. (1989). Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection*, 17 (5), pp. 316-21.

Ben-Ami, R. *et al.* (2006). Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. *Clinical Infectious Diseases*, 42 (7), pp. 925-34.

Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153 Suppl 1:S347-57.

Bert, F., Branger, C., Lambert-Zechovsky, N. (2002). Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50 (1), pp.11-8.

Biendo, M. *et al.* (2008). Successive emergence of extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacter aerogenes* isolates in a university hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (3), pp. 1037-44.

Bioline. [Em linha]. Disponível em: [http://www.bioline.com/h\\_ladderguide.asp](http://www.bioline.com/h_ladderguide.asp). [Consultado em 5/02/2010].

Bisson, G. *et al.* (2002). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: risk factors for colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 23 (5), pp. 254-60.

Bogaerts, P. *et al.* (2007). Emergence of Arma and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59 (3), pp. 459-64.

Bonnedahl, J. *et al.* (2009). Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. *PloS One*, 4 (6), e5958.

Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (1), pp. 1-14.

Bouchillon, S. K. *et al.* (2004). Determining incidence of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001-2002. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24 (2), pp. 119-24.

Boyd, D. A. *et al.* (2004). Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harbouring the CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase involved in an outbreak in long-term care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (10), pp. 3758-64.

Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4): 933-51.

Brigante, G. *et al.* (2005). Evolution of CTX-M-type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25 (2), pp. 157-62.

Briñas, L. *et al.* (2005). Monitoring and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (3), pp. 1262-4.

Brízio, A. *et al.* (2006). Survey of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from a Portuguese hospital and characterisation of a novel class 1 integron (In60A) carrying the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28 (4), pp. 320-4.

Brown, T. A. (2002). *Genomes*. New York and London, Ed. Garland Science, Second Edition.

Brown, S., Amyes, S. (2006). OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57 (1), pp. 1-3.

Bush, K. (1989). Characterization of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33 (3), pp. 259-63.

Bush, K. (1989). Classification of  $\beta$ -lactamases: groups 1, 2a, 2b and 2b'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33 (3), pp. 264-70.

Bush, K. (1989). Classification of  $\beta$ -lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3 and 4. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33 (3), pp. 271-6.

Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39 (6), pp. 1211-33.

Bush, K. (2001). New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 32 (7), pp. 1085-9.

Bush, K., Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (3), pp. 969-76.

Cano, M. E. *et al.* (2009). Detection of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Enterobacter* spp. in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (7), pp. 2033-9.

Cantón, R. *et al.* (2002). Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (4), pp. 1237-43.

Cantón, R., Coque, T. M., Baquero, F. (2003). Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16 (4), pp. 315-25.

Cantón, R., Coque, T. (2006). The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9 (5), pp. 466-75.

Cantón, R. *et al.* (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (1), pp. 144-53.

Cantón R. (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clinical Microbiology and Infection*, 15 Suppl 1: 20-5.

Carattoli, A. (2008). Animal reservoirs for extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (1), 117-23.

Carrër, A. *et al.* (2008). Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (8), pp. 2950-4.

Cattoir, V. *et al.* (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60 (2), pp. 394-7.

Cattoir, V., Poirel, L., Nordmann, P. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (10), pp. 3801-4.

Cattoir, V., Nordmann, P. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Current Medicinal Chemistry*, 16 (8), pp. 1028-46.

Chaibi, E. B. *et al.* (1999). Inhibitor-resistant TEM beta-lactamase: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43 (4), pp. 447- 58.

Chevalier, J. *et al.* (2008). Identification and evolution of drug efflux pump in clinical *Enterobacter aerogenes* strains isolated in 1995 and 2003. *PLoS One*, 3 (9), pp. e3203.

Chmelnitsky, I. *et al.* (2005). CTX-M-2 and a new CTX-M-39 enzyme are the major extended-spectrum beta-lactamases in multiple *Escherichia coli* clones isolated in Tel Aviv, Israel. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (11), pp. 4745-50.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 17th. Approved standard M100-S17. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI, Wayne, Pa.

Cloeckaert, A. *et al.* (2007). Dissemination of an extended-spectrum-beta-lactamase *bla*<sub>TEM-52</sub> gene-carrying Inc11 plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (5), pp. 1872-5.

Coenen, S. *et al.* (2006). European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient cephalosporin use in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58 (2), pp. 413-7.

Coque, T. M. *et al.* (2002). Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, pp. 500-10.

Coque, T. M., Baquero, F., Cantón, R. (2008). Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveillance*, 13 (47), pp. 1-11.

Coque, T. M. *et al.* (2008). Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (2), pp. 195-200.

Cornaglia, G., Garau, J., Livermore, D. M. (2008). Living with ESBLs. Introduction. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 Suppl 1: 1-2.

Costa, D. *et al.* (2009). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Veterinary Microbiology*, 138 (3-4), pp. 339-44.

Coudron, P. E., Moland, E. S., Sanders, C. C. (1997). Occurrence and detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a veteran's medical center: seek and you may find. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (10), pp. 2593-7.

Crémet, L. *et al.* (2009). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL *Enterobacteriaceae* clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. *Pathologie- Biologie*, [Epub ahead of print].

Dalsgaard, A. *et al.* (2000). Class 1 integron-borne, multiple-antibiotic resistance encoded by a 150-kilobase conjugative plasmid in epidemic *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Guinea-Bissau. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (10), pp. 3774-9.

Damjanova, I. *et al.* (2007). Epidemiology of SHV-type beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. from outbreaks in five geographically distant Hungarian neonatal intensive care units: widespread dissemination of epidemic R-plasmids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29 (6), pp. 665-71.

Datta, N., Kontomichalou, P. (1965). Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature*, 208 (5007), pp. 239-41.

David, M., Lemeland, J. F., Boyer, S. (2008). Emergence of extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: about 24 cases at Rouen University Hospital. *Pathologie- Biologie*, 56 (7- 8), pp. 429-34.

Dedic-Ljubovic, A. *et al.* (2009). Emergence of CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Bosnia and Herzegovina. *Clinical Microbiology and Infection*, 16 (2), pp. 152-6.

Drieux, L. *et al.* (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (5), pp. 21-4.

Du Bois, S. K., Marriot, M. S., Amyes, S. G. (1995). TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases: relationship between selection, structure and function. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35 (1), pp. 7-22.

Dumarche, P. *et al.* (2002). TEM derivative-producing *Enterobacter aerogenes* strains: dissemination of a prevalent clone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (4), pp. 1128-31.

Edelstein, M. *et al.* (2003). Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (12), pp. 3724-32.

FAAIR Scientific Advisory Panel. (2002). Policy recommendations. *Clinical Infectious Diseases*, 34 (S3), S76-7.

Faculty.irsc.edu. [Em linha]. Disponível em: <http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/images/enterobacteriaceae.jpg> [Consultado em 15/10/09].

Falagas, M. E., Karageorgopoulos, D. E. (2009). Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *The Journal of Hospital Infection*, 73 (4), pp. 345-54.

Ferreira, W. F. C., Sousa, J. C. (2000). *Microbiologia*. Porto, Edição Lidel, Volume 2.

Fosse, T. *et al.* (2004). *Aeromonas hydrophila* with plasmid-borne class A extended-spectrum beta-lactamase TEM-24 and three chromosomal class B, C, and D beta-lactamases, isolated from a patient with necrotizing fasciitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (6), pp. 2342-3.

Galas, M. *et al.* (2008). Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (2), pp. 786-9.

Girlich, D. *et al.* (2007). Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (14), pp. 4681-5.

Goossens, H. *et al.* (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*, 365 (9459), pp. 579-87.

Goussard, S. *et al.* (1991). An IS1-like element is responsible for high-level synthesis of extended-spectrum beta-lactamase TEM-6 in *Enterobacteriaceae*. *Journal of General Microbiology*, 137 (12), pp. 2681-7.

Griffiths, A. J. F. *et al.* (1999). *Introduction to Genetic Analysis*. Ed. W. H. Freeman and Company, Seventh Edition, New York.

Guimarães, B. *et al.* (2009). Genetic detection of extended-spectrum beta-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates and vancomycin-resistant enterococci in fecal samples of healthy children. *Microbial Drug Resistance*, 15 (3), pp. 211-6.

Hall, R. M., Collis, C. M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology*, 15 (4), pp. 593-600.

Hall, R. M. (1997). Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Foundation Symposium*, 207, pp. 192-202.

Hanson, N. D., Sanders, C. C. (1999). Regulation of inducible Amp-C  $\beta$ -lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. *Current Pharmaceutical Design*, 5 (11), pp. 881-94.

Hanson, N. D. *et al.* (2008). Surveillance of community-based reservoirs reveals the presence of CTX-M, imported AmpC, and OXA-30  $\beta$ -lactamases in urine isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in a U. S. community. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (10), pp. 3814-6.

Hasman, H. *et al.* (2005). Beta-lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56 (1), pp. 115-21.

Hawkey, P. M. (2008). The growing burden of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62 Suppl 1: i1-9.

Hawkey, P. M., Jones, A. M. (2009). The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64 Suppl 1: i3-10.

Hernández, J. R. *et al.* (2005). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (5), pp. 2122-5.

Honoré, N., Nicolas, M. H., Cole, S. T. (1986). Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 5 (13), pp. 3709-14.

Hopkins, K. L. *et al.* (2006). Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (9), pp. 3203-6.

Humeniuk, C. *et al.* (2002). Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (9), pp. 3045-9.

Huovinen, P., Huovinen, S., Jacoby, A. (1988). Sequence of PSE-2 beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32 (1), pp. 134-6.

Jacoby, G. A., Han, P. (1996). Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (4), pp. 908-11.

Jacoby, G. A., Munoz-Price, L. S. (2005). The new beta-lactamases. *The New England Journal of Medicine*, 352 (4), pp. 380-91.

Jacoby, G. A. (2009). AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22 (1), pp. 161-82.

Jarlier, V. *et al.* (1988). Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactams agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10 (4), pp. 867-78.

Jaurin, B., Grundström, T. (1981). ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78 (8), pp. 4897-901.

Jones, G. L. *et al.* (2008). Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62 (6), pp. 1245-51.

Knothe, H. *et al.* (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11 (6), pp. 315-7.

Lahey clinic. [Em linha]. Disponível em: <http://www.lahey.org/Studies/>. [Consultado em 30/04/10].

Lartigue, M. F., Poirel, L., Nordmann, P. (2004). Diversity of genetic environment of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. *FEMS Microbiology Letters*, 234 (2), pp. 201-7.

Lartigue, M. F. *et al.* (2007). Extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M type now in Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (8), pp. 2855-60.

Lau, S. H. *et al.* (2008). UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15  $\beta$ -lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62 (6), pp.1241-4.

Lautenbach, E. *et al.* (2001). Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Infectious Diseases*, 33 (8), pp. 1288-94.

Lavigne, J. P. *et al.* (2004). Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in a French hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (8), pp. 3805-8.

Lavilla, S. *et al.* (2008). Dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria: the food-borne outbreak lesson. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61 (6), pp. 1244-51.

Lavilla, S. *et al.* (2008). Prevalence of *qnr* genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61 (2), pp. 291-5.

Lavollay, M. *et al.* (2006). Clonal dissemination of a CTX-M-15  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis, and Bangui. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (7), pp. 2433–8.

Lewis, J. S. 2nd *et al.* (2007). First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (11), pp. 4015-21.

Libisch, B. *et al.* (2008). Identification of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from Hungary and Serbia. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 54 (3), pp. 330-8.

Livermore, D. M. (1987). Mechanisms of resistance to cephalosporin antibiotics. *Drugs*, 34 Suppl 2: S64-88.

Livermore, D. M. (1995).  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8 (4), pp. 557-84.

Livermore, D. M. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical Infectious Diseases*, 36 Suppl 1: S11-23.

Livermore, D. M. *et al.* (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59 (2), pp. 165-74.

Livermore, D. M. (2009). Beta-lactamases - the threat renews. *Current Protein Peptide Science*, 10 (5), pp. 397-400.

Lodish, H. *et al.* (1999). *Molecular Cell biology*. New York, Ed. W. H. Freeman & Co., Fourth Edition.

Lösch, L. S., Alonso, J. M., Merino, L. A. (2008). Occurrence of antimicrobial-resistant *Enterobacteriaceae* in water from different sources in a subtropical region of Argentina. *Revista Ambiente & Água*, V.3, N°.2.

Ma, J. *et al.* (2009). High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (2), pp. 519-24.

Machado, E. *et al.* (2004). Emergence of CTX-M beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Portugal: report of an *Escherichia coli* isolate harbouring *bla*<sub>CTX-M-14</sub>. *Clinical Microbiology and Infection*, 10 (8), pp. 755-7.

Machado, E. *et al.* (2006). Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (9), pp. 3220-1.

Machado, E. *et al.* (2007). High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60 (6), pp. 1370-4.

Machado, E. *et al.* (2008). Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62 (2), pp. 296-302.

Machado, E. *et al.* (2009). Leakage into Portuguese aquatic environments of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63 (3), pp. 616-8.

Mahamoud, A. *et al.* (2007). Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59 (6), pp. 1223-9.

Mammeri, H. *et al.* (2005). Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (1), pp. 71-6.

Marcadé, G. *et al.* (2009). Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63 (1), pp. 67-71.

Marchandin, H. *et al.* (2003). Extended-spectrum beta-lactamase TEM-24 in an *Aeromonas* clinical strain: acquisition from the prevalent *Enterobacter aerogenes* clone in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (12), pp. 3994-5.

Markovska, R. *et al.* (2008). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Bulgarian hospitals. *Microbial Drug Resistance*, 14 (2), pp. 119-28.

Martínez, J. L., Baquero, F. (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (4), pp. 647-79.

Martínez, J. L. *et al.* (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 33 (2), pp. 430-49.

Mazel D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews. Microbiology*, 4 (8), pp. 608-20.

Mendonça, N. *et al.* (2006). CTX-M-15, OXA-30 and TEM-1-producing *Escherichia coli* in two Portuguese regions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57 (5), pp. 1014-6.

Mendonça, N. *et al.* (2007). Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (6), pp. 1946-55.

Mesa, R. J. *et al.* (2006). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58 (1), pp. 211-25.

Mitsuhashi, S., Inoue, M. (1981). *Beta-lactam antibiotics*. New York, Ed. S. Mitsuhashi, pp. 41-56.

Morosini, M. I. *et al.* (2006). Antibiotic co-resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and in vitro activity of tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (8), pp. 2695-9.

Mshana, S. E. *et al.* (2009). Conjugative IncFI plasmids carrying CTX-M-15 among *Escherichia coli* ESBL producing isolates at a University hospital in Germany. *BMC Infectious Diseases*, 9, pp. 97.

Murphy, C. *et al.* (2009). Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: A preliminary study. *The Canadian Veterinary Journal*, 50 (10), pp. 1047-53.

Murray, P. R. *et al.* (2003). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, Ed. American Society for Microbiology Press, Octave Edition.

Naas, T. *et al.* (2006). Complex genetic structures with repeated elements, a *sul*-type class 1 integron, and the *bla*<sub>VEB</sub> extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (5), pp. 1745-52.

Naseer, U. *et al.* (2007). Nosocomial outbreak of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* in Norway. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 115 (2), pp. 120-6.

Nicolas-Chanoine, M. H. *et al.* (2008). Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61 (2), pp. 273-81.

Nordmann, P., Poirel, L. (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection*, 8 (6), pp. 321-31.

Nordmann, P., Poirel, L. (2005). Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56 (3), pp. 463-9.

Novais, A. *et al.* (2006). Dissemination and persistence of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from *Tn402* located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1- $\alpha$ , and IncFI groups. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (8), 2741-50.

Novais, A. *et al.* (2007). Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (2), pp. 796-9.

Novais, A. *et al.* (2010). International spread and persistence of TEM-24 is caused by the confluence of highly penetrating *Enterobacteriaceae* clones and an IncA/C2 plasmid containing *Tn1696::Tn1* and *IS5075-Tn21*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (2), pp. 825-34.

Nyberg, S. D. *et al.* (2007). Detection and molecular genetics of extended-spectrum beta-lactamases among cefuroxime-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolates from Finland, 2002-2004. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 39 (5), pp. 417-24.

Oliver, A. *et al.* (2001). Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (2), pp. 616-20.

Oliver, A. *et al.* (2005). CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* in a Spanish hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (4), pp. 1567-71.

Österblad, M. *et al.* (1999). Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43 (4), pp. 503-9.

Oteo, J., Campos, J. (2003). Value of antibiotic resistance surveillance systems. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21 (3), pp. 123-5.

Oteo, J. *et al.* (2006). Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospitals institutions. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (7), pp. 2359-66.

Ouellette, M., Bissonnette, L., Roy, P.H. (1987). Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1  $\beta$ -lactamase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84 (21), pp. 7378-82.

Pagès, J. M., Amaral, L. (2009). Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794 (5), pp. 826-33.

Partridge, S. R., Hall, R. M. (2005). Gene cassettes potentially encoding fosfomicin resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (2), pp. 860-1.

Paterson, D. L. *et al.* (2001). Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (6), pp. 2206-12.

Paterson, D. L., Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18 (4), pp. 657-86.

Paterson, D. L. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Infection Control*, 34 Suppl 1: S20-8.

Perez, F. *et al.* (2007). The continuing challenge of ESBLs. *Current Opinion in Pharmacology*, 7 (5), pp. 459- 69.

Pérez-Pérez, F. J., Hanson, N. D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (6), pp. 2153-62.

Perilli, M. *et al.* (1997). Characterization of a new TEM-derived  $\beta$ -lactamase produced in a *Serratia marcescens* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41 (11), pp. 2374-82.

Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined Amp-C-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (1), pp. 1-11.

Pitout, J. D. *et al.* (1998).  $\beta$ -lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42 (6), pp. 1350-4.

Pitout, J. D., Hossain, A., Hanson, N. D. (2004). Phenotypic and molecular detection of CTX-M- $\beta$ -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (12), pp. 5715-21.

Pitout, J. D., Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, 8 (3), pp. 159-66.

Pitout, J. D. *et al.* (2008). Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of *aac(6')-Ib-cr*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61 (5), pp. 999-1002.

Poeta, P. *et al.* (2009). Genetic characterization of antibiotic resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* carrying extended-spectrum beta-lactamases recovered from diarrhoeic rabbits. *Zoonoses and Public Health*, 57 (3), pp. 162-70.

Poirel, L. *et al.* (1999). Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43 (3), pp. 573-81.

Poirel, L. *et al.* (2000). Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (4), pp. 891-7.

Poirel, L., Kämpfer, P., Nordmann, P. (2002). Chromosome-encoded Ambler class A  $\beta$ -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 46 (12), pp. 4038-40.

Poirel, L., Decousser, J. W., Nordmann, P. (2003). Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*<sub>CTX-M</sub> beta-lactamase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (9), pp. 2938-45.

Poirel, L., Leviandier, C., Nordmann, P. (2006). Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (12), pp. 3992-7.

Poole, K. (2004). Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61 (17), pp. 2200-23.

Prontuário Terapêutico. [Em linha]. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/prontuario/framecapitulos.html>. [Consultado em 10/04/10]

Queenan, A. M., Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20 (3), pp. 440-58.

Rasheed, J. K. *et al.* (1997). Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteraemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, pp. 647-53.

Recchia, G. D., Hall, R. M. (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*, 141 (Pt 12), pp. 3015-27.

Richmond, M.H., Sykes, R.B. (1973). The  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Advances in Microbial Physiology*, 9, pp. 31-88.

Robicsek, A., Jacoby, G. A., Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infectious Diseases*, 6 (10), pp. 629-40.

Robin, F. *et al.* (2006). CMT-type beta-lactamase TEM-125, an emerging problem for extended-spectrum beta-lactamase detection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (7) pp. 2403-8.

Rodríguez-Baño, J. *et al.* (2006). Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. *Clinical Infectious Diseases*, 42 (1), pp. 37-45.

Rodríguez-Baño, J., Pascual, A. (2008). Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6 (5), pp. 671-83.

Rossolini, G. M., Docquier, J. D. (2006). New beta-lactamases: a paradigm for the rapid response of bacterial evolution in the clinical setting. *Future Microbiology*, 1, pp. 295-308.

Rossolini, G. M., D'Andrea, M. M., Mugnaioli, C. (2008). The spread of CTX-M-type extended-spectrum- $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (1), pp. 33-41.

Ruppé, E. *et al.* (2009). Carriage of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates among children living in a remote village in Senegal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (7), pp. 3135-7.

Sabtcheva, S. *et al.* (2008). Nosocomial spread of *armA*-mediated high-level aminoglycoside resistance in *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-3 beta-lactamase in a cancer hospital in Bulgaria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 20 (5), pp. 593-9.

Salgado, C. D., O'Grady, N., Farr, B. M. (2005). Prevention and control of antimicrobial-resistant infections in intensive care patients. *Critical Care Medicine*, 33 (10), pp. 2373-82.

Sanguinetti M. *et al.* (2003). Characterization of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD Phoenix extended-spectrum beta-lactamase detection method. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (4), pp. 1463-6.

Sawai, T., Mitsuhashi, S., Yamagishi, S. (1968). Comparison of the chromosomal and extrachromosomal genetic determinants controlling staphylococcal penicillinase production. *Japanese Journal of Microbiology*, 12 (4), pp. 531-3.

Schwarz, S., Chaslus-Dancla, E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, 32 (3-4), pp. 201-25.

Sirot, D. *et al.* (1987). Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 20 (3), pp. 323-34.

Société Française de Microbiologie. [Em linha]. Disponível em: <http://www.sfm.asso.fr/>. [Consultado em 30/04/10].

Soderblom, T., Struwe, J. (2007). Extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: the first six months of notifications according to the Swedish communicable disease act. *Euro Surveillance*, 12 (10), pp. E071018.1.

Song, W. *et al.* (2009). CTX-M-14 and CTX-M-15 enzymes are the dominant type of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. *Journal of Medical Microbiology*, 58 (Pt 2), pp. 261-6.

Sougakoff, W. *et al.* (1988). Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Reviews of Infectious Diseases*, 10 (4), pp. 879-84.

Sousa, J. C. (2006). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Porto, Ed. Universidade Fernando Pessoa, Segunda Edição.

Strahilevitz, J. *et al.* (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 22 (4), pp. 664-89.

Stuart, B. L., O'Brien, T. F. (2005). Global antimicrobial resistance alerts and implications. *Clinical Infectious Diseases*, 41 Suppl 4: S219-20.

Susić, E. (2004). Mechanisms of resistance in *Enterobacteriaceae* towards beta-lactamase antibiotics. *Acta Medica Croatica*, 58 (4), pp. 307-12.

Sykes, R. B., Matthew, M. (1976). The  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2 (2), pp. 115-57.

The Free Dictionary. [Em linha]. Disponível em: <http://img.tfd.com/mgh/ceb/thumb/Four-common-mechanisms-of-antibiotics-resistance.jpg> [Consultado em 24/03/2010].

Toleman, M. A., Bennett, P. M., Walsh, T. R. (2006). ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70 (2), pp. 296-316.

Tomasz, A. (1986). Penicillin-binding proteins and the antibacterial effectiveness of beta-lactam antibiotics. *Reviews of Infectious Diseases*, 8 Suppl 3: S260-78.

Torres, C., Zarazaga, M. (2007). ESBL in animals and their importance in transmission to humans. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25 Suppl 2: 29-37.

Tzouvelekis, L. S., Bonomo, R. A. (1999). SHV-type beta-lactamases. *Current Pharmaceutical Design*, 5 (11), pp. 847-64.

Valverde, A. *et al.* (2004). Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (10), pp. 4769-75.

Valverde, A. *et al.* (2008). High rate of intestinal colonization with extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (8), pp. 2796-99.

van de Sande-Bruinsma, N. *et al.* (2008). Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (11), pp. 1722-30.

Vander Stichele, R.H. *et al.* (2006). Hospital consumption of antibiotics in 15 European countries: results of the ESAC retrospective data collection (1997–2002). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58 (1), pp. 159-67.

Vieira, J. M. S. *et al.* (2007). Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, Belém – PA. *Revista Brasileira de Analises Clinicas*, 39 (2), pp.119-21.

Vila J., Martínez, J. L. (2008). Clinical impact of the over-expression of efflux pump in nonfermentative Gram-negative bacilli, development of efflux pump inhibitors. *Current Drug Targets*, 9 (9), pp. 797-807.

Walther-Rasmussen, J., Høiby, N. (2004). Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum beta-lactamases. *Canadian Journal of Microbiology*, 50 (3), pp. 137-65.

Walther-Rasmussen, J., Høiby, N. (2007). Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60 (3), pp. 470-82.

Wang, M. *et al.* (2009). New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (5), pp. 1892-7.

Wei, Z. Q. *et al.* (2007). Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (2), pp. 763-5.

Williams, R. J., Heymann, D. L. (1998). Containment of antibiotic resistance. *Science*, 279 (5354), pp. 1153-4.

Williams, R. J., Ryan, M. J. (1998). Surveillance of antimicrobial resistance - an international perspective. *British Medical Journal*, 317 (7159), pp. 651-60.

Witte, W. (2000). Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14 (4), pp. 321-5.

Woodford, N. *et al.* (2008). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum beta-lactamases in the United Kingdom. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62 (6), pp. 1265-8.

Yim, G. (2009). Attack of the superbugs: antibiotic resistance. *The Science Creative Quarterly*, (4).

Yumuk, Z. *et al.* (2008). Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62 (2), pp. 284-8.

Zahar, J. R. *et al.* (2009). Addressing the challenge of extended-spectrum beta-lactamases. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 10 (2), pp. 172-80.

Zhanel, G. G. *et al.* (2007). Comparative review of the carbapenems. *Drugs*, 67 (7), pp. 1027-52.

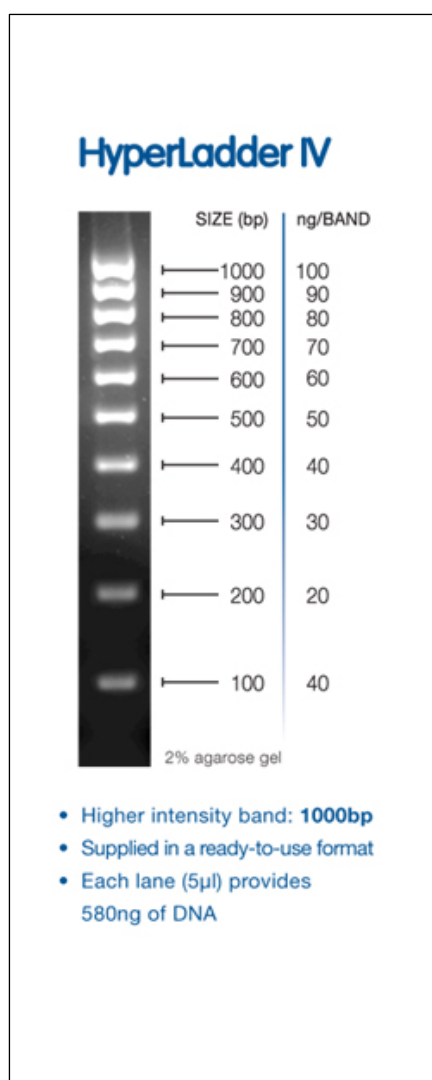
Zong, Z., Partridge, S. R., Iredell, J. R. (2009). A *bla*<sub>VEB-1</sub> variant, *bla*<sub>VEB-6</sub>, associated with repeated elements in a complex genetic structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (4), pp. 1693-7.

## **VII. ANEXOS**

## **ANEXO 1**

### Marcador de Peso Molecular

### HyperLadder IV (extraído de *Bioline™*)



**ANEXO 2**

*POSTER* apresentado no 19<sup>th</sup> *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ECCMID 2009), Helsínquia, Finlândia, 16-19 Maio 2009

**Responsável pela apresentação:**

**Teresa Maria Pinto Gonçalves**