



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2013

**Catarina Salomé da
Cruz Brandão**

**Aplicação de testes fenotípicos para
deteção de AmpC**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2013

**Catarina Salomé da
Cruz Brandão**

Aplicação de testes fenotípicos para deteção de AmpC

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica especialização em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica do Professor Dr. Elmano José da Cruz Ramalheira, professor auxiliar da Universidade de Aveiro e Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospital do Baixo Vouga, EPE – Hospital Infante D.Pedro, Aveiro, e Doutora Sónia Cristina das Neves Ferreira, Diretora do Departamento de Saúde, Ciência e Educação do Instituto da Educação e Cidadania, Mamarrosa.

“Para ver o arco-íris, é preciso não temer a chuva.”

Paulo Coelho

O júri

Presidente

Doutora Rita Maria Pinho Ferreira

Professora auxiliar convidada do Departamento de Química,
Universidade de Aveiro

Vogais

Doutor Nuno Ricardo Furtado Dias Mendonça

Investigador do Centro de Estudos Farmacêuticos, Faculdade de
Farmácia, Universidade de Coimbra

Dr. Elmano José da Cruz Ramalheira

Professor auxiliar convidado, Secção autónoma de Ciências da
Saúde, Universidade de Aveiro

Doutora Sónia Cristina das Neves Ferreira

Diretora do Departamento de Saúde, Ciência e Educação,
Instituto da Educação e Cidadania, Mamarrosa

Agradecimentos

Gostaria de deixar uma palavra de apreço ao Dr. Elmano e à Doutora Sónia, pela oportunidade concedida, pelo tempo dispensado e pela contribuição para a minha formação académica e pessoal.

Um obrigado ao setor de Microbiologia do Hospital Infante D. Pedro, e a todos os que nele trabalham.

Palavras-chave

Enterobacteriaceae, antibióticos β -lactâmicos, mecanismos de resistência antimicrobiana, β -lactamase do tipo AmpC, Vitek, cefoxitina, *AmpC detection set D69C*.

Resumo

A seletividade, eficácia e espectro de ação dos antibióticos β -lactâmicos faz deles a classe de antimicrobianos mais comumente prescritos para o tratamento de infecções causadas por enterobactérias. As β -lactamases surgem como um dos principais mecanismos de resistência microbiano aos antibióticos β -lactâmicos, onde as β -lactamases do tipo AmpC se assumem como clinicamente relevantes, ao conferir resistência à maioria das penicilinas, cefalosporinas e combinações de β -lactâmico/inibidor de β -lactamase.

A dificuldade na detecção deste mecanismo de resistência antimicrobiana, associada a múltiplos genes de resistência de rápida evolução e transmissão bem como a inexistência, até à data, de *guidelines* de referência para a detecção de AmpC constitui um desafio no diagnóstico para o laboratório de microbiologia, que carece de uma estratégia definida para a pesquisa destas enzimas, a ser implementada na rotina hospitalar.

São vários os métodos propostos para a detecção destas enzimas, quer genotípicos, quer fenotípicos. No último grupo podem destacar-se os que detetam a atividade AmpC em extratos enzimáticos e os que avaliam o efeito induzido pelos inibidores de AmpC sobre as enzimas.

No presente trabalho foram usados discos de cefoxitina, cujo resultado foi comparado com um kit da casa comercial MAST, para a pesquisa e detecção de AmpC em 50 isolados bacterianos. O uso de discos de cefoxitina (30 μ g) para o *screening* destas enzimas mostrou-se sensível e específico. O teste fenotípico confirmatório da MAST revelou-se uma ferramenta útil na confirmação da presença destas enzimas. No contexto deste estudo, ambos os testes foram validados para introdução na rotina hospitalar.

Keywords

Enterobacteriaceae, β -lactam antibiotics, resistance mechanisms, AmpC β -lactamase, Vitek, ceftiofuran, *AmpC detection set D69C*.

Abstract

The selectivity, efficacy and spectrum of action of β -lactam antibiotics make them the class of antibiotics most commonly prescribed to treat infections caused by *Enterobacteriaceae*. The β -lactamases emerged as one of the major mechanisms of microbial resistance to β -lactam antibiotics, where the AmpC β -lactamases themselves are clinically relevant, conferring resistance to most penicillins, cephalosporins and combinations of β -lactam/ β -lactamase inhibitor.

Detecting this mechanism of antimicrobial resistance can be difficult because it is associated with multiple resistance genes. Moreover, the lack of guidelines for detection of AmpC is a challenge in a microbiology laboratory. Therefore a strategy to detect this type of enzymes is needed, to be implemented in the daily routine.

There are several methods proposed for the detection of the enzyme, either genotypic or phenotypic. In the latter group can be underlined those that detect the activity of AmpC in enzyme extracts and those who evaluate the effect induced by inhibitors on AmpC enzymes.

In the present study, the results obtained with ceftiofuran disks were compared to a commercial kit (MAST), for screening and detection of AmpC β -lactamases, in 50 bacterial isolates. The use of ceftiofuran discs (30 μ g) for the screening test was sensitive and specific. The confirmatory test of MAST has proved to be a useful tool in confirming the presence of these enzymes. In the context of this research, both tests have been validated to be performed in the hospital daily routine.

Lista de publicações originais

Esta tese inclui resultados da seguinte publicação:

C. Brandão*, S. Soares, S. Ferreira, E. Ramalheira. (2013) Evaluation of phenotypic methods to detect AmpC-producing Enterobacteriaceae, in Aveiro, Portugal. (Publicação online no *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*: http://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/?search=1¤t_page=1&search_term=&author%5B%5D=7054&entrytype%5B%5D=19&entrytitle%5B%5D=6615) – ANEXO 1

III. MÉTODOS.....	29
1. Caracterização do HIP.....	29
2. Isolados bacterianos.....	29
2.1. Identificação bacteriana.....	30
2.1.1. Vitek.....	31
2.2. Avaliação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos e pesquisa de AmpC.....	33
2.2.1. Vitek.....	33
2.2.2. Discos de Cefoxitina, OXOID.....	34
2.2.3. AmpC Detection Set, MASTDISCS™ ID, MAST...34	
3. Tratamento estatístico.....	36
IV. RESULTADOS & DISCUSSÃO.....	39
1. Caracterização da população em estudo.....	39
2. Caracterização dos isolados bacterianos.....	43
3. Caracterização do perfil de suscetibilidade aos antibióticos.....	46
4. Pesquisa e detecção de AmpC.....	55
4.1. Pesquisa de AmpC com recurso ao teste de suscetibilidade da cefoxitina.....	56
4.2. Detecção de AmpC com recurso ao kit AmpC detection Set.....	58
V. CONCLUSÃO.....	65

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
VII. ANEXOS.....	79

Lista de tabelas

Tabela 1: Géneros, espécies e sub-espécies de *Enterobacteriaceae* mais significativos na clinica e cenários clínicos correspondentes.

Tabela 2: Classificação das β -lactamases segundo Bush e Jacoby.

Tabela 3: Classificação das β -lactamases segundo Ambler.

Tabela 4: Distribuição dos isolados bacterianos segundo o resultado obtido para a pesquisa e deteção de AmpC, pelos métodos estudados.

Tabela 5: Resultados discrepantes entre o método de pesquisa, discos de cefoxitina 30 μ g, e o método de deteção, kit comercial da MAST, de β -lactamases do tipo AmpC.

Tabela A: Composição dos poços da carta de identificação de microrganismos Gram-negativos para Vitek 2.

Tabela B: Carta AST-N222 para determinação da suscetibilidade de bacilos Gram-negativos aeróbios, com significado clínico, a agentes antimicrobianos.

Tabela C: Carta AST-N192 para determinação da suscetibilidade de bacilos Gram-negativos aeróbios, com significado clínico, a agentes antimicrobianos.

Tabela D: Resultados obtidos, em listagem, nos testes de pesquisa e deteção de AmpC, com discos de cefoxitina e cefpodoxime, respetivamente. Indicação da identificação da espécie relativa a cada amostra estudada bem como o seu perfil de resistência antimicrobiana.

Lista de figuras

Figura 1: Estrutura dos principais grupos de β -lactâmicos.

Figura 2: Mecanismos de ação dos antibióticos e mecanismos de resistência em microrganismos Gram-negativos.

Figura 3: Estrutura tridimensional de uma AmpC β -lactamase em *Escherichia coli*.

Figura 4: Mecanismo de ação das enzimas AmpC β -lactamases.

Figura 5: Dendrograma das β -lactamases do tipo AmpC cromossomais e plasmídicas.

Figura 6: Pormenor da sequência de trabalho do Vitek 2.

Figura 7: Distribuição da população em estudo por sexo.

Figura 8: Distribuição da população em estudo por faixa etária.

Figura 9: Proveniência da população em estudo.

Figura 10: Distribuição da população em estudo em regime de internamento.

Figura 11: Distribuição das amostras estudadas por produto biológico.

Figura 12: Distribuição das amostras estudadas por microrganismo identificado.

Figura 13: Perfil de resistência dos isolados de *Escherichia coli*, frente a um painel de antibióticos.

Figura 14: Perfil de resistência dos isolados de *Morganella morganii* frente a um painel de antibióticos.

Figura 15: Perfil de resistência dos isolados de *Citrobacter freundii* frente a um painel de antibióticos.

Figura 16: Perfil de resistência dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* frente a um painel de antibióticos.

Figura 17: Perfil de resistência dos isolados de *Enterobacter aerogenes* frente a um painel de antibióticos.

Figura 18: Perfil de resistência dos isolados de *Enterobacter cloacae* frente a um painel de antibióticos.

Figura 19: Pesquisa de AmpC com recurso a testes de suscetibilidade à cefoxitina.

Figura 20: Aspeto geral do teste de pesquisa, com discos de cefoxitina, e teste de deteção (kit comercial da MAST) de β -lactamases do tipo AmpC num microrganismo que apresenta a enzima.

Figura 21: Aspeto geral do teste de pesquisa, com discos de cefoxitina, e teste de deteção (kit comercial da MAST) de β -lactamases do tipo AmpC num microrganismo que não apresenta a enzima.

Figura 22: Deteção de produção da enzima β -lactamase do tipo AmpC com recurso a um método desenvolvido pela casa comercial MAST.

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AmpC: β -lactamase do tipo AmpC

AST: *Antimicrobial susceptibility test*

ATCC: *American type culture collection*

BSAC: *British society for antimicrobial chemotherapy*

cAmpC: β -lactamase do tipo AmpC cromossômica

CFU: Unidade formadora de colônia

CLSI: *Clinical and laboratory standards institute*

CMI: Concentração mínima inibitória

ECDC: *European centre for disease prevention and control*

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ESAC: *European surveillance of antimicrobial consumption*

ESBL: *β -lactamase de espectro extendido*

EUCAST: *European committee on antimicrobial susceptibility testing*

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LPS: Lipopolissacarídeo

MH: Muller-Hinton agar

mm: milímetros

NAG: N-acetilglucosamina

NAM: Ácido N-acetilmurâmico

pAmpC: β -lactamase do tipo AmpC plasmídica

PBP: *Penicillin binding proteins*

I. INTRODUÇÃO

A família *Enterobacteriaceae* representa a maior e mais heterogênea família de bacilos Gram-negativos com significado clínico (1-3). Cerca de 20 espécies desta família são responsáveis pela quase totalidade das infecções por Gram-negativos observadas no Homem, sendo, de longe, a causa mais comum de infecções do trato urinário e muitas infecções intestinais (1, 2).

A capacidade de dirigir a terapia especificamente ao agente causador da doença é essencial para o tratamento de doenças infecciosas (2). Os antibióticos mais seletivos são aqueles que interferem com a síntese da parede celular microbiana (4). Este mecanismo de ação é característico dos antibióticos β -lactâmicos, agentes usados no tratamento de uma variedade de infecções causadas por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (5), e representam mais de 65% do mercado mundial de antibióticos (5, 6).

As β -lactamases são enzimas bacterianas capazes de hidrolisar de forma irreversível a ligação amida do anel β -lactâmico, e assim inativar vários membros deste grupo de antibióticos (2), sendo este o mecanismo mais comum de resistência aos β -lactâmicos por parte de bactérias Gram-negativas com significado clínico (7).

A crescente variedade de β -lactamases do tipo AmpC (AmpC), com perfil de cefalosporinase, associada a múltiplos genes de resistência de rápida evolução e transmissão, bem como a inexistência de critérios aprovados pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) ou outra *guideline* de referência para a detecção de AmpC constitui um desafio no diagnóstico para o laboratório de microbiologia (8-10).

Até à data, os métodos fenotípicos propostos para detecção de AmpC podem ser divididos em dois grupos, i) aqueles que detetam a atividade AmpC sobre extratos enzimáticos e ii) aqueles que avaliam os efeitos induzidos pelos inibidores de AmpC sobre as enzimas (9). Os testes comerciais AmpC, teste tridimensional, teste duplo disco e E-test são alguns dos exemplos a ter em conta (11). É de extrema importância padronizar métodos de detecção de AmpC uma vez que só o diagnóstico correto permitirá um tratamento direcionado, de forma a evitar resistências generalizadas aos β -lactâmicos e assim evitar verdadeiros problemas de saúde pública.

1. Enterobacteriaceae

A família *Enterobacteriaceae* compreende a família mais numerosa e heterogênea de bacilos de Gram-negativo com importância clínica (1-3). A classificação taxonômica desta família tem vindo a sofrer alterações e pensa-se que ainda não tenha assumido a sua forma final (3). Atualmente, estão descritos cerca de 40 géneros e mais de 150 espécies, classificados segundo propriedades bioquímicas, estrutura antigénica (O, H, K e F) e hibridação e sequenciação dos ácidos nucleicos (1, 3).

Morfologicamente, variam entre cocobacilos largos a alongados e bacilos filamentosos (2). São aeróbios-anaeróbios facultativos, de crescimento rápido em meios de cultura líquidos e sólidos, sem qualquer tipo de suplemento (1-3, 12). Podem ser imóveis ou móveis, com flagelos peritricos, asporogénicos, fermentam a glucose, reduzem nitratos a nitritos, são catalase positivos e oxidase negativos (1-3).

As enterobactérias são microrganismos ubíquos, fazendo parte da flora endógena dos humanos (1, 2). Podem viver de forma comensal e causar infeções oportunistas em indivíduos vulneráveis ou podem adquirir genes que exponenciam a resistência através de plasmídeos ou bacteriófagos (1). Cerca de 20 espécies desta família são responsáveis pela quase totalidade das infeções por Gram-negativos observadas no Homem, sendo, de longe, a causa mais comum de infeções do trato urinário e muitas infeções intestinais (1, 2). Outras infeções como pneumonia, septicémia ou infeção de tecidos moles podem também verificar-se como resultado da atividade de microrganismos desta família, que assume um papel determinante em infeções nosocomiais (1, 3).

As espécies potencialmente mais patogénicas para os humanos pertencem aos géneros *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella* e *Yersinia* (2). Géneros menos comuns como *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella* e *Providencia* devem também ser referidos uma vez que são clinicamente importantes (2). Infeções humanas provocadas por enterobactérias caracterizam-se por uma elevada morbidade e mortalidade (12). A tabela 1 sumariza cenários clínicos provocados pela manifestação de géneros e espécies de microrganismos desta família. O diagnóstico de tais infeções é confirmado com o isolamento e posterior identificação do microrganismo causador da doença, em meios de cultura e o tratamento é feito, preferencialmente, com recurso a antibióticos β -lactâmicos (2, 12).

Tabela 1: Gêneros, espécies e sub-espécies de *Enterobacteriaceae* mais significativos na clínica e cenários clínicos correspondentes. Adaptado de Kayser, Medical Microbiology, 2005. (3)

Gênero/Espécie/Variante	Patologias associadas	Observações
<i>Salmonella entérica</i>		
<i>S. typhi</i>	<i>Typhus abdominalis</i> (Síndrome da febre tifóide)	Infeção séptica generalizada
<i>S. typhimurium</i> <i>S. enteritidis</i> e outras	Gastroenterite	Diarreia aquosa profusa
<i>Shigella</i>	Disenteria bacteriana	Diarreia, cólicas abdominais, fezes com sangue e muco
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pneumonia	Pneumonia severa em indivíduos predispostos
<i>Escherichia coli</i> <i>Citrobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i> <i>Serratia</i> <i>Proteus</i> <i>Providencia</i> <i>Morganella</i>	Sépsis, infeção de feridas, infeções do trato urinário e respiratório	Bactérias facultativamente patogénicas; doença só se manifesta se o sistema imunitário do hospedeiro estiver enfraquecido; causa frequente de infeções nosocomiais; resistência a antibióticos
<i>Yersinia</i>		
<i>Y. pestis</i>	Peste	Infeção sistémica generalizada; rara.
<i>Y. enterocolitica</i>	Enterocolite; linfadenite mesentérica	Pseudoapendicite; artrite reativa; eritema nodoso
<i>Y. pseudotuberculosis</i>		
<i>Escherichia coli</i> <i>E. coli</i> enteropatogénica (EPEC)	Infeções intestinais Diarreia do recém-nascido	Epidemias em hospitais
<i>E. coli</i> enterotóxica (ETEC)	Diarreia do viajante	Diarreia; sintomas idênticos à cólera
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	Semelhante à disenteria	Invasão e destruição do epitélio do cólon; Verotoxinas
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	Colite hemorrágica	Síndrome hemolítico-urémico
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAaggEC)	Diarreia aquosa, maioritariamente em crianças	Adesão à mucosa do intestino delgado; produção de toxina

2. Antibióticos

A introdução de fármacos para o controlo de infeções na década de 1930 representou uma revolução na medicina que tem contribuído significativamente para a qualidade de vida e saúde em humanos (13, 14). A descoberta da eficácia terapêutica das sulfonamidas (vermelho de prontosil) por Domagk e, posteriormente, da penicilina por Fleming e Florey veio mostrar a vantajosa aplicação dos antimicrobianos na prática clínica (2, 15).

A capacidade de dirigir a terapia especificamente ao agente causador da doença é essencial para o tratamento de doenças infecciosas (2). Nesse contexto surgem os antibióticos, compostos antimicrobianos que derivam de processos metabólicos naturais de bactérias e fungos, como *Streptomyces*, *Bacillus*, *Penicillium* e *Cephalosporium*, respetivamente (4, 14). Podem ainda assumir uma origem semi-sintética ou sintética, caso sejam isolados de fontes naturais mas modificados quimicamente de forma a serem incrementados, ou sintetizados através de reações químicas (14). Recebem o nome de bacteriostáticos, se são agentes antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de microrganismos, ou bactericidas, se promovem a morte da bactéria (1, 2, 4). Quanto ao espetro de ação podem considerar-se *narrow spectrum* os fármacos que apresentam atividade contra uma variedade limitada de patógenos e *broad spectrum* os fármacos que exercem ação sobre muitos tipos diferentes de microrganismos patogénicos (4). Por último, e de acordo com o mecanismo de ação, os antibióticos podem ainda ser classificados em: i) inibidores da síntese da parede celular bacteriana; ii) modificadores da permeabilidade da membrana citoplasmática; iii) modificadores da síntese de ácidos nucleicos; iv) inibidores da síntese proteica por ação sobre ribossomas e v) inibidores de enzimas do metabolismo citoplasmático (4, 12, 14).

O antibiótico ideal deve apresentar características como toxicidade seletiva para o microrganismo, atividade bactericida, rápida absorção, eficácia no alvo, facilidade de administração, não conduzir ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana, entre outros (4, 14), uma vez que a base de atuação dos antibióticos passa por explorar diferenças estruturais e metabólicas entre microrganismos procariotas e células eucariotas, de forma a eliminar o microrganismo causador da doença com o mínimo de danos para o hospedeiro (12, 16).

2.1. Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos mais seletivos são aqueles que interferem com a síntese da parede celular microbiana (4). Este mecanismo de ação é característico dos antibióticos β -lactâmicos, agentes usados no tratamento de uma variedade de infecções causadas por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (5). Representam mais de 65% do mercado mundial de antibióticos (5, 6), sendo reportados pela ESAC (*European Surveillance of Antimicrobial Consumption*) em 2009, como a classe de antibióticos mais usada em Portugal, tanto a nível de ambulatório como hospitalar (17). A sua ampla utilização pode estar relacionada com a eficácia, farmacodinâmica, baixa toxicidade e baixo custo que estes agentes terapêuticos apresentam (18, 19).

2.1.1. Estrutura e subclasses

O nome da classe deriva da presença de um anel β -lactâmico de quatro lados na sua constituição e é dividida em subclasses denominadas penamos, cefemos, monobactamos e carbapenemos (16, 20). O anel β -lactâmico (três átomos de carbono, um de azoto e radicais substituintes) encontra-se fundido com um anel tiazolidina nas penicilinas ou com um anel di-hidrotiazina nas cefalosporinas (12). Nos monobactamos mantém-se apenas o anel β -lactâmico e nos carbapenemos verifica-se a substituição do enxofre por um carbono, no anel tiazolidina (12). As estruturas dos principais grupos de β -lactâmicos são apresentadas na figura 1.

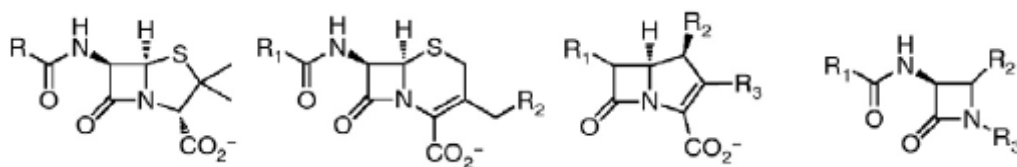


Figura 1: Estrutura dos principais grupos de β -lactâmicos. Da esquerda para a direita, penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactamos. (20)

Os penamos, subclasse onde estão inseridas as penicilinas, compreendem um grupo diversificado de compostos, fármacos eficazes e com baixa toxicidade (1). Estas derivam do ácido 6-aminopenicilâmico (16), com origem no fungo *Penicillium chrysogenum*. A sua atividade bactericida é variável (Gram-positivos e alguns Gram-negativos), consoante o radical substituinte que compõe a estrutura química (14). A

natureza reativa do anel β -lactâmico desta subclasse torna as penicilinas suscetíveis a uma variedade de processos degradativos (16). A modificação bioquímica de compostos intermédios permitiu a obtenção de derivados menos instáveis em meio ácido, uma maior absorção no tubo digestivo (21), maior resistência a penicilases e um espectro de ação mais abrangente. Como exemplos deste grupo podem referir-se a penicilina G e a amoxicilina.

Segundo a classificação química, os cefemos podem ser divididos em cinco classes, nomeadamente, cefalosporinas, cefamicinas, oxa-1-cefemos, carba-1-cefemos e miscelâneas (16). As cefalosporinas, maior grupo representativo dos cefemos, estão entre os agentes anti-infecciosos mais potentes e mais amplamente usados (16). São fármacos bem tolerados, com um metabolismo semelhante às penicilinas, cuja origem está no fungo *Cephalosporium acremonium*. A base sintética deste grupo de fármacos é o ácido 7-aminocefalosporânico (22). Segundo a classificação microbiológica, as cefalosporinas são divididas em cinco gerações, de acordo com a atividade antibacteriana (16). A cada geração, o espectro de ação antimicrobiano torna-se mais abrangente contra Gram-negativos, observa-se uma maior estabilidade contra β -lactamases, a concentração mínima inibitória (CMI) e os efeitos secundários diminuem, aumentando a eficácia do fármaco (2, 14, 16). Cefalosporinas de primeira geração mostram atividade antimicrobiana contra Gram-positivos e algumas enterobactérias, ao passo que cefalosporinas de quarta geração cobrem o espectro de ação de todas as gerações anteriores e são altamente bactericidas (2, 4). Cefalotina, cefuroxima, ceftriaxona, cefepima e ceftarolina são exemplos de cefalosporinas de primeira, segunda, terceira, quarta e quinta gerações, respetivamente (16). As cefamicinas são produzidas pela actinobactéria *Streptomyces*, e são estruturalmente semelhantes às cefalosporinas. São caracterizadas pela presença de um grupo 7- α -metoxi no anel, que lhes confere resistência excepcionalmente elevada a algumas β -lactamases. Um exemplo representativo deste grupo é a cefoxitina (23).

Os monobactamos, como é o exemplo do aztreonam, são antibióticos de espectro reduzido, eficazes contra Gram-negativos, mas menos eficazes contra Gram-positivos ou anaeróbios, devido à pouca afinidade que apresentam para ligação às *Penicillin Binding Proteins* (PBP's) (2). São extremamente resistentes à hidrólise por β -lactamases (2) e assumem especial importância no tratamento de infeções em indivíduos alérgicos à penicilina (16). Por fim, os carbapenemos são os β -lactâmicos que apresentam maior

espectro de ação (1). São eficazes contra Gram-negativos, Gram-positivos e anaeróbios. Imipenem e meropenem são exemplos de fármacos desta subclasse, sendo o primeiro capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica (16).

A eficácia de um agente antimicrobiano depende de fatores como a via de administração, local da infecção, concentração de fármaco no corpo, natureza do patógeno ou alergias (4). O tratamento de infecções bacterianas ou outras infecções microbianas pode ser extremamente difícil devido à capacidade das bactérias e outros microrganismos desenvolverem resistência aos agentes antimicrobianos, facto que constitui um grave problema de Saúde Pública (24).

2.1.2. Mecanismo de ação

O seu mecanismo de ação passa por interferir na fase parietal da biossíntese de peptidoglicano, ao impedir a transpeptidação. O estabelecimento de pontes interpeptídicas entre as cadeias de N-acetilglucosamina (NAG) e de ácido N-acetilmurâmico (NAM) recém-sintetizadas é inibido, uma vez que as enzimas que levam a cabo o mecanismo de transpeptidação, as D-D carboxitranspeptidases, coletivamente designadas por PBP's, presentes no folheto externo da membrana celular bacteriana, ligam-se aos β -lactâmicos e sofrem acilação, não concluindo o processo de formação do peptidoglicano. A bactéria perde a sua forma e rigidez características, o que a deixa exposta à ação de autolisinas endógenas que enfraquecem zonas pontuais da parede celular, permitindo a passagem de água, através da membrana citoplasmática, do ambiente exterior, hipotónico, para o interior da célula bacteriana, hipertónico, levando à lise da última. De referir que este mecanismo de ação só se verifica em bactérias jovens e em crescimento, que sintetizem peptidoglicano. (1, 2, 14, 25, 26)

3. Mecanismos de resistência bacteriana aos β -lactâmicos

A resistência microbiana pode definir-se como a redução da suscetibilidade do microrganismo patógeno a um ou mais agentes antimicrobianos administrados em contexto clínico. Pode ocorrer de forma natural ou adquirida. A resistência natural não é mais do que uma transferência vertical de genes, característica intrínseca de uma determinada espécie, em que a capacidade de resistir à ação de um antibiótico, devido a mutações cromossomais, entre outros, é transmitida de geração em geração. Por outro lado, a resistência adquirida manifesta-se pela aquisição de genes de resistência aos antimicrobianos, por meio de plasmídeos, transposões e/ou integrões que pode ser transmitida quer à descendência, quer a outros microrganismos, envolvendo processos como conjugação, transformação e transdução. (24)

Podem enumerar-se quatro mecanismos gerais de resistência aos antimicrobianos em bactérias: i) acumulação de barreiras, reduzindo a quantidade de fármaco que chega ao alvo, quer por redução da permeabilidade – mutações pontuais ou inserção de sequências em porinas capazes de diminuir a sua função – quer por aumento do número de bombas de efluxo que transportam o fármaco para o exterior da célula bacteriana; ii) alteração do alvo, por perda ou redução da afinidade das PBP's bacterianas aos agentes antimicrobianos; iii) desenvolvimento de vias metabólicas alternativas por parte dos microrganismos e iv) mecanismos enzimáticos – β -lactamases – capazes de destruir parcial ou totalmente as moléculas antimicrobianas. Este último é o modo mais comum de desenvolvimento de resistência clínica aos β -lactâmicos e será abordado posteriormente em mais detalhe. Os mecanismos acima referidos estão representados na figura 2. (5, 25, 27-29)

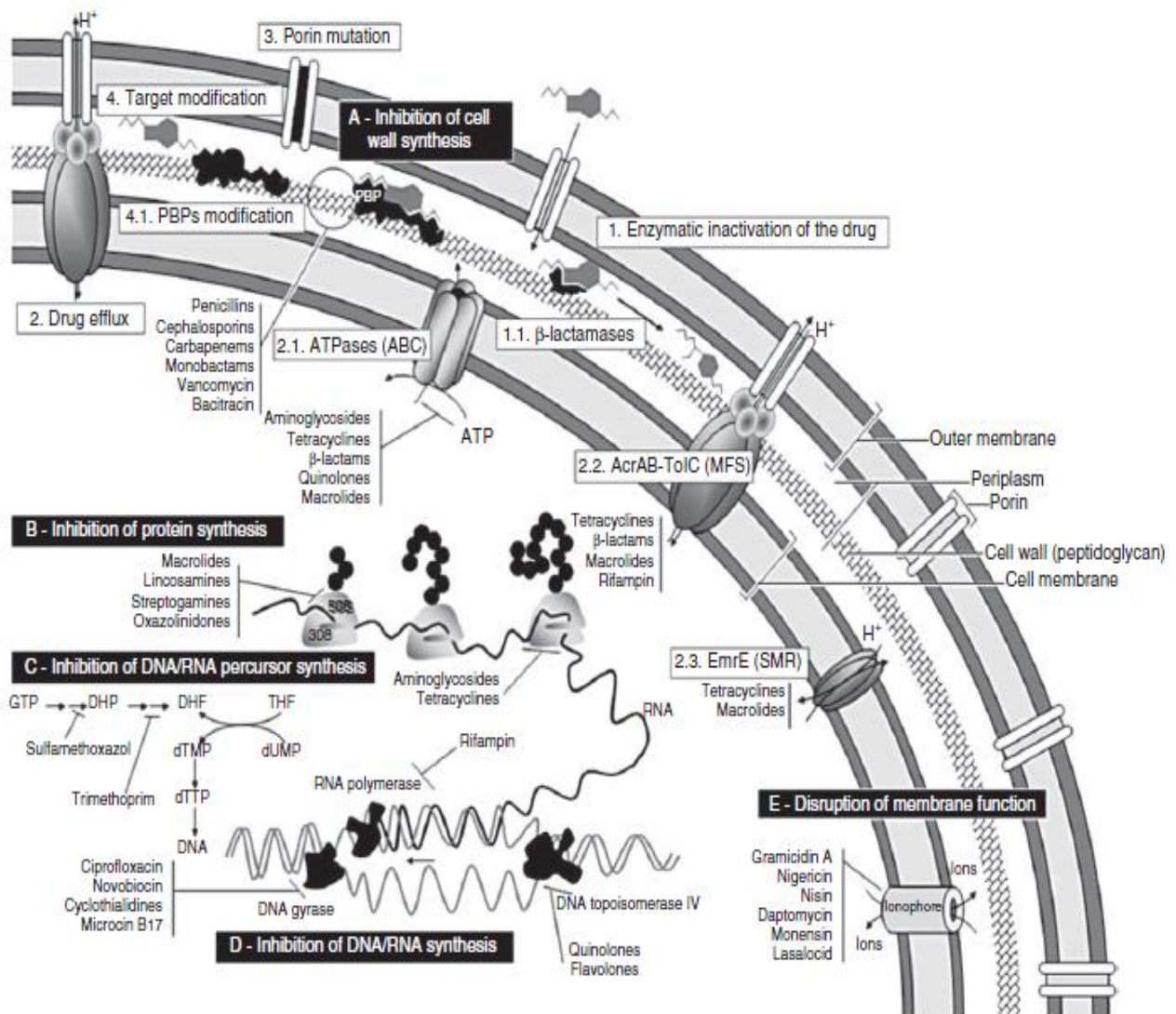


Figura 2: Mecanismos de ação dos antibióticos e mecanismos de resistência em microrganismos Gram-negativos. A figura representa a uma bactéria Gram-negativa. As caixas pretas representam os mecanismos de ação dos antimicrobianos e as caixas brancas, os mecanismos de resistência às mesmas. Por baixo de cada caixa, são referidos exemplos de fármacos correspondentes a cada um dos mecanismos. Os mecanismos de ação antimicrobiana estão divididos em cinco classes: (a) Inibidores da síntese de parede celular; (b) inibidores da síntese proteica; (c) antimetabolitos; (d) inibidores da síntese de ácidos nucleicos – replicação e transcrição; (e) alterações na membrana celular. Os mecanismos de resistência aos antibacterianos estão representados por números: [1] inativação enzimática do fármaco pela ação de β -lactamases (1.1); [2] bombas de efluxo, por transporte ativo envolvendo ATPases (2.1) ou por força motriz prótica (2.2 e 2.3); [3] modificação de porinas e [4] modificação

3.1. β -lactamases

As β -lactamases são enzimas bacterianas capazes de hidrolisar de forma irreversível a ligação amida do anel β -lactâmico, e assim inativar vários membros deste grupo de antibióticos (2), sendo este o mecanismo mais comum de resistência aos β -lactâmicos por parte de bactérias Gram-negativas com significado clínico (7). Uma vez que as penicilinas, as cefalosporinas e os carbapenemos estão incluídos nas opções terapêuticas preferidas para o tratamento de muitas doenças infecciosas, a presença e características destas enzimas pode determinar a escolha da terapêutica mais adequada (7). À semelhança dos antibióticos, podem ser classificadas em *narrow*, *broad* ou *extended* β -lactamases, consoante sejam capazes de hidrolisar apenas uma subclasse de β -lactâmicos ou demonstrem atividade hidrolítica perante várias subclasses.

A primeira β -lactamase foi identificada em 1940 numa estirpe de *Escherichia coli*, e descrita como “inativadora da penicilina”, recebendo o nome de penicilinase (30, 31). O número crescente de β -lactâmicos tem, desde então, aumentado a pressão seletiva sobre as bactérias, promovendo a sobrevivência de microrganismos com múltiplas β -lactamases (32, 33), com conseqüente aumento em número destas enzimas (34). Atualmente estão descritas mais de 1240 enzimas (7, 25), enzimas distintas, mais ou menos relacionadas, agrupadas em famílias (2, 34). Receberam o nome tendo em conta os mais diversos critérios, propriedades químicas, peculiaridades na sequência, localização do gene no cromossoma, entre outros. Estas dividem-se em mais de 20 famílias onde estão incluídas 211 variantes de TEM, 177 SHV, 356 OXA, 147 CTX-M e outras menores (34).

Vários foram os sistemas propostos para classificação destas enzimas, assentes em características como espectro hidrolítico ou suscetibilidade aos inibidores (27). Permanecem as classificações de Ambler e Bush-Jacoby. A primeira é uma classificação molecular, baseada na sequência de aminoácidos que compõe cada enzima, onde as β -lactamases são agrupadas em quatro classes, A a D (5, 35). A segunda, é uma classificação funcional, fundamentada pelo perfil de substratos e inibidores das enzimas, onde estas são agrupadas em três grupos, 1 a 3, e vários subgrupos (7, 36). Os sistemas de classificação serão apresentados abaixo nas tabelas 2 e 3.

Compostos como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam têm assumido um papel preponderante como inibidores das β -lactamases; não apresentando qualquer atividade antimicrobiana são usados em associação com antibióticos β -lactâmicos, apresentando propriedades sinérgicas. Os inibidores são estruturalmente semelhantes às penicilinas, permitindo-lhes ligarem-se irreversivelmente à β -lactamase e, no processo, inativá-las, deixando o antibiótico intacto, capaz de desempenhar as suas funções (37, 38).

Tabela 2: Classificação das β -lactamases segundo Bush e Jacoby. Sistema de classificação adaptado de Bush-Jacoby-Medeiros (36). (AC) Ácido clavulânico. (TZB) Tazobactam. (+) ativo, (-) inativo, (\pm) ação variável. Adaptado de Bush, Updated functional classification of β -lactamases, 2010. (7)

Classe	Perfil de substratos	Perfil de inibidores		Enzimas representativas
		AC	EDTA	
1	cefalosporinas	-	-	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	cefalosporinas	-	-	GC1, CMY-37
2a	penicilinas	+	-	penicilases de bactérias de Gram-positivo
2b	penicilinas e cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	cefalosporinas <i>extended-spectrum</i> , monobactamos	+	-	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	penicilinas	-	-	TEM-30, SHV-10
2ber	cefalosporinas <i>extended-spectrum</i> , monobactamos	-	-	TEM-50
2c	carbenicilina	+	-	PSE-1, CARB-3
2ce	cerbenecilina, cefepime	+	-	RTG-4
2d	cloxacilina	\pm	-	OXA-1, OXA-10
2de	cefalosporinas <i>extended-spectrum</i>	\pm	-	OXA-11, OXA-15
2df	carbapenemos	\pm	-	OXA-23, OXA-48
2e	cefalosporinas <i>extended-spectrum</i>	+	-	CepA
2f	carbapenemos	\pm	-	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	carbapenemos	-	+	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	carbapenemos	-	+	CphA, Sfh-1

Tabela 3: Classificação e propriedades das β -lactamases segundo Ambler. (AC) Ácido clavulânico, (+) ativo, (-) inativo, (\pm) ação variável. Adaptado de Poole, Resistance to β -lactam antibiotics, 2004. (5)

Classe	Tipo de enzima	Perfil de substratos	Perfil de inibidores		Enzimas representativas
			AC	EDTA	
A	penicilase	penicilinas	+	-	penicilase de bactérias de Gram-positivo
	β -lactamase <i>narrow spectrum</i>	penicilinas e cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	β -lactamase <i>broad spectrum</i>	penicilinas, cefalosporinas <i>narrow e broad spectrum</i> , monobactams	+	-	numerosas variantes de SHV e TEM, CTX-M-1 a -28, PER-1 e -2, VEB-1, GES-1, IBC-1, enzimas cromossômicas de bactérias de Gram-negativo
	β -lactamase resistente aos inibidores	penicilinas e cefalosporinas	-	-	TEM-30 a -41, TEM-44, TEM-45, TEM-51 e TEM-54
	β -lactamase <i>broad spectrum</i> resistente aos inibidores	penicilinas, cefalosporinas <i>narrow spectrum</i> , algumas cefalosporinas <i>broad spectrum</i>	-	-	TEM-50, TEM-68, TEM-80
	carbapenemase	penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactams	+	-	NMC-A, SME-1 a -3, IMI-1, KPC-1 a -3, GES-2, SHV-38
B	carbapenemase	carbapenemos, β -lactâmicos <i>broad spectrum</i> , cefalosporinas de quarta geração	-	+	IMP-1 a -13, VIM-1 a -7, SPM-1, enzimas cromossômicas de bactérias de Gram-negativo
C	cefalosporinase <i>extended spectrum</i>	penicilinas, cefalosporinas <i>narrow e broad spectrum</i> , cefamicinas e monobactams	-	-	CMY-2 a -13, LAT-1, MOX-1 e -2, FOX-1 a -6, ACT-1, MIR-1, DHA-1 e -2, ACC-1, CFE-1, enzimas cromossômicas de bactérias de Gram-negativo
D	penicilase <i>narrow spectrum</i>	penicilinas e cloxacilina	\pm	-	numerosas variantes OXA
	β -lactamase <i>broad spectrum</i>	penicilinas, cloxacilina, β -lactâmicos <i>broad spectrum</i> , por vezes monobactams ou cefalosporinas de quarta geração	\pm	-	derivados de OXA-2 e -10, OXA-18, OXA-29, OXA-30, OXA-31, OXA-32, OXA-45
	carbapenemase	penicilinas, oxacilina e carbapenemos	+	-	OXA-23 a -27, OXA-40, OXA-48, OXA-54

3.1.1. β -lactamases do tipo AmpC

As β -lactamases do tipo AmpC são enzimas que pertencem à classe C na classificação de Ambler (35) e estão incluídas no grupo 1 do sistema de classificação de Bush-Jacoby (7). À semelhança das penicilinases (TEM-1), as AmpC apresentam resíduos de serina no seu local ativo (39). Apresentam pesos moleculares que variam entre os 34 e os 40 kDa e pontos isoelétricos superiores a 8.0 (40). Normalmente estão localizadas no periplasma da bactéria, com exceção das AmpC do *Psychrobacter immobilis* que são secretadas maioritariamente para o meio externo (41). A estrutura tridimensional das enzimas desta classe é muito semelhante. Apresentam um domínio α -helicoidal num dos lados da molécula e um domínio α/β no outro. O local ativo encontra-se no centro da enzima, à esquerda das folhas β , com um resíduo de serina reativa no terminal amino da α -hélice central (42, 43). Uma representação da estrutura dum AmpC em *Escherichia coli* pode ser vista na figura 3.

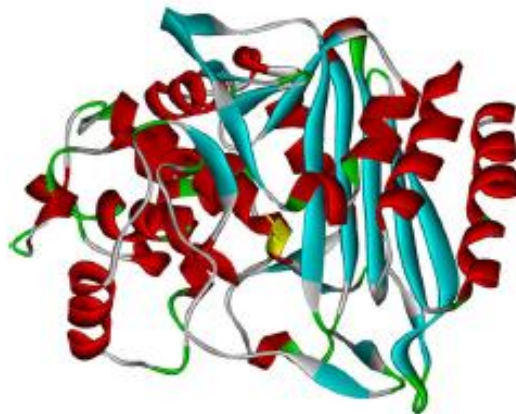


Figura 3: Estrutura tridimensional dum AmpC β -lactamase em *Escherichia coli*. (25)

Apresentam atividade contra penicilinas, mas são mais ativas frente a cefalosporinas; podem ainda hidrolisar cefamicinas (cefoxitina e cefotetan), oximinocefalosporinas (ceftazidime, cefotaxime e ceftriaxone) e monobactams (aztreonam), este último com uma taxa de hidrólise inferior a 1%, comparativamente com uma benzilpenicilina (11, 40). São inativas frente aos carbapenems e, na maioria

dos casos, às cefalosporinas de quarta geração, embora já tenham sido relatados casos de resistência ao cefepime (44, 45), facto que colocaria as AmpC no subgrupo 1e da classificação de Bush-Jacoby (7, 11). A hidrólise de cefalosporinas de terceira geração por parte destas enzimas representa um problema considerável no meio hospitalar, uma vez que estes antimicrobianos são dos mais usados no tratamento de infeções visto serem particularmente eficazes contra bactérias entéricas e apresentarem um espectro de ação bastante alargado, sendo eficazes contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (14, 46).

O mecanismo de ação das AmpC é catalítico e envolve a acilação de um resíduo de serina no local ativo (figura 4). A enzima liga-se ao antibiótico formando um complexo de Michaelis-Menten não covalente. O anel β -lactâmico é então atacado por um grupo hidroxilo livre, originando um éster de acilo covalente. A hidrólise do éster liberta a enzima, ativa, e o fármaco hidrolisado, inativo (16, 47, 48). Combinações de β -lactâmico/inibidor de β -lactamases apresentam atividade reduzida ou inexistente relativamente às AmpC (38, 49-51), ressalvando a cloxacilina, a oxacilina e o aztreonam, referidos como bons inibidores (36).

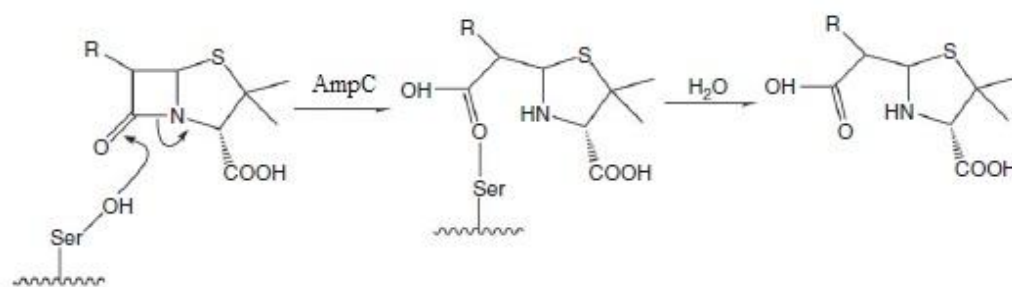


Figura 4: Mecanismo de ação das enzimas AmpC β -lactamases. (16)

As AmpC podem ser cromossómicas ou plasmídicas, conforme sejam intrínsecas de determinado microrganismo ou, não sendo características do mesmo, sejam adquiridas por este, por meio de plasmídeos. A primeira β -lactamase do tipo AmpC cromossómica (cAmpC) foi reportada ainda antes da era dos antibióticos, que foi tomando forma na década de 1930 (27). Estima-se que tenha derivado de uma PBP, com quem partilha analogia sequencial e estrutural (11), envolvida na síntese de

peptidoglicano ou que tenha surgido como consequência do ataque às bactérias pelos β -lactâmicos ancestrais, produzidos por bactérias e fungos (27). As cAmpC são quase ubíquas nas enterobactérias, com exceção do gênero *Salmonellae*, mas variam em quantidade, modo de produção e, conseqüentemente, na sua contribuição para o perfil de resistência da estirpe em que estão inseridas (52). São constitutivas para *Escherichia coli* (11, 27). O gene *ampC*, responsável pela manifestação das cAmpC, encontra-se no cromossoma bacteriano, expressando baixos níveis de resistência. É induzido como resposta à exposição de certos β -lactâmicos como amoxicilina, ampicilina, cefoxitina, imipenem e ácido clavulânico, expressando níveis mais elevados de resistência aos β -lactâmicos (7, 53-55). O fenômeno de indução é regulado por um operão *amp* que requer a presença do β -lactâmico e de cinco genes (*ampC*, *ampR*, *ampD*, *ampG* e *ampE*) e está intimamente relacionado com a reciclagem de peptidoglicano (11, 56). Como exemplos de microrganismos que exibam uma cAmpC indutível podem referir-se *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providentia stuartii*, entre outros (27).

Durante os últimos vinte anos, as β -lactamases do tipo AmpC mediadas por plasmídeos (pAmpC) tornaram-se comuns em enterobactérias, sendo a primeira documentada em 1989 (57). Estudos de sequenciação de nucleótidos sugerem que os genes que codificam estas enzimas plasmídicas derivam de genes *ampC* cromossômicos, integrados em elementos genéticos de transferência por meio de sequências de inserção, facilitando a sua dispersão a diferentes microrganismos (40, 58, 59). Pequenas diferenças na sequência de aminoácidos destas enzimas plasmídicas originaram seis famílias: i) CIT, derivada de genes *bla_{AmpC}* de *C. freundii* e que inclui os grupos CMY e LAT; ii) DHA, derivada de genes *bla_{AmpC}* de *M. morganii*; iii) ACC, derivada de genes *bla_{AmpC}* de *Hafnia alvei*; iv) FOX, derivada de genes *bla_{AmpC}* de *Aeromonas media*; v) MOX, que se pensa que tenha derivado de cAmpC de *Aeromonas caviae*; vi) ECB, derivada de genes *bla_{AmpC}* de *E. cloacae* e/ou *Enterobacter asburiae* e que inclui os grupos ACT e MIR (11). Atualmente o GenBank tem descritas cento e quatro variantes de CMY, oito de MOX, oito de DHA, nove de ACT, quatro de ACC, dez de FOX, uma de LAT e cinco variantes de MIR, sendo que a variante CMY-2 é a pAmpC mais prevalente em todo o mundo (11).

A relação entre as cAmpC e as pAmpC é muito estreita, verificada por homologias de quase 100% na sequência de aminoácidos entre derivadas de AmpC de

M. morgani e *H. alvei* e de 94% de homologia dentro de grupo de *C. freundii*, por exemplo (11, 49). Na figura 5 é apresentado um dendrograma que relaciona as β -lactamases do tipo AmpC cromossômicas e plasmídicas, mostrando não só a diversidade de genes cAmpC mas também a relação de certas pAmpC com enzimas cromossômicas de determinados organismos.

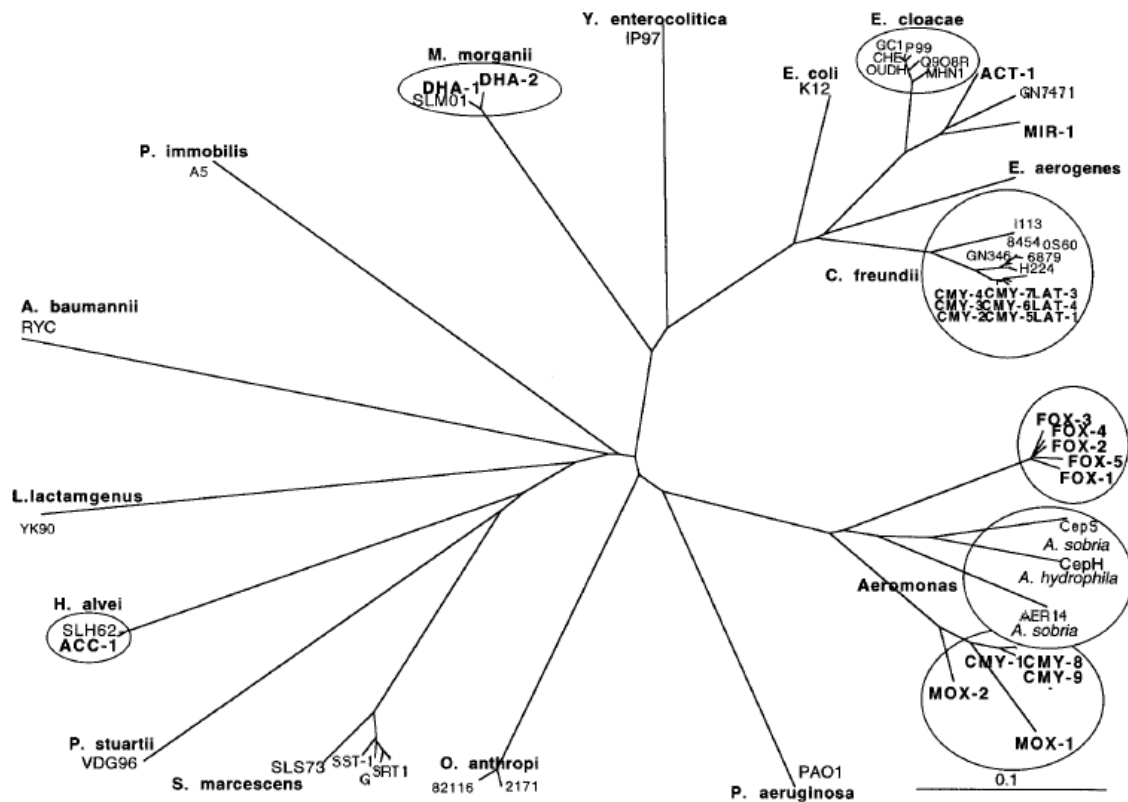


Figura 5: Dendrograma das β -lactamases do tipo AmpC cromossomais e plasmídicas. (40)

Apesar das pAmpC estarem descritas em todo o mundo (40, 49, 60, 61), poucos são os estudos de prevalência destas enzimas, devido, principalmente, à inexistência de um método padronizado para a sua detecção (11). A maioria dos estudos descreve a prevalência de determinada variante de enzima numa determinada zona geográfica (11, 62-64). A ESAC (*European Surveillance of Antimicrobial Consumption*) reporta que

desde o ano 2000 se tem observado uma percentagem crescente de resistência às cefalosporinas de terceira geração em *E. coli*. Estudos no Reino Unido, datados de 2004, dão conta que de um *screening* inicial de isolados resistentes à cefoxitina, 49% das *E. coli* e 55% das *Klebsiella pneumoniae* selecionadas eram produtoras de pAmpC (65). Na Irlanda, dois anos mais tarde, foram publicados resultados idênticos; 48% das *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de terceira geração produziam pAmpC (66). Em Espanha, uma variante da família FOX foi descrita pela primeira vez em 2000 numa estirpe de *E. coli* (64). Em Portugal, poucos são os estudos sobre prevalência de pAmpC. Em 2010, e pela primeira vez, foi reportada a ocorrência e disseminação de pAmpC em ambiente hospitalar, com predominância das variantes DHA-1 e CMY-2, maioritariamente, em estirpes de *K. pneumoniae* e *E. coli* (67).

3.1.1.1. Impacto das β -lactamases do tipo AmpC na saúde pública e importância da sua deteção

O aumento da incidência de infeções causadas por bacilos Gram-negativos produtores de β -lactamases tais como AmpC tem-se tornado uma grande questão. Infeções causadas por estes microrganismos multirresistentes estão associadas a elevada morbidade e mortalidade, prolongando a estadia no hospital, aumentando os custos com os cuidados de saúde e, principalmente, limitando as opções terapêuticas (68, 69). Além do mais, estas bactérias representam um problema sério nas práticas de controlo de infeção, uma vez que este mecanismo de resistência pode ser confundido com outros, mais frequentemente descritos (como é o caso das ESBL – *Extended Spectrum β -lactamase*), nos resultados obtidos para o antibiograma, comprometendo a antibioterapia. De referir ainda que este mecanismo de resistência pode não só manifestar-se por si só como associado a outros mecanismos, numa mesma bactéria. Por conseguinte, a rápida deteção e identificação do mecanismo enzimático que está na origem da resistência permitirá a prescrição de uma terapia antimicrobiana ideal ao indivíduo convalescente (70), e garantirá a introdução oportuna de procedimentos de controlo de infeção de forma a prevenir a disseminação (71).

Uma vez que os testes de suscetibilidade antimicrobiana de rotina não são suficientes para a deteção e identificação de β -lactamases emergentes nos bacilos de Gram-negativo, são necessários testes suplementares de pesquisa e testes de confirmação, grande objeto de estudo nas últimas duas décadas (68). Neste sentido, as

diretrizes fornecidas pelo CLSI, EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) e outras devem ser avaliadas, e reformuladas recomendações, de forma a facilitar o desenvolvimento de uma estratégia de pesquisa eficiente para a detecção de β -lactamases emergentes em bacilos de Gram-negativo, com especial foco para as AmpC, que deverá ser implementada na rotina laboratorial hospitalar. No próximo tópico serão abordados, de forma sucinta, alguns dos métodos existentes no mercado para a pesquisa e detecção de AmpC.

4. Métodos fenotípicos para detecção de estirpes produtoras de AmpC

O controlo dos microrganismos é crítico para a prevenção e tratamento da doença (4). Nesse sentido, os testes de sensibilidade microbiana *in vitro* são de grande importância, permitindo selecionar os agentes quimioterápicos realmente capazes de eliminar o agente etiológico da infeção (1). A crescente variedade de β -lactamases do tipo AmpC na família *Enterobacteriaceae*, associada a múltiplos genes de resistência de rápida evolução e transmissão, bem como a inexistência de critérios aprovados pelo CLSI ou outra *guideline* de referência para a detecção de AmpC constitui um desafio no diagnóstico para o laboratório de microbiologia (8-10).

Os métodos de detecção laboratorial de uma pAmpC podem ser genotípicos ou fenotípicos (11, 59), conforme se usem técnicas de biologia molecular para detetar e identificar os genes responsáveis pela produção de AmpC ou se baseiem em técnicas não moleculares, que detetam a capacidade das enzimas hidrolisarem determinados antibióticos. Até à data, os métodos fenotípicos propostos para detecção de AmpC podem ser divididos em dois grupos, i) aqueles que detetam a atividade AmpC em extratos enzimáticos e ii) aqueles que avaliam os efeitos induzidos pelos inibidores de AmpC sobre as enzimas (9). Regra geral, os testes fenotípicos são sensíveis, fáceis de executar e de baixo custo (11).

4.1. Detecção da atividade AmpC em extratos enzimáticos

Entre os métodos mais utilizados para detecção da atividade AmpC em extratos enzimáticos, destacam-se os testes AmpC e Tridimensional.

O Teste AmpC é documentado por vários autores como um teste enzimático de grande utilidade e é baseado no uso de Tris-EDTA para permeabilizar a parede celular bacteriana e assim libertar a β -lactamase para o meio. Os discos de AmpC são preparados no laboratório, utilizando discos de papel que contêm 20 μ l de Tris-EDTA/solução salina numa proporção de 1:1. Colónias da bactéria a estudar são aplicadas sobre os discos (previamente re-hidratados), que se colocam de forma invertida sobre uma placa de agár Muller-Hinton (MH), previamente inoculada com uma estirpe sensível à cefoxitina (*E. coli* ATCC 25922), e situando o disco inoculado adjacente ao disco de cefoxitina 30 μ g. Após incubação de 24h a 37°C, a observação de

uma distorção no halo de inibição da cefoxitina é indicativa da inativação enzimática da mesma e, portanto, da presença da enzima AmpC. De referir a possibilidade de observação de falsos positivos em isolamentos de estirpes produtoras de carbapenemases do tipo KPC-2 (72, 73).

O Teste tridimensional é uma adaptação do teste de Hodge (74), recomendado pelo CLSI como teste fenotípico de confirmação da presença de carbapenemases, em 2009. Depois de colocado, no centro duma placa de MH inoculada com uma estirpe de *E. coli* ATCC 25922, um disco de cefoxitina 30 µg, a gelose é cortada com um bisturi, num comprimento de cerca de 5mm, do limite do disco de antibiótico para o exterior da placa, numa direção radial. Na fenda, é dispensada uma quantidade de 20 µl de uma suspensão 0.5 McFarland do isolado a testar. Após incubação de 24h a 37°C, a observação de crescimento do organismo à superfície na zona de inibição juntamente com a estirpe teste é interpretado como característico da presença de AmpC. (73, 74)

4.2. *Deteção da atividade AmpC com base no efeito induzido pelos inibidores*

São diversas as moléculas estudadas como potenciais inibidores de AmpC. Podem apresentar estrutura β-lactâmica, como é o caso da oxacilina, ou estrutura não β-lactâmica, como os derivados do ácido borónico. Os métodos fenotípicos que utilizam a cloxacilina como inibidor de AmpC baseiam-se em: i) métodos de sinergia de duplo disco, que ao usarem discos de cloxacilina 500µg e discos de cefotaxima ou ceftazidima, avaliam a distorção da zona de inibição entre os discos (73); ii) métodos de discos de antibióticos combinados com inibidores (75); iii) método E-test contendo uma tira de cefotetan/cefotetan-cloxacilina, considerando o teste positivo se se observar uma redução de pelo menos três diluições de CMI (Concentração Mínima inibitória) na presença de cloxacilina (40). Muitos são os testes descritos para deteção de AmpC com ácido borónico e derivados, com o inconveniente do ácido borónico não ser específico para AmpC, uma vez que também inibe KPC e certas β-lactamases de espectro estendido (76-78).

II. OBJETIVOS

O trabalho experimental desenvolvido durante o período de dissertação visa a otimização e validação de um *workflow* de testes fenotípicos para a pesquisa e detecção de β -lactamases do tipo AmpC na rotina hospitalar.

São objetivos específicos deste estudo:

- A otimização de testes fenotípicos para a detecção de genes de resistência, através de recolha de estirpes positivas para o mecanismo de resistência selecionado com base no resultado obtido com o método automático;

- A comparação de metodologias existentes no mercado para a detecção de AmpC, nomeadamente com discos de cefoxitina e cefpodoxime;

- A introdução na rotina hospitalar de um painel de testes fenotípicos otimizados e validados no primeiro objetivo.

III. MÉTODOS

1. Caracterização do HIP

O Hospital Infante D. Pedro, inserido no Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE, juntamente com os Hospitais Visconde de Salreu e Distrital de Águeda, serve a população dos concelhos de Aveiro, Águeda, Albergaria-a-Velha, Estarreja, Ílhavo, Murtosa, Oliveira do Bairro e Sever do Vouga, perfazendo uma população de cerca de 390000 habitantes (censos de 2011) (79, 80).

O seu espaço físico está dividido em vários edifícios, donde se destacam serviços como a consulta externa, urgência, internamento, cirurgia de ambulatório, hospital de dia e diversas especialidades médicas.

O sector de microbiologia, incluído no serviço de Patologia Clínica, é responsável pela deteção e identificação microbiana em produtos biológicos como urina, sangue, expetoração, fezes, entre outros, e determinação do seu perfil de resistência a determinados antibióticos, processando cerca de 23880 análises em 2012.

2. Isolados bacterianos

Os isolados bacterianos utilizados neste estudo foram recolhidos entre Janeiro de 2012 e Maio de 2013, de vários produtos biológicos (expetoração, pus, sangue, urina, entre outros), em pacientes do Hospital Infante D. Pedro, Aveiro. Os microrganismos estudados incluem bactérias Gram-negativas, representativas da família *Enterobacteriaceae* como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* e *Serratia marcescens*.

A identificação das espécies bacterianas e respetivo perfil de suscetibilidade foi realizada por um sistema de identificação automática, o Vitek 2[®] (Biomérieux, França) e respetivo *software* de interpretação de resultados, o Vitek *Advanced Expert System*[™], com recurso à carta de identificação de Gram-negativos e às cartas de suscetibilidade AST-N222 e AST-N192, de acordo com os critérios do CLSI. Todos os microrganismos incluídos neste estudo foram ainda sujeitos à pesquisa de β -lactamases do tipo AmpC por métodos manuais, nomeadamente, através de discos de cefoxitina e de um kit

comercial especificamente desenvolvido para a deteção de AmpC, baseado em discos de cefpodoxime.

De um total de 23883 amostras que deram entrada no serviço de Patologia Clínica do HIP em 2012, 22742 foram estudadas, procedendo-se ao isolamento bacteriano em 5151 dos casos. Destas, 2148 foram identificadas como pertencendo à família *Enterobacteriaceae*.

2.1. Identificação bacteriana

Após receção da amostra no sector de microbiologia do HIP, esta é semeada em meios de cultura apropriados. As amostras de urina, obtidas por jacto médio ou algália, são inoculadas em meio CLED (Cysteine Lactose Electrolyte Deficient medium) (BioMérieux, França), e incubadas a 37°C por um período de 16 a 24h. É considerada bacteriúria significativa, toda e qualquer cultura que apresente contagem igual ou superior a 1×10^5 CFU (*Colony Forming Unit*), procedendo-se ao isolamento do microrganismo potencialmente patogénico. Todos os outros produtos (pus, expetoração, sangue e dreno) foram inoculados nos mais diversos meios de cultura, segundo as normas de cultura e assepsia estabelecidas no laboratório e, uma vez positivas para a presença de microrganismos, confirmada pelo crescimento de colónias, procedeu-se à repicagem de colónias isoladas para Gelose de MacConkey (meio seletivo e diferencial, com violeta de cristal) (BioMérieux, França), Gelose de Chocolate (obtida a partir da gelose Columbia, pelo aquecimento da mistura com sangue a 80°C) (BioMérieux, França) ou Gelose de Sangue (gelose Columbia com 5 % de sangue de carneiro) (BioMérieux, França), consoante se tratasse de bacilos de Gram-negativo ou cocos de Gram-positivo e, no caso dos últimos, se se pretendia visualizar hemólise ou não. As placas são então incubadas a 37°C, por um período de 16 a 24h, em atmosfera rica em O₂, para posterior identificação e estudo do microrganismo em questão.

Paralelamente ao isolamento são feitos testes adicionais, com o intuito de obter o máximo de informação possível sobre o microrganismo em estudo, como é o exemplo da Coloração de Gram (que permite classificar a bactéria quanto à morfologia – cocos ou bacilos - e estrutura da parede celular – Gram-positivo ou Gram-negativo) e de

provas bioquímicas, cujo resultado vai, por exemplo, orientar a escolha do painel de identificação do aparelho automático.

2.1.1. Vitek

O VITEK 2[®] (Biomérieux, França) é um sistema automatizado adaptado ao laboratório de microbiologia clínica, que permite a identificação de microrganismos e a realização de testes de suscetibilidade a um painel de antimicrobianos num só dia, utilizando tecnologia baseada no crescimento microbiano. Este sistema permite a análise cinética, através da leitura por um sistema ótico que combina um fluorímetro e um fotómetro multicanais que registam alterações na fluorescência, turbidez e colorimetria.

A identificação do microrganismo em estudo é feita com recurso a uma carta de reagentes com 64 poços, cada um deles contendo um substrato individual e específico, permitindo, assim, avaliar a atividade metabólica do microrganismo quanto à acidificação, alcalinização, hidrólise enzimática, crescimento na presença de inibidores, entre outros. Uma película transparente, presente em ambos os lados da carta, garante a manutenção dos níveis de oxigénio, enquanto mantém o ambiente selado, prevenindo possíveis contaminações. O código de barras inserido na carta contém informação sobre o tipo de produto, lote, data de validade, e um identificador único, que pode associar a carta de identificação à amostra, antes ou depois da carta ser inserida no equipamento.

Atualmente o equipamento conta com quatro cartas de identificação microbiana distintas, sendo elas: i) Carta de identificação para bacilos de Gram-negativo, fermentadores e não fermentadores; ii) Carta de identificação para cocos de Gram-positivo e bacilos não formadores de esporos; iii) Carta de identificação para fungos leveduriformes e iv) Carta de identificação para bacilos de Gram-positivo, formadores de esporos.

O meio de cultura onde o microrganismo se encontra, o tempo passado entre a sementeira da cultura microbiana e a sua utilização no equipamento, as condições de incubação do inóculo na carta de identificação e a concentração do mesmo, são alguns dos parâmetros a considerar para a obtenção de uma correta identificação. Assim sendo, é de extrema importância que a cultura microbiana esteja fresca e pura. Para os

microrganismos de Gram-negativo, é preparada uma suspensão de 0,5 a 0,63 de turbidez na escala de McFarland, que é inoculada, através de um sistema de vácuo, na respetiva carta de identificação e incubada a $35,5\pm 1^{\circ}\text{C}$. Mais pormenores do processamento da amostra podem ser observados na figura 6. A cada 15 minutos, cada carta é retirada do carrossel de incubação e transportada para o sistema ótico onde, por transmitância, a comprimentos de onda dentro do espectro do visível, são feitas leituras das reações observadas em cada poço. Os resultados obtidos são então comparados com os resultados obtidos para estirpes conhecidas e bem caracterizadas que integram a base de dados do equipamento, obtendo-se uma identificação por aproximação. De referir que são ainda submetidas ao sistema automático, estirpes padrão, com o intuito de avaliar a qualidade deste quer na identificação bacteriana, quer no estudo da respetiva suscetibilidade aos antimicrobianos. Neste sentido foram testadas duas estirpes de referência, *E. coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 700603. Assim, os resultados dos testes só foram aceites quando o resultado do controlo de qualidade se encontrava entre os limites aceitáveis, de acordo com os critérios do CLSI.

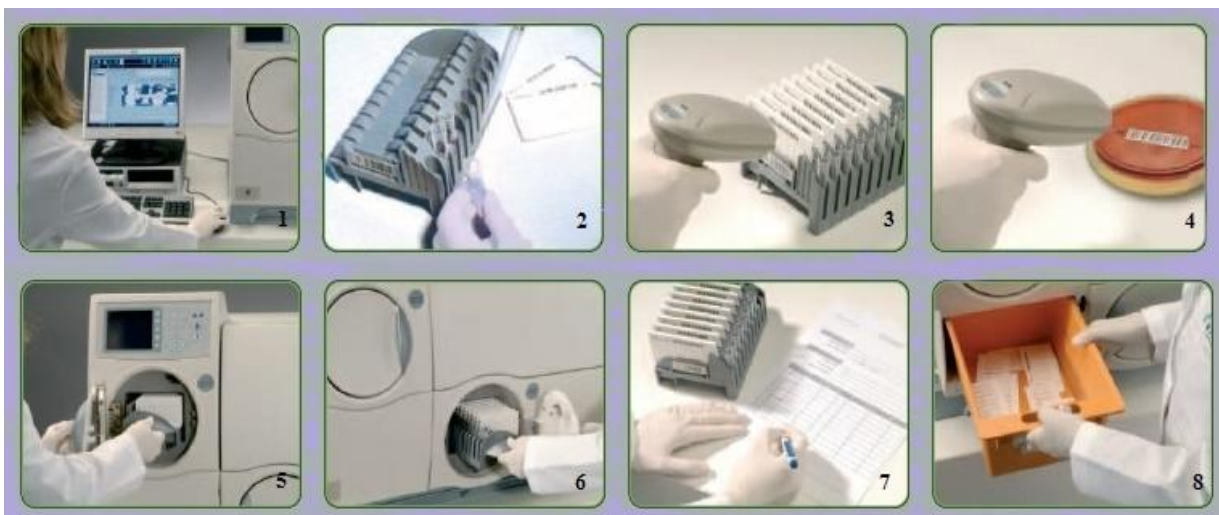


Figura 6: Pormenor da sequência de trabalho do Vitek 2. Da esquerda para a direita, de cima para baixo, [1] Suporte informático do equipamento; [2] Inoculação da suspensão microbiana nos tubos e posicionamento das cartas de identificação na cassete; [3] Identificação da carta, através de leitura de código de barras; [4] Identificação da amostra, que ficará associada à uma determinada carta identificada no ponto anterior; [5] A suspensão é inoculada nos poços da respetiva carta de identificação; [6] A cassete é transportada para o leitor; [7] Os resultados são impressos automaticamente quando a leitura da carta está completa e [8] Após identificação do microrganismo presente na suspensão bacteriana, as cartas são removidas do equipamento.

O painel de identificação de Gram-negativos foi formulado para a identificação automática de 135 *taxa*, bacilos de Gram-negativo, fermentadores ou não fermentadores, com grande significado clínico, baseado em provas bioquímicas amplamente estabelecidas, cuja listagem pode ser consultada no anexo 2, que permitem a identificação final do microrganismo em estudo num período de 18 a 24h.

2.2. Avaliação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos e pesquisa de AmpC

2.2.1. Vitek

De forma similar à metodologia utilizada para a identificação bacteriana, o Vitek 2[®] é também capaz de traçar um perfil de suscetibilidade a antibióticos para cada microrganismo identificado. O software Vitek 2[®] *Advanced Expert System*TM, especialmente desenvolvido para este equipamento, é capaz de interpretar e validar os resultados dos testes de suscetibilidade, por análise dos padrões de CMI, com rapidez e fiabilidade, e ainda detetar mecanismos de resistência aos antibióticos, mesmo quando a resistência é emergente ou expressa a níveis basais. Assim, no final de cada ciclo de incubação é obtido um valor de CMI que vai ditar o resultado interpretativo da suscetibilidade do microrganismo em estudo à ação de cada um dos antibióticos testados na carta, sendo este classificado como sensível, intermédio ou resistente.

O tipo de carta de suscetibilidade a usar é escolhido de acordo com o resultado da Coloração de Gram, sendo que neste estudo a determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos foi feito com recurso à utilização das cartas AST-N222 e AST-N192, cuja listagem de antimicrobianos e respetivas concentrações testadas podem ser consultadas nos anexos 3 e 4, respetivamente. De notar que o sistema acima descrito está definido, por defeito, para a pesquisa de AmpC apenas em estirpes de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

2.2.2. Discos de Cefoxitina, OXOID

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana em disco da OXOID são usados na determinação semi-quantitativa da suscetibilidade *in vitro* aos antibióticos, pela técnica de difusão em agar. Com o intuito de pesquisar AmpC plasmídicas, foram usados, neste estudo, discos de cefoxitina de 30µg (Oxoid, Reino Unido).

Usando uma cultura fresca e pura do microrganismo a testar, preparou-se uma suspensão de 0.5 de opacidade na escala de McFarland. Com o auxílio de uma zaragatoa esterilizada, espalhou-se a suspensão uniformemente na superfície de uma placa de agar Mueller-Hinton, de acordo com a metodologia do CLSI. Com a ajuda de uma pinça previamente esterilizada, colocou-se um disco de cefoxitina 30µg no centro da placa. A placa foi incubada a 35±2°C, em atmosfera aeróbica, durante 16 a 18h. Mediu-se e registou-se, em milímetros, o diâmetro de quaisquer zonas de inibição observadas. Os resultados foram interpretados pela comparação dos diâmetros das zonas de inibição.

De acordo com o diâmetro da zona de inibição, o microrganismo em estudo é suscetível à ação da cefoxitina se apresentar um halo na zona de inibição igual ou superior a 18mm; resistente se apresentar um halo na zona de inibição igual ou inferior a 14mm; e intermédio, se o seu halo estiver compreendido entre 15 e 17mm.

2.2.3. AmpC Detection Set, MASTDISCSTM ID, MAST

O kit AmpC Detection Set (D69C) (MAST, Reino Unido) foi desenvolvido para deteção da produção de enzimas β-lactamases do tipo AmpC, *in vitro*. Trata-se de um teste manual, formulado com 3 cartuchos de discos em que os discos do cartucho A contêm Cefpodoxime 10µg + discos de indução AmpC, os discos do cartucho B contêm Cefpodoxime10µg + indutor de AmpC + discos de inibição de ESBL e os discos do cartucho C contêm Cefpodoxime10µg + indutor de AmpC + inibidor de ESBL + discos de inibição de AmpC.

Usando uma cultura fresca e pura do microrganismo a testar, preparou-se uma suspensão de 0.5 de opacidade na escala de McFarland. Com o auxílio de uma zaragatoa esterilizada, espalhou-se a suspensão uniformemente na superfície de uma placa de agar Mueller-Hinton, de acordo com a metodologia do CLSI. Com a ajuda de uma pinça

previamente esterilizada, colocou-se um disco de detecção de cada tipo sob a superfície do meio inoculado, assegurando que existia espaço suficiente entre cada disco para permitir a formação de zonas claramente definidas de inibição. A placa foi então incubada a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$, em atmosfera aeróbica, durante 18 a 24h. Posteriormente, mediu-se e registou-se, em milímetros, o diâmetro de quaisquer zonas de inibição observadas; os discos que não mostraram zonas de inibição foram registados com um diâmetro de 6mm, como recomendado pelo fabricante. Os resultados foram interpretados pela comparação dos diâmetros das zonas de inibição.

Assim sendo, se após comparação da zona de inibição do disco A com as zonas de inibição de cada um dos discos B e C, se verificar diferenças de até 3mm entre os halos de inibição de crescimento entre cada um dos discos, o microrganismo em estudo deve ser registado como negativo para a produção de AmpC. Se a subtração de A de C (C-A) e a subtração de C de B (C-B) for igual ou superior a 5mm, o microrganismo em estudo apresenta atividade AmpC, o que deve ser considerado um resultado positivo. Se a subtração de C e A (C-A) e a subtração de B e A (B-A) for igual ou superior a 5mm e as zonas B e C apresentarem uma diferença máxima de 4mm entre a dimensão dos seus halos de inibição, então o microrganismo pode estar a demonstrar outro mecanismo de resistência.

De referir que, tanto no método referido no ponto 2.2.2., que diz respeito aos discos de cefoxitina, como no presente método, foram utilizados dois microrganismos para controlo, nomeadamente, *Escherichia coli* ATCC 25922 e duas estirpes de *Serratia marcescens* como controlos negativo e positivo, respetivamente. Três estirpes de *E. coli* escolhidas ao acaso, reportadas pelo Vitek 2 como negativas para a presença de AmpC foram usadas para avaliar a especificidade e sensibilidade de ambos os métodos.

3. Tratamento estatístico

A análise dos resultados foi feita com recurso ao programa informático *Statistical Package for the Social Sciences*, SPSS (versão 21.0 para Windows, Inc. Chicago, IL, USA), onde foi usada uma análise estatística descritiva simples (média, desvio padrão e frequências). Em valores qualitativos utilizaram-se o teste do Qui-quadrado (χ^2) e o teste de Fisher, consoante o tamanho da amostra, com o intuito de determinar diferenças entre variáveis. Em ambos os casos, o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Foram ainda utilizados um *software* de gestão de dados e estatística em plataforma *Windows XP* que permite a monitorização de dados múltiplos, provenientes do sistema automático de microbiologia Vitek 2[®] *Advanced Expert System* e o sistema informático *Appolo*, sistema de gestão laboratorial do serviço de Patologia Clínica, facilitando a gestão de doentes e requisições, a consulta do histórico de dados microbiológicos e a realização de estatísticas diversas.

IV. RESULTADOS & DISCUSSÃO

1. Caracterização da população em estudo

A recolha de amostras foi realizada entre Janeiro de 2012 e Maio de 2013. Foram estudadas 47 amostras, provenientes de vários serviços hospitalares do CHBV, nomeadamente, Consulta externa, Internamento e Urgência.

Analisando a distribuição dos indivíduos cujas amostras foram estudadas, observa-se que 59,6% ($n = 28$ de um total de 47 isolados) são do género feminino, ao passo que, 40,4% são do sexo masculino (19/47 isolados), figura 7, apresentando diferenças estatisticamente significativas. Assumindo que os resultados obtidos para a população em estudo refletem a distribuição e caracterização dos microrganismos portadores de AmpC nos indivíduos da área geográfica de ação do HIP, pode dizer-se que, microrganismos patogénicos produtores de AmpC são mais comuns entre indivíduos do sexo feminino, facto que pode ser justificado pelo tipo de infeção verificada. No caso, em cerca de 66% dos casos estudados, verificou-se que o microrganismo patogénico foi identificado no decurso de uma infeção do trato urinário, que se sabe mais comum entre mulheres, devido à anatomia do aparelho urinário feminino.

A distribuição da população em estudo por idades revela que 64% tem idade igual ou superior a 65 anos (30/47 isolados), 21% tem idades compreendidas entre os 15 e os 64 anos (10/47 isolados) e 15% da população tem idade igual ou inferior a 14 anos (7/47 isolados). No que diz respeito à tendência geral e dispersão, a média de idades é de $75 \pm 27,4$, com uma idade mínima de 1 ano e máxima de 92, aquando da colheita, demonstrando grande heterogeneidade no grupo de indivíduos em estudo quanto à idade. Os valores obtidos apresentam diferenças estatisticamente significativas, com maior prevalência para indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos, como observado na figura 8. Apesar da colonização deste tipo de microrganismos não ser exclusiva duma determinada faixa etária, é sabido que a população mais envelhecida, quer por sofrer de doenças crónicas ou pelo défice de barreiras ou defesas está mais exposta à ação dos microrganismos.

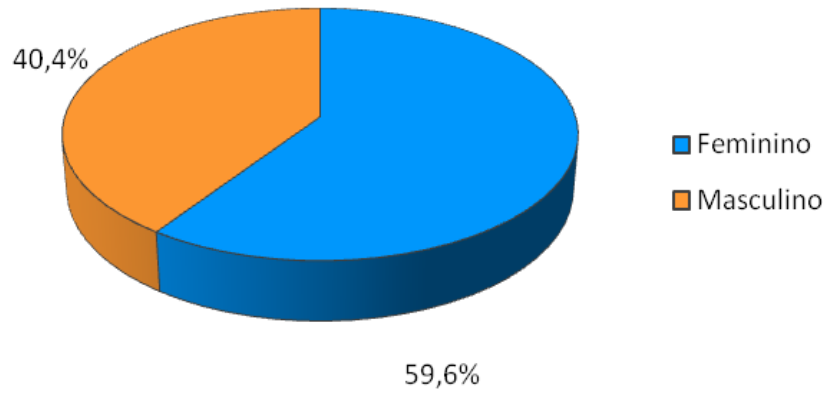


Figura 7: Distribuição da população em estudo por sexo.

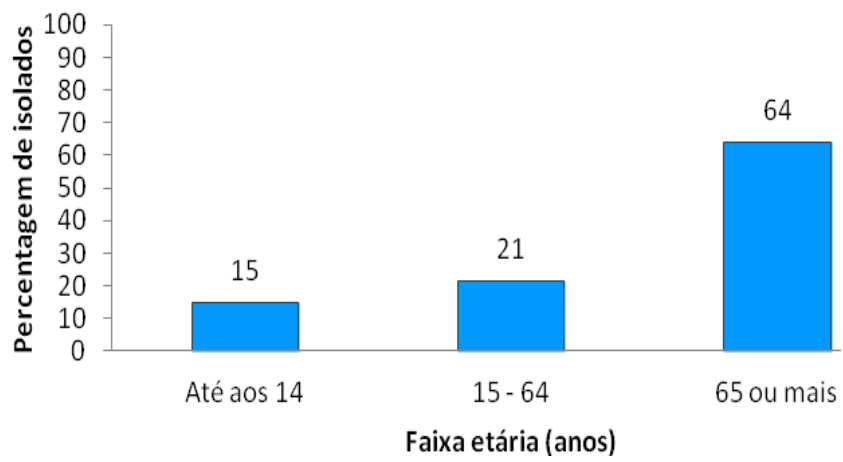


Figura 8: Distribuição da população em estudo por faixas etárias, em percentagem.

Quanto à proveniência dos indivíduos, a distribuição da população em estudo revela que, aquando da colheita, 55,3% (26/47 isolados) se encontrava em regime de ambulatório e 44,7% (21/47 isolados) em regime de internamento, como exposto na figura 9. Subentende-se que indivíduos em regime de ambulatório são todos aqueles que têm um contacto com o hospital na altura da colheita, provêm do exterior do hospital, da comunidade, ao passo que, indivíduos em regime de internamento são todos aqueles que estão hospitalizados na instituição. São considerados em regime de ambulatório os indivíduos cujas amostras foram colhidas na consulta externa e urgência.

A dispersão dos padrões de resistência antimicrobiana, especialmente através do mecanismo associado à produção de β -lactamases do tipo AmpC por parte dos diversos microrganismos da família *Enterobacteriaceae* parece estar mais disseminada na comunidade do que em ambiente hospitalar. Neste campo, os resultados obtidos vão contra ao expectável visto que muitos autores defendem que é em ambiente hospitalar que os microrganismos vão adquirindo resistência, muito devido à utilização de antibióticos restritos e à própria estrutura física dos edifícios hospitalares. A prevalência deste mecanismo na comunidade, relativamente ao ambiente hospitalar, pode ser justificada pela facilidade com que as bactérias trocam informação genética através dos mais variados elementos de transferência móveis, plasmídeos, transposões ou sequências de inserção, se multiplicam e adaptam às mais diversas condições e ambientes. A toma indiscriminada, massiva, imprudente e muitas vezes incorreta de antimicrobianos pela população em geral é também um fator que deve ser considerado.

Em relação às valências de internamento, verifica-se que o serviço de Cirurgia (42,9%, 9/21 isolados) foi o que mais contribuiu para a composição da amostra geral, seguido pelos serviços de Medicina (33,3%, 7/21 isolados), Urologia e Psiquiatria (cada um com 9,5%, 2/21 isolados) e, por último, Infeciologia (4,8%, 1/21 isolados), figura 10.

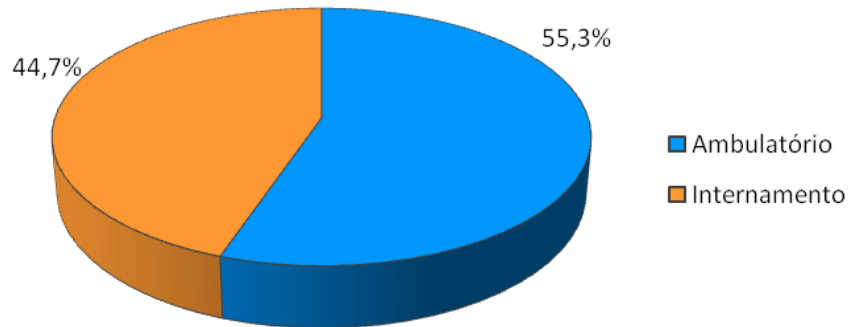


Figura 9: Proveniência da população em estudo. Nomeia-se amostra de ambulatório, toda e qualquer amostra que seja proveniente de um indivíduo oriundo da comunidade e amostra de internamento, toda e qualquer amostra proveniente de um indivíduo hospitalizado.

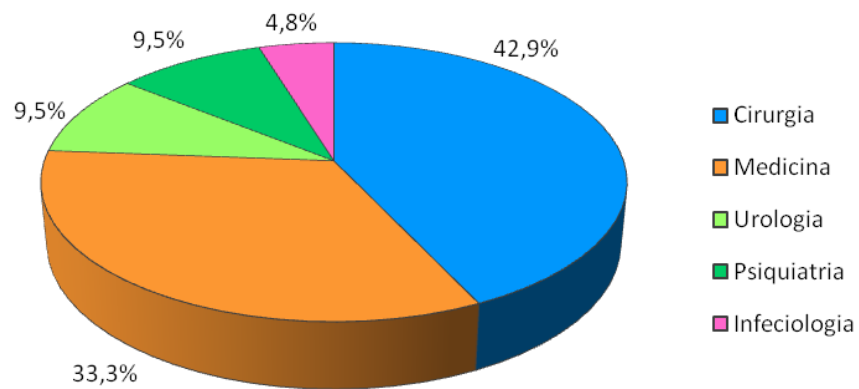


Figura 10: Distribuição da população em estudo em regime de internamento.

2. Caracterização dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos usados neste estudo foram obtidos a partir de uma grande diversidade de produtos biológicos. Cerca de 63,8% dos microrganismos identificados provieram de urina (30/47 isolados), 17% de pus (8/47 isolados), 8,5% de expetoração (4/47 isolados), 6,4% de cultura de sangue (3/47 isolados) e 4,3% dos microrganismos provieram de colheitas feitas a partir de dreno (2/47 isolados). Na figura 11 pode observar-se a distribuição das amostras estudadas por produto biológico, em percentagem. A urina assume principal destaque como produto biológico de referência para análise laboratorial microbiológica uma vez que, infeções do trato urinário são das patologias mais comuns e mais frequentemente observadas, justificando assim a sua predominância face aos outros produtos biológicos colhidos.

Dos 47 bacilos de Gram-negativo identificados pelo sistema automático, 42,6% foram reportados como sendo *Escherichia coli* (20/47 isolados), 14,9% como sendo *Morganella morganii* (7/47 isolados), 12,8% como sendo *Citrobacter freundii*, 12,8% como sendo *Klebsiella pneumoniae* (6/47 isolados), 8,5% como sendo *Enterobacter aerogenes* e ainda 8,5% como sendo *Enterobacter cloacae* (4/47 isolados), figura 12. De entre as estirpes mais predominantes destacam-se a *Escherichia coli* e a *Morganella morganii*, seguida de *Klebsiella pneumoniae*, sendo que a percentagem de *Morganella morganii* observada é um pouco superior ao esperado, dado que apesar de não ser tão frequente em infeções do trato urinário, este microrganismo está associado a infeções nosocomiais. No que diz respeito aos isolados de *E. coli*, 55% são provenientes de indivíduos cuja colheita foi feita no serviço de urgência, valor muito superior aos 15% colhidos quer na consulta externa, quer na medicina. No caso de estirpes de *M. morganii*, identificações em produtos biológicos oriundos do serviço de urgência foram observados em 57,1% dos casos, cabendo à cirurgia a percentagem de 28,6% e à medicina 14,3%. Já no que diz respeito a *K. pneumoniae*, regista-se que 50% dos isolados são provenientes de indivíduos cuja colheita foi efetuada no serviço de medicina, 33,3% dos isolados resultaram de colheitas efetuadas no serviço de urgência e 16,7% dos isolados chegaram ao laboratório por parte da consulta externa.

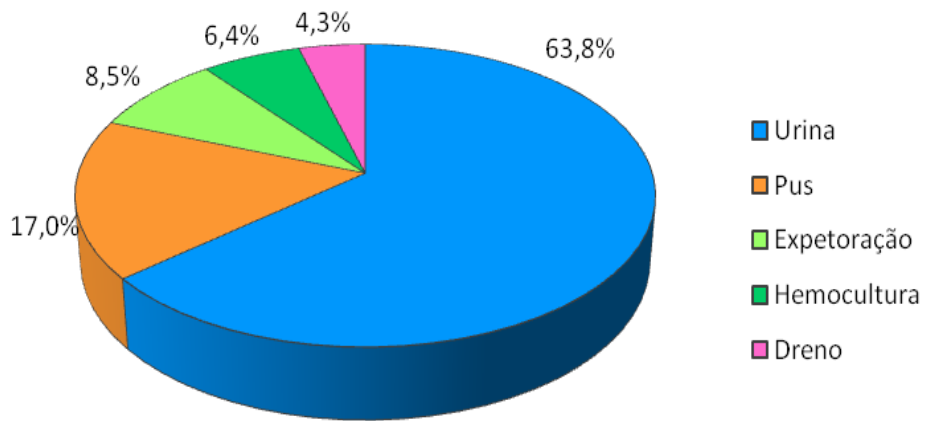


Figura 11: Distribuição das amostras estudadas por produto biológico.

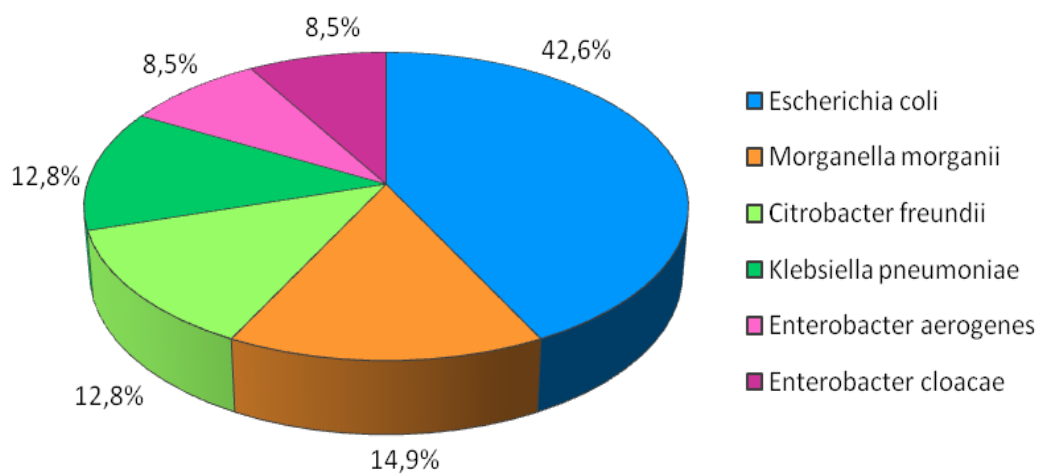


Figura 12: Distribuição das amostras estudadas por microrganismo identificado.

Estudos além fronteiras identificam a *E. coli* como a enterobactéria mais comumente isolada na prática clínica, a larga escala. Em Portugal, e no HIP em particular, essa tendência também é observada. Da mesma forma, são vários os centros que, um pouco por todo o mundo, reportam as espécies *E. coli* e *K. pneumoniae* como as mais associadas à produção de AmpC plasmídicas. Uma vez que estirpes de *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *Hafnia alvei* e *M. morgani* estão descritas por diversos autores como produtoras de β -lactamases do tipo AmpC de origem cromossômica (40), os resultados obtidos neste estudo relativos à prevalência dos microrganismos portadores de AmpC plasmídicas estão de acordo com os observados na literatura, observando-se em estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae*. Resultados idênticos foram publicados por Manageiro e outros em 2010 (67), e pela primeira vez em Portugal, relativos à ocorrência e disseminação deste tipo de enzimas a nível hospitalar.

3. Caracterização do perfil de suscetibilidade aos antibióticos

A resistência crescente aos antibióticos por parte das bactérias tem vindo a limitar as opções terapêuticas aplicáveis (81, 82), verificando-se uma tendência clara na redução da suscetibilidade a, de um modo geral, todos os grupos de antibióticos (82, 83). Por conseguinte, a identificação precoce de infeções causadas por estes microrganismos é necessária, na medida em que um tratamento adequado, com início rápido, quase imediato, poderia evitar o agravamento dos quadros clínicos dos indivíduos em questão (84, 85).

Todas as amostras incluídas neste estudo foram submetidas a testes de suscetibilidade antimicrobiana, através das cartas AST-N222 e AST-N192, no equipamento automático Vitek 2. A análise do perfil de resistência será apresentada de seguida, para cada uma das espécies identificadas. Tais determinações têm uma importância particular, visto que permitem direcionar a antibioterapia de acordo com características específicas de cada microrganismo. De referir que, clinicamente, um perfil de resistência microbiana a determinado antibiótico, com percentagem superior a 20%, deve ser desconsiderado da antibioterapia.

Analisando as frequências de resistência aos antibióticos em *E. coli* (figura 13) verifica-se um perfil mais acentuado no que diz respeito aos β -lactâmicos, nomeadamente, cefalosporinas e penicilinas, seguido de quinolonas e sulfonamidas. Cefalotina e ampicilina são ineficazes para 85% dos isolados de *E. coli*, cefuroxima axetil para 80% dos isolados, a associação amoxicilina/ácido clavulânico para 75% dos isolados, cefuroxima sódica para 70% dos isolados, cefotaxima e ceftazidima para 55% dos isolados. Os antibióticos contra os quais foram expressas menores taxas de resistência foram a tobramicina (10% dos isolados de *E. coli* resistentes), e a piperacilina associada a tazobactam, sendo que esta última associação de antibióticos demonstrou ser ineficaz apenas contra 5% dos isolados. De notar a ausência de resistência, ou seja, total perfil de suscetibilidade dos isolados de *E. coli* estudados para os antimicrobianos gentamicina, nitrofurantoína e ertapenem.

Nos isolados de *M. morgani*, figura 14, denotam-se maiores taxas de resistência dos microrganismos entre agentes como penicilinas e cefalosporinas, onde a percentagem de resistência atinge os 100% em vários casos (cefuroxima, ceftazidima,

cefotaxima, ampicilina, amoxicilina e ácido clavulânico, entre outros). Paralelamente, os isolados apresentam ainda uma percentagem de resistência de 43% a aminoglicosídeos (gentamicina e tobramicina) e certas quinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina). Por outro lado, mostram-se totalmente suscetíveis ao ertapenem e à associação piperacilina/tazobactam.

Com um perfil de resistência aos antibióticos muito semelhante ao de *M. morgani*, os isolados de *C. freundii* apresentam uma taxa de resistência de 100% a penicilinas, cefalosporinas e associações de β-lactâmico/inibidor de β-lactamases. Mais pormenores sobre tais valores de resistência podem ser consultados na figura 15. São observadas ainda resistências a quinolonas, sulfonamidas, aminoglicosídeos e carbapenemos compreendidas entre os 67 e os 17% por parte destes microrganismos.

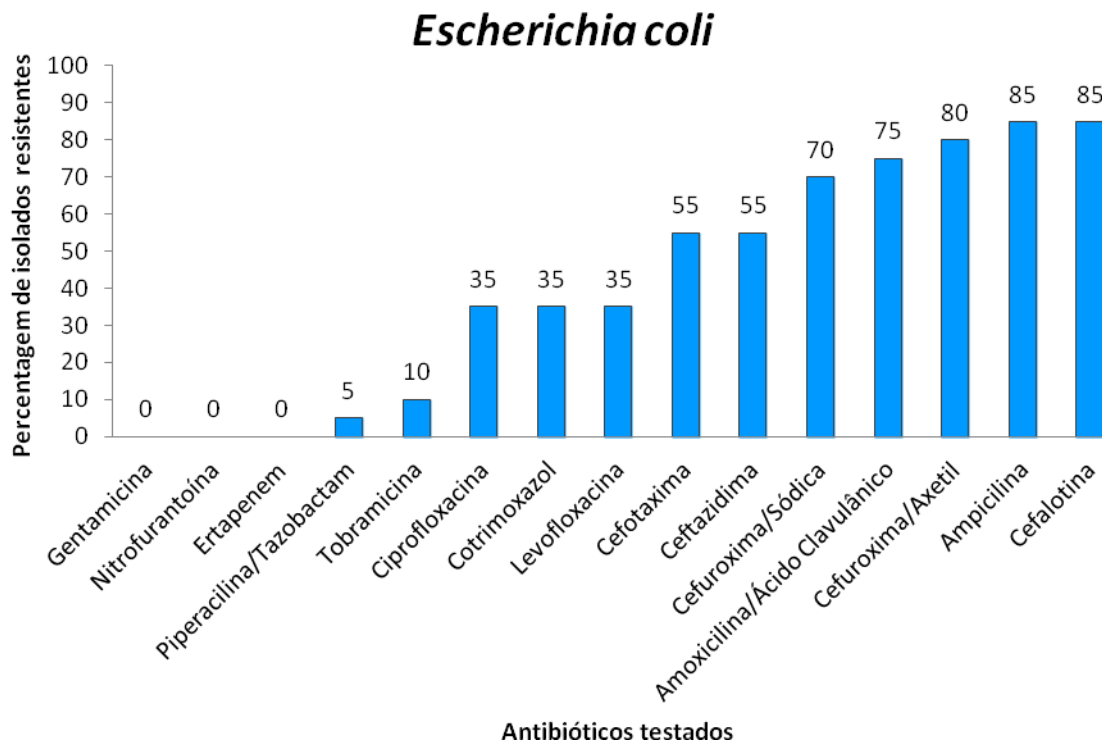


Figura 13: Perfil de resistência dos isolados de *Escherichia coli*, frente a um painel de antibióticos. A resistência é expressa em percentagem.

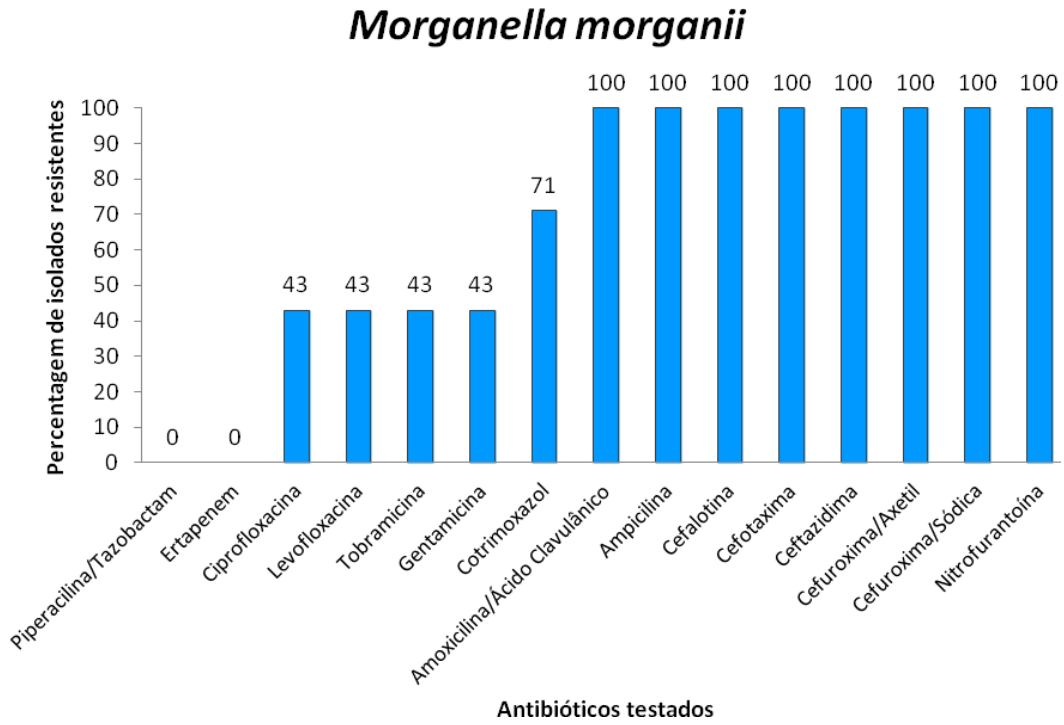


Figura 14: Perfil de resistência dos isolados de *Morganella morganii*, frente a um painel de antibióticos. A resistência é expressa em percentagem.

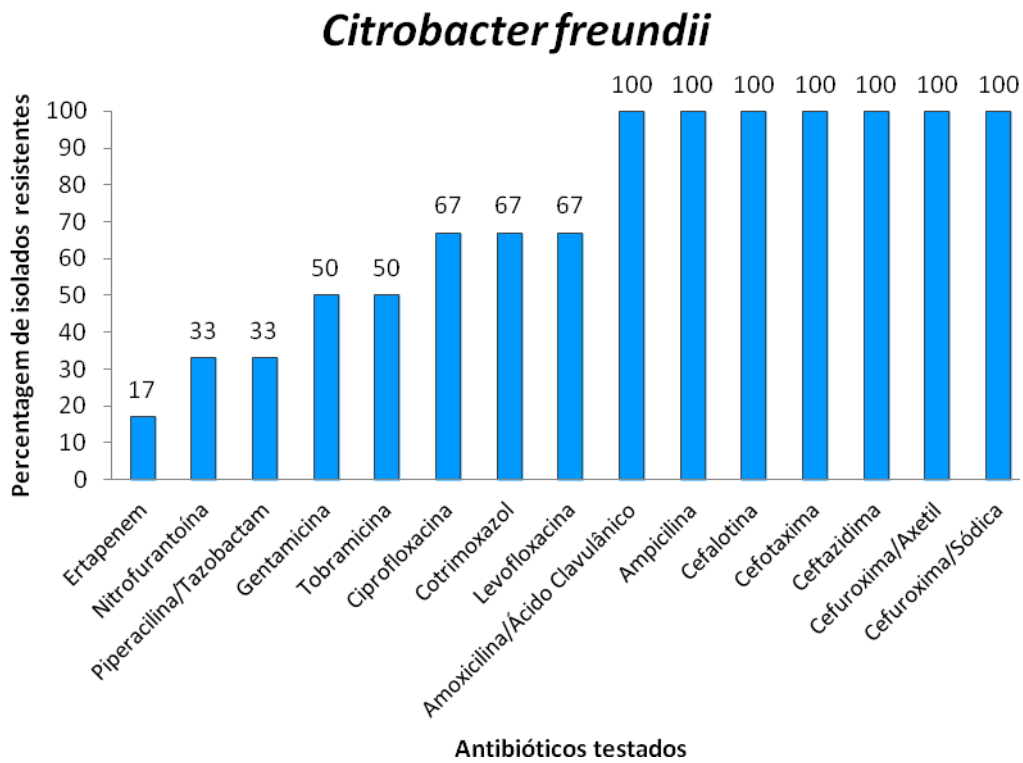


Figura 15: Perfil de resistência dos isolados de *Citrobacter freundii*, frente a um painel de antibióticos. A resistência é expressa em percentagem.

No que diz respeito aos isolados de *K. pneumoniae* (figura 16), reporta-se uma resistência de 100% a quinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina) e à associação β -lactâmico/ inibidor de β -lactamases para a amoxicilina/ácido clavulânico. Piperacilina/tazobactam, cotrimoxazol, cefuroxima sódica, cefuroxima axetil, cefalotina e ampicilina estão entre os agentes com maiores taxas de resistência, com um valor igual a 83%. Observa-se ainda uma resistência de 67% dos isolados frente à nitrofurantoína, de 50% à ceftazidima e de 33% à tobramicina, gentamicina e cefotaxima. 100% dos isolados mostram-se suscetíveis à ação antimicrobiana do ertapenem.

Na figura 17 pode ser observado o perfil de resistência dos isolados de *E. aerogenes* a uma variedade de antibióticos donde se infere que tais isolados são resistentes às cefalosporinas e a algumas penicilinas testadas, com taxas de resistência de 100%. 75% dos isolados são ainda resistentes à associação piperacilina/tazobactam e em 50 % dos isolados é também observada resistência à tobramicina, nitrofurantoína e gentamicina. De entre os antibióticos contra os quais foram expressas menores taxas de resistência entre os isolados está o cotrimoxazol, com uma percentagem de 25%. Os isolados mostram-se sensíveis às quinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina) e aos carbapenemos (ertapenem).

Relativamente aos isolados de *E. cloacae* (figura 18) verifica-se uma taxa de resistência de 100% contra os antibióticos cefuroxima axetil, cefalotina, ampicilina e associação amoxicilina/ácido clavulânico. A cefuroxima sódica, ceftazidima e cefotaxima são ineficazes contra 75% dos isolados, ao passo que, a tobramicina e a gentamicina são ineficazes apenas contra 50% dos isolados. A menor taxa de resistência, 25%, corresponde à ação dos microrganismos sobre o cotrimoxazol e à associação piperacilina/tazobactam. De forma semelhante aos isolados de *E. aerogenes*, estes também se mostram totalmente suscetíveis, com uma percentagem de 100% de suscetibilidade, para os antibióticos ciprofloxacina, levofloxacina e ertapenem, acrescido da nitrofurantoína.

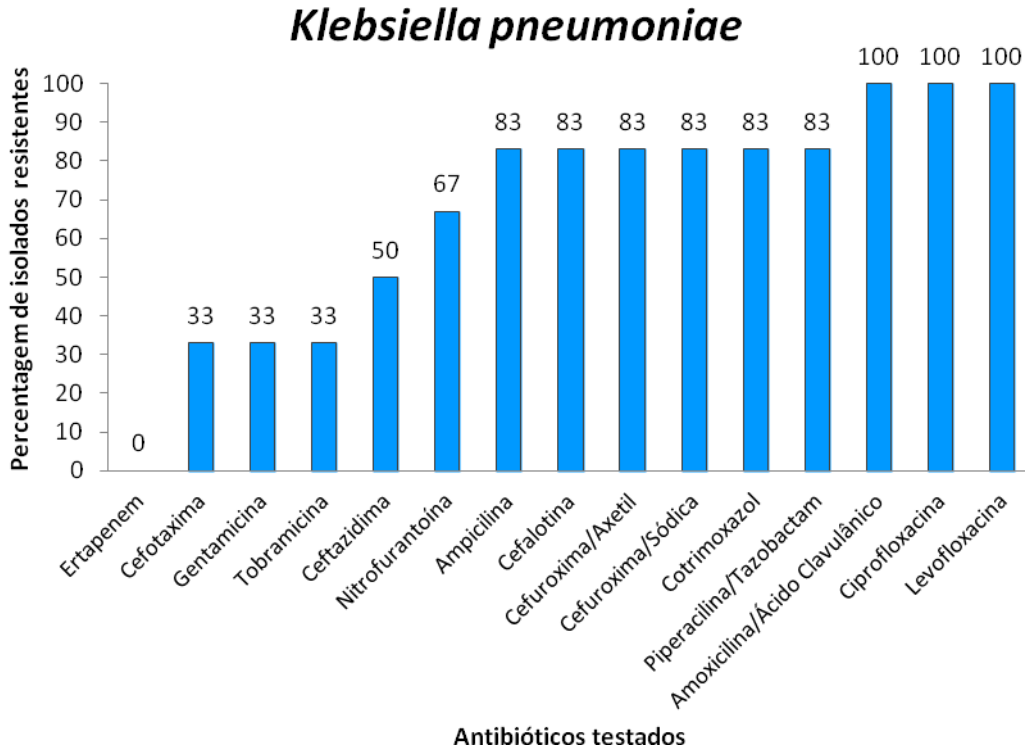


Figura 16: Perfil de resistência dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* frente a um painel de antibióticos. A resistência é expressa em porcentagem.

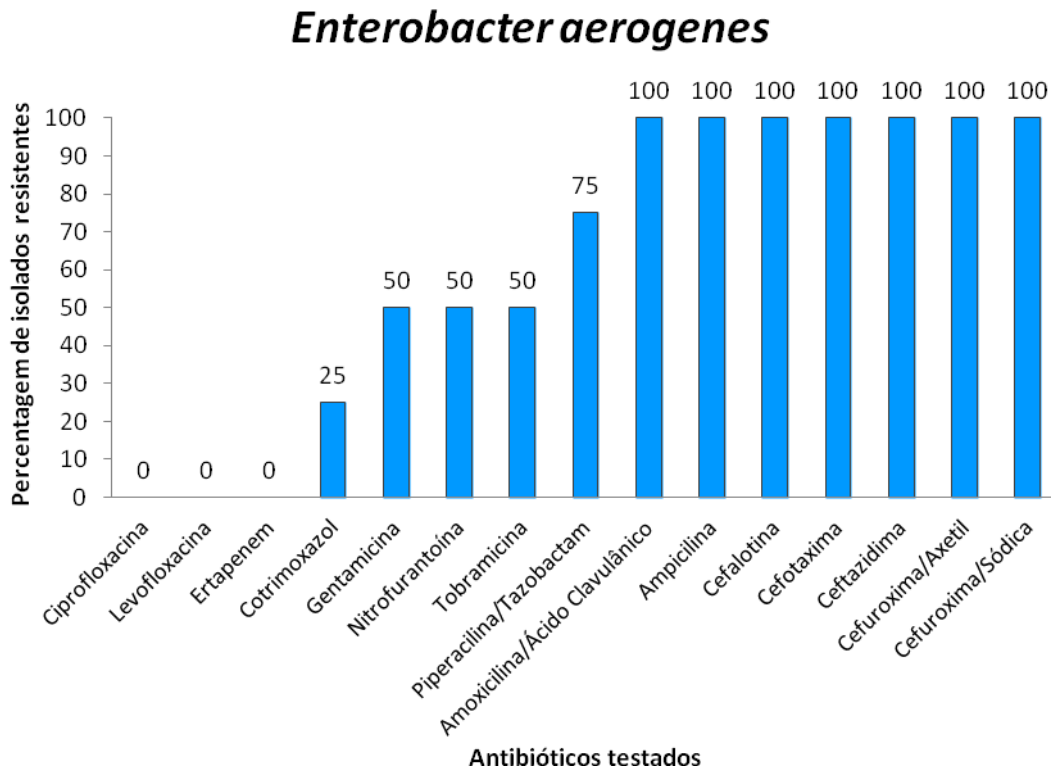


Figura 17: Perfil de resistência dos isolados de *Enterobacter aerogenes* frente a um painel de antibióticos. A resistência é expressa em porcentagem.

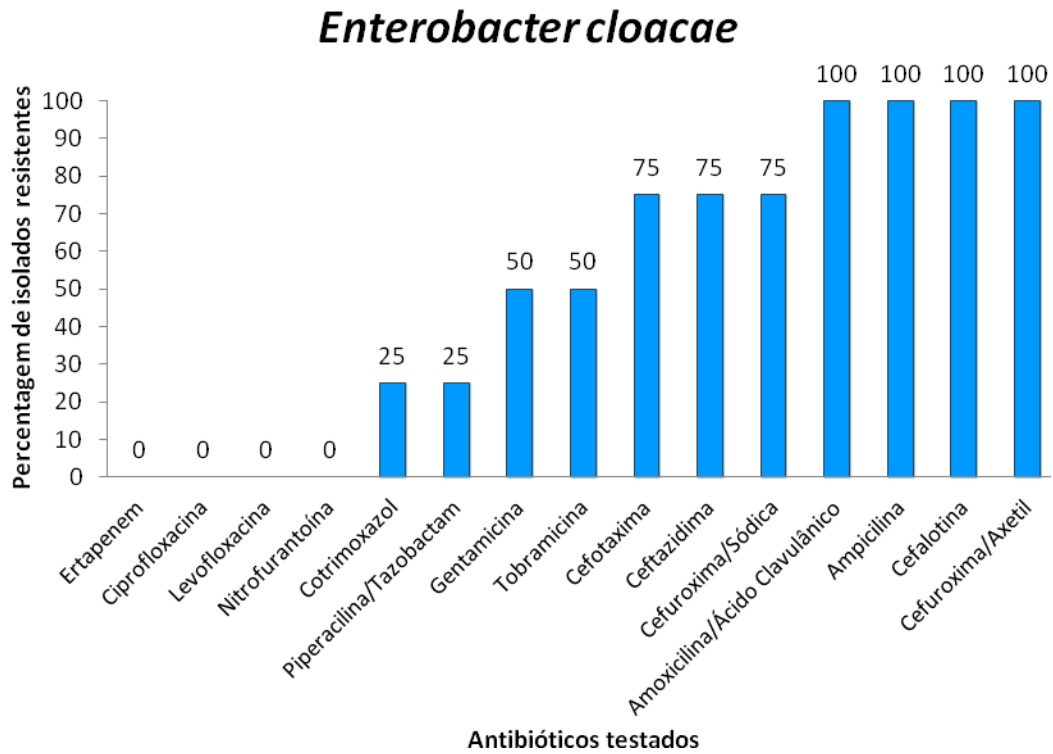


Figura 18: Perfil de resistência dos isolados de *Enterobacter cloacae* frente a um painel de antibióticos. A resistência é expressa em percentagem.

Uma análise do perfil de resistência dos diversos microrganismos estudados por grupo de antibióticos mostra que as maiores taxas de resistência estão associadas a cefalosporinas e penicilinas, seguidas pelo grupo dos β -lactâmicos/inibidor de β -lactamases, quinolonas, sulfonamidas, aminoglicosídeos e carbapenemos. Deste modo, a ampicilina e a cefalotina não apresentam ação contra 91,5% dos microrganismos; a associação amoxicilina-ácido clavulânico e a cefuroxima-axetil mostram-se ineficazes contra 89,4% dos microrganismos testados. À cefuroxima-sódica e ceftazidima são reportadas taxas de resistência de 83 e 72,3%, respetivamente. À cefotaxima faz-se corresponder uma percentagem de resistência de 70,2%. O cotrimoxazol é ineficaz contra 48,9% dos isolados, ao passo que, a ciprofloxacina e a levofloxacina, ambas com a mesma percentagem, são ineficazes contra 42,6% dos isolados. 31,9% dos isolados são ainda resistentes à nitrofurantoína e 29,8% à tobramicina. Observa-se ainda uma resistência de 25,5% dos isolados quer à gentamicina, quer à associação piperacilina-tazobactam. O menor valor de resistência, de apenas 2,1%, pertence ao antimicrobiano

ertapenem. De referir ainda que os isolados estudados demonstram suscetibilidade em 100% dos casos aos antimicrobianos amicacina, aztreonam, cefepime, colistina, imipenem, meropenem, minociclina, rifampicina e associação β -lactâmico/inibidor de β -lactamase, ticarcilina/ácido clavulânico, todos estes incluídos nas cartas de suscetibilidade antimicrobiana testadas.

O autor Biedenbach e colegas, num estudo que tinha como finalidade determinar a ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana em isolados provenientes de infecções da corrente sanguínea, cujos resultados foram retirados do programa SENTRY, *Antimicrobial Surveillance Program*, de 1997 a 2002, onde foi incluído Portugal, verificou perfis de resistência bastante inferiores aos observados neste trabalho, para isolados de *E. coli*, *Klebsiella spp.*, e *Enterobacter spp* (86). Tais diferenças podem ser justificadas não só pela diferença temporal ocorrida entre o estudo referido e os resultados atuais, uma vez que os microrganismos, no geral, têm demonstrado crescentes perfis de resistência ao longo dos últimos anos mas também pelo fato de que os isolados incluídos neste estudo apresentavam elevados perfis de resistência a determinados antimicrobianos, sendo este um dos critérios de seleção da amostra.

Num estudo que reúne informação de perfis de suscetibilidade a 21 agentes antimicrobianos mais comumente utilizados na prática clínica, contra cerca de 49 mil *Enterobacteriaceae*, incluídas no programa SENTRY, que abrange a Europa, América do Norte, América Latina e a região da Ásia-Pacífico, num período de 1997 a 2001, é defendido que, no que diz respeito ao espectro de ação dos antimicrobianos contra enterobactérias, os carbapenemos, cefalosporinas de quarta geração, aminoglicosídeos e quinolonas demonstram ser os mais eficazes. Estes resultados estão de acordo com os observados para os carbapenemos, onde se verifica uma suscetibilidade quase total por parte dos isolados ao meropenem e imipenem. De forma semelhante, a amicacina surge como o aminoglicosídeo com janela de ação mais abrangente, resultado semelhante ao observado pelos autores que reportam uma suscetibilidade à amicacina em 97,3% dos casos, no estudo supra enunciado. De entre os antibióticos β -lactâmicos, os autores defendem que o aztreonam e a cefepime estão entre os que possuem maior espectro de atividade sobre as estirpes isoladas; ambos os antimicrobianos apresentam 100% de eficácia contra os isolados estudados no presente trabalho. Contrariamente, no que diz respeito às fluoroquinolonas, os resultados obtidos neste estudo são discordantes dos referidos no artigo; aqui, ciprofloxacina e levofloxacina apresentam percentagens de

resistência de 42,9% ao passo que os autores as reportam como apresentando resistências de 9,5% e 8,3%, respetivamente, sobre os microrganismos estudados. (87)

Quer no *Annual epidemiological report* de 2012, quer no *Antimicrobial resistance surveillance Europe* de 2011, ambos os documentos da responsabilidade do *European Centre for Disease prevention and Control* (ECDC), foram avaliados microrganismos de mais de 1400 hospitais, com especial incidência na resistência antimicrobiana na Europa. Destes vão destacar-se a *E. coli* e a *K. pneumoniae* por serem comuns aos isolados incluídos neste estudo. No que diz respeito à *E. coli* e à semelhança das observações efetuadas por este órgão em anos anteriores, verificou-se um aumento da resistência antimicrobiana desta estirpe em 2010, sendo que a maior percentagem de resistência observada é reportada para aminopenicilinas, variando entre 34 e 83% consoante o país em causa. A percentagem destes isolados, resistentes às cefalosporinas de terceira geração, demonstrou um gradiente de norte para sul, onde os países situados no sul da Europa apresentam maiores taxas de resistência antimicrobiana. Nos últimos quatro anos, a percentagem de *E. coli* resistente a cefalosporinas de terceira geração aumentou significativamente em metade dos países incluídos nos estudos referidos, com exceção da Áustria e Portugal, onde se observou uma diminuição da resistência. No nosso país e segundo os dados fornecidos, a resistência às cefalosporinas de terceira geração observou-se em 10 a 25% dos isolados de *E. coli*. Esta percentagem difere do resultado obtido para a amostra em estudo onde 55% dos isolados de *E. coli* são resistentes à ceftazidima. Os manuais referem ainda que no período de 2007 a 2010, se observou também um aumento significativo na percentagem de isolados de *E. coli* multirresistentes, com observação de resistência combinada a três ou mais antibióticos, nomeadamente, aminopenicilinas, cefalosporinas de terceira geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, em 10 dos 28 países inscritos, incluindo Portugal. Quanto à *K. pneumoniae*, a percentagem de isolados resistentes às cefalosporinas tem vindo a aumentar na Europa, variando entre 2 a 76%, consoante o país; em Portugal, esta resistência verifica-se em 25 a 50% dos casos. De forma similar aos isolados de *E. coli*, a maioria dos isolados resistentes a cefalosporinas de terceira geração são também resistentes a fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, sendo que a resistência combinada se manifestava em 10 a 25% dos isolados de *K. pneumoniae* abrangidos nos estudos, em 2010. Já em 2012, Portugal demonstrava uma percentagem correspondente a 21% de resistência combinada entre estes isolados. É ainda reportada

uma resistência crescente por parte de estirpes de *K. pneumoniae* aos carbapenemos, em dez dos países inseridos nos relatórios, incluindo Portugal, resistência essa que não é verificada nos isolados bacterianos incluídos no presente estudo. (88, 89)

Assim, e tendo em conta os perfis de resistência obtidos contra os diversos antimicrobianos testados, num panorama global, onde não é tida em conta a taxa de resistência particular de cada espécie, a amostra em estudo teria como opções terapêuticas o antimicrobiano ertapenem, acrescido dos fármacos supra enunciados como apresentando 100% de eficácia na ação antimicrobiana para os isolados estudados, salvaguardando que os resultados obtidos para o estudo da suscetibilidade antimicrobiana, *in vitro*, pode não se verificar *in vivo*. Nesta condição estão incluídas as penicilinas, desaconselhadas para o tratamento de infeções causadas por microrganismos portadores de β -lactamases do tipo AmpC, uma vez de desde longa data se tem vindo a demonstrar a capacidade de inativação destes compostos pela enzima. Tal recomendação consta da regulamentação definida pelo EUCAST para os testes de suscetibilidade antimicrobiana, na revisão de 2011. Este documento reporta ainda que a resistência intrínseca da família *Enterobacteriaceae* a agentes antimicrobianos como benzilpenicilinas, glicopéptidos, ácido fusídico, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, rifampicina, daptomicina e linezolid, com algumas exceções, deve ser considerada aquando da escolha da antibioterapia, mesmo quando se observam valores de CMI muito próximos do suscetível, uma vez que o fármaco não é considerado clinicamente ativo. Neste contexto, *C. freundii*, *E. cloacae* e *E. aerogenes* são reportados como detentores de resistência intrínseca à penicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefazoline e cefoxitina; isolados de *Klebsiella spp.* apresentam resistência intrínseca contra a ampicilina e a ticarcilina; antimicrobianos como a ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefazoline, cefuroxima, tigeciclina, colistina e nitrofurantoína são ineficazes contra estirpes de *M. morganii*.

4. Pesquisa e detecção de AmpC

A detecção de isolados produtores de β -lactamase do tipo AmpC é considerada crítica em estudos epidemiológicos e controlo da infeção hospitalar, não existindo ainda critérios aprovados por qualquer organização para a confirmação fenotípica da presença de AmpC (82, 90), uma vez que, atualmente, nas diretrizes de orientação consultadas (BSAC, CLSI e EUCAST) figuram apenas recomendações relativas à pesquisa de AmpC (cromossómicas desreprimidas ou mediadas por plasmídeos), não existindo portanto, qualquer recomendação sobre técnicas de confirmação (91, 92).

O autor Polsfuss, em cooperação com outros colegas, apresenta um painel de diagnóstico que pretende que seja simples, com vista à detecção de enterobactérias produtoras de AmpC, baseado em três etapas: i) pesquisa do fenótipo de resistência, seguido de ii) teste confirmatório da presença do fenótipo, onde iii) os resultados inconclusivos seriam submetidos a testes moleculares (93). Não negando os testes genotípicos como técnica *golden standard* para o cálculo destes parâmetros, uma vez que detetariam uma variedade de genes AmpC, tão grande como o número de famílias e variantes existentes desta enzima (com sequenciação do promotor de AmpC nas variantes cromossómicas e dos vários genes *ampc* nas variantes plasmídicas), seria financeiramente dispendioso e temporalmente incomportável quando aplicado a um grande número de amostras, na rotina diária hospitalar (90, 93). Assim, a viabilidade das técnicas fenotípicas aplicadas à detecção desta enzima têm-se demonstrado apelativas.

Todo e qualquer microrganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae* cujo perfil de suscetibilidade aos antibióticos retrate um quadro de resistência às penicilinas e cefalosporinas (da primeira à terceira geração), bem como à associação de β -lactâmico/inibidor de β -lactamase, em especial à amoxicilina/ácido clavulânico deverá ser pesquisado como produtor da enzima β -lactamase do tipo AmpC. Nesse sentido, as amostras da população em estudo foram submetidas aos testes de pesquisa e detecção de AmpC com base em discos de cefoxitina e de cefpodoxime, cujos resultados se apresentam nos tópicos abaixo.

4.1. Pesquisa de AmpC com recurso ao teste de suscetibilidade da cefoxitina

β -lactamases do tipo AmpC cromossómicas desreprimidas ou mediadas por plasmídeos podem ser distinguidas de ESBL pelo facto de que conferem resistência às cefamicinas (68). A cefoxitina é uma cefamicina que se comporta como uma cefalosporina de segunda geração, um pouco mais estável que as demais cefalosporinas frente às β -lactamases de *E. coli* e *K. pneumoniae*. É amplamente usada na prática clínica como método preditivo para a pesquisa de β -lactamases do tipo AmpC plasmídicas em *Enterobacteriaceae* (91, 92). Assim, um microrganismo portador de uma AmpC plasmídica demonstrará suscetibilidade diminuída à cefoxitina. Trata-se de um teste sensível, específico, de fácil leitura e interpretação que permite averiguar a suscetibilidade dos microrganismos aos antibióticos β -lactâmicos.

Neste teste de suscetibilidade à cefoxitina observou-se que 70% dos isolados bacterianos foram resistentes a este antibiótico, 17% dos isolados foram suscetíveis a este antibiótico e 13% dos isolados apresentaram suscetibilidade intermédia (figura 19). A observação de resistência ao antibiótico por parte dos microrganismos dá-nos uma indicação de que este apresenta atividade AmpC, indicação esta que deve ser confirmada por testes adicionais.

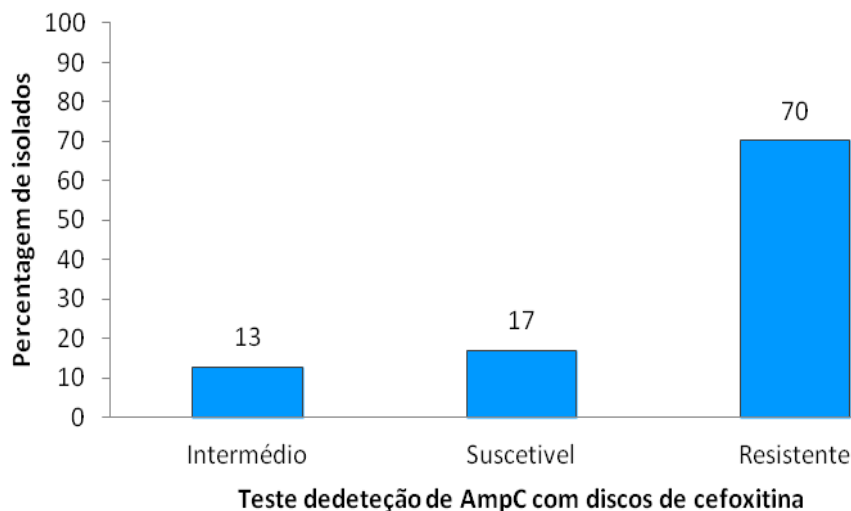


Figura 19: Pesquisa de AmpC com recurso a testes de suscetibilidade à cefoxitina. Resultados apresentados em percentagem.

Em 2009, o CLSI definiu como *cut-off* para a pesquisa de AmpC em enterobactérias a observação de halos de inibição iguais ou inferiores a 18mm para discos de cefoxitina de 30µg. Aplicando este critério à amostra em estudo observou-se então que, em 85% (40/47) dos isolados, a pesquisa inicial da enzima se revela positiva e em 15% (7/47) dos isolados, o resultado foi negativo para a pesquisa da enzima. Os halos de inibição observados pela ação dos discos impregnados com cefoxitina nos microrganismos controle estão de acordo quer com os descritos na literatura, quer com os resultados esperados facultados pelo fabricante, validando assim os resultados obtidos no teste. Desde 1988 que microrganismos resistentes à cefoxitina têm vindo a ser identificados como portadores de AmpC plasmídicas, em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* (57, 90, 94). Cerca de dez anos depois, Winokur (95), num estudo de prevalência de AmpC e caracterização dos isolados, com duração de dois anos, observou uma taxa de resistência à cefoxitina de 15 a 61% para isolados de *K. pneumoniae* e de 44 a 75% para isolados de *E. coli*, variando consoante a região de estudo, entre a Europa, América e Pacífico ocidental.

A sensibilidade do método fenotípico usado na pesquisa de isolados produtores de β -lactamases do tipo AmpC depende do tipo de enzima encontrada (90). As três amostras usadas para fins de avaliação da sensibilidade e especificidade do teste mostraram-se clarificadoras, uma vez que os resultados obtidos nos halos de inibição estavam de acordo com o esperado, na medida em que foram de encontro ao previamente conhecido sobre os isolados. No entanto, e apesar de muitos autores proclamarem esta técnica com sendo sensível e específica (93, 96, 97), com valores superiores a 95% nos dois parâmetros, esta apresenta algumas limitações. Uma diminuição do perfil de suscetibilidade à cefoxitina, num determinado microrganismo, pode não só ser indicativa da presença da enzima AmpC mas também ser justificada pela produção de outros mecanismos de resistência antimicrobianos mediados por enzimas como metalo- β -lactamases ou simplesmente pela diminuição do número de porinas, com consequências na entrada do fármaco para o interior do microrganismo (68).

4.2. Detecção de AmpC com recurso ao kit AmpC Detection Set

São vários os métodos propostos para a confirmação da presença de β -lactamases do tipo AmpC nos microrganismos (98). No entanto, muitos são complexos e trabalhosos. A técnica de confirmação é escolhida de acordo com o número de isolados a testar e os tipos de AmpC que se pretendem investigar.

No sentido de confirmar a presença da enzima, em todas as suas variantes – cromossômica ou plasmídica – foi desenvolvido um teste baseado em discos de cefpodoxime, uma cefalosporina de terceira geração, pela casa comercial MAST. Neste kit em particular e consoante os discos, esta cefalosporina é associada a um indutor de AmpC, a um inibidor de ESBL + indutor de AmpC e a um inibidor de AmpC, juntamente com os dois últimos, possibilitando assim a deteção de AmpC desreprimidas ou mesmo quando o microrganismo apresenta vários mecanismos de resistência associados. Imagens das geloses Mueller-Hinton com os resultados possíveis de serem obtidos no teste estão representadas nas figuras 20 e 21.

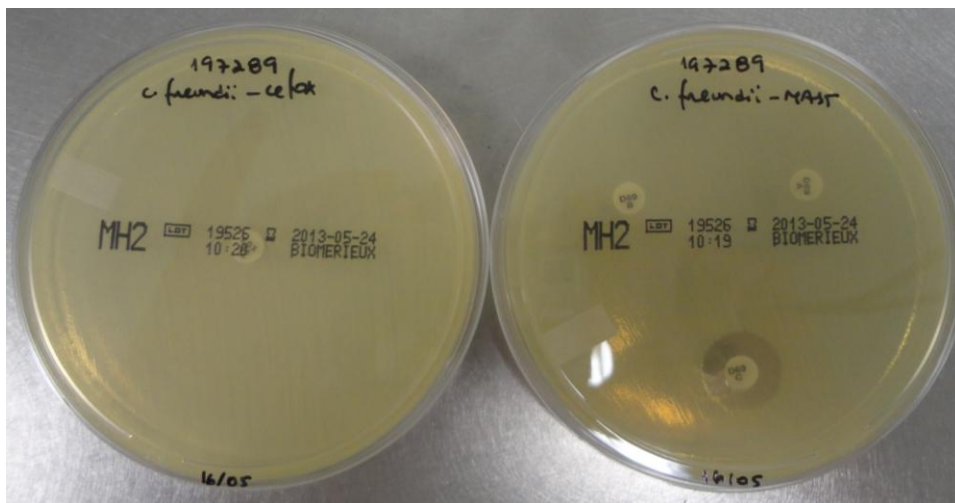


Figura 20: Aspeto geral do teste de pesquisa, com discos de cefoxitina (à esquerda) e teste de deteção (kit comercial da MAST, à direita – na imagem, discos B, A e C) de β -lactamases do tipo AmpC num microrganismo que apresenta a enzima. Resultado positivo.

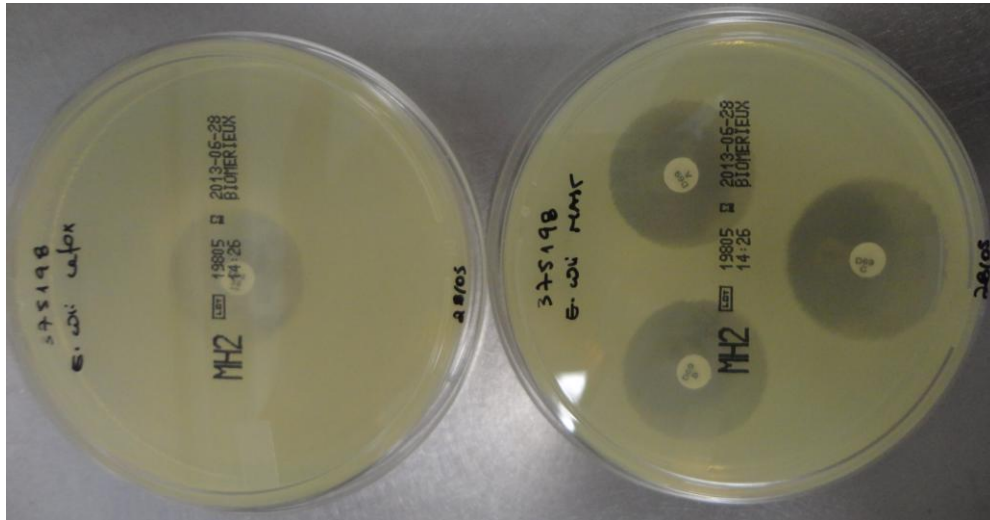


Figura 21: Aspeto geral do teste de pesquisa, com discos de cefoxitina (à esquerda) e teste de detecção (kit comercial da MAST, à direita) de β -lactamases do tipo AmpC num microrganismo que não apresenta a enzima. Resultado negativo.

A análise dos isolados bacterianos estudados segundo este método revelou que 79% (37/47) dos microrganismos testados apresentaram atividade de AmpC. Em 2% (1/47) dos casos estudados, o resultado obtido foi inconclusivo. Foram ainda reportados 19% (9/47) dos microrganismos como não portadores deste mecanismo de resistência antimicrobiana. De referir que três isolados incluídos neste último grupo de resultados tinham sido previamente reportados pelo Vitek como negativos para a produção de AmpC e foram usados para avaliar a sensibilidade e especificidade do teste. Se os isolados não tivessem sido incluídos no teste, a análise dos resultados daria conta de que 84% dos isolados apresenta atividade AmpC e 14% dos isolados não apresentam a enzima. Na figura 22 podem observar-se os resultados do teste. De referir que os resultados obtidos neste trabalho experimental foram validados, uma vez que através do teste foi possível confirmar a presença ou a ausência do mecanismo de resistência inerente à enzima nos microrganismos, conforme se tratou do controlo positivo ou negativo. Na tabela inserida no anexo 5, são apresentados os resultados globais das amostras que compreendem este estudo, permitindo relacionar cada isolado e correspondente perfil de suscetibilidade antimicrobiana com o mecanismo de resistência subjacente, de acordo com os valores obtidos nos métodos de pesquisa e detecção da enzima.

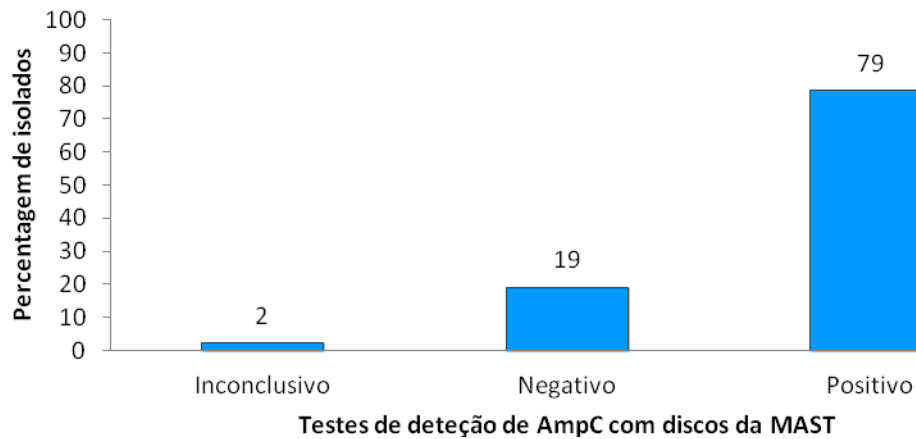


Figura 22: Detecção de produção da enzima β -lactamase do tipo AmpC com recurso a um método em disco desenvolvido pela casa comercial MAST. Resultados apresentados em percentagem.

Assim, comparando os resultados observados para os discos de cefoxitina e os resultados observados nos discos de confirmação, verificou-se que 39 isolados (37 amostras + 2 microrganismos controlo) obtiveram resultados positivos na pesquisa e deteção da enzima, resultados estes concordantes em ambos os métodos utilizados. De forma similar, 8 isolados (7 amostras + 1 microrganismo controlo), foram identificados como não portadores da enzima AmpC, quer no método usado para o *screen* como para o método confirmatório. Deste total, 3 isolados, previamente identificados pelo aparelho automático como negativos para a presença da enzima em estudo, foram incluídos com o intuito de avaliar parâmetros de sensibilidade e especificidade nos dois métodos (amostras 11 a 13). Os restantes quatro, estirpes multirresistentes, com perfis de suscetibilidade antimicrobiana diversos e mecanismos de resistência desconhecidos, com maior ou menor grau de suspeita de presença da enzima por parte do utilizador, foram introduzidos na amostragem de modo a validar o método desenvolvido (amostras 20, 23, 43 e 49). A distribuição das amostras estudadas, segundo o resultado obtido nos testes de pesquisa e deteção de AmpC, pode ser consultada na tabela 4.

Tabela 4: Distribuição dos isolados bacterianos, em número total, segundo o resultado obtido para a pesquisa e detecção de AmpC, pelos métodos estudados.

	Pesquisa de AmpC - cefoxitina	Deteção de AmpC – <i>kit</i> comercial da MAST
Positivo	42	39
Negativo	8	10
Inconclusivo	0	1
Total	50	50

Tabela 5: Resultados discrepantes entre o método de pesquisa, discos de cefoxitina 30µg, e o método de detecção, kit comercial da MAST, de β-lactamases do tipo AmpC. (mm): milímetros; (P): resultado positivo; (N): resultado negativo.

Amostra	Microrganismo	Pesquisa de AmpC - cefoxitina (mm)	Deteção de AmpC - kit comercial da MAST
8	<i>Escherichia coli</i>	P	N
36	<i>Escherichia coli</i>	P	N

Na tabela 5 figuram os resultados obtidos para os microrganismos nomeados como amostras 8 e 36, onde se constatam discrepâncias nos resultados para cada método em estudo. Ambas as amostras são identificadas como produtoras de β-lactamase do tipo AmpC no teste de pesquisa, em que a ação da cefoxitina demonstra halos de inibição de crescimento bacteriano de 17 e 13mm, respectivamente, verificando-se suscetibilidade diminuída à cefoxitina. Contrariamente, os resultados observados através do método de confirmação dão conta de que as amostras em questão não apresentam atividade AmpC. Uma vez que o primeiro teste é meramente preditivo e não é exclusivo para a pesquisa da enzima em estudo (76, 99), o operador aceitou os

resultados obtidos para o segundo teste como verdadeiros, classificando os dois microrganismos como não portadores da enzima AmpC, sendo o seu perfil multirresistente causado por outro mecanismo de resistência desconhecido. A confirmação desta ilação poderia ser feita recorrendo a técnicas moleculares, PCR multiplex, por exemplo, onde o gene *ampC* seria o objeto de pesquisa.

V. CONCLUSÃO

A crescente prevalência de bactérias resistentes aos antimicrobianos tem implicações graves para o tratamento e prevenção de doenças infecciosas. A versatilidade com que bactérias se adaptam a um novo ambiente e trocam ADN entre diferentes géneros destaca a necessidade de implementação de gestão antimicrobiana eficaz e programas de controlo de infeção.

Uma vez que a produção de enzimas por parte das bactérias é o mecanismo mais significativo de resistência aos antibióticos e as β -lactamases do tipo AmpC estão entre as mais disseminadas, registando-se a nível mundial, é de extrema importância conhecê-las e mais ainda, detetá-las, para que o correto diagnóstico seja feito, possibilitando um tratamento direcionado, de forma a evitar resistências generalizadas aos β -lactâmicos e assim evitar verdadeiros problemas de saúde pública.

Nesse sentido, e segundo os resultados obtidos no trabalho experimental, a utilização de discos de cefoxitina como método de pesquisa de β -lactamases do tipo AmpC revelou-se um método sensível. De forma semelhante, a utilização de discos de cefpodoxime, como método confirmatório da presença de β -lactamases do tipo AmpC, formulado pela casa comercial MAST, demonstrou ser eficaz. Por conseguinte, e tendo como propósito a aplicação de métodos fenotípicos para a deteção da enzima AmpC, a utilização dos dois métodos supra enunciados, aplicados em conjunto numa mesma amostra com perfil multirresistente, revelou ser uma mais-valia como estratégia eficiente de pesquisa, sendo vantajosa a sua implementação na rotina hospitalar.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Murray P, Rosenthal K, Pfauer M. Microbiología médica. Fifth ed. Madrid: Elsevier; 2005. 927 p.
2. Champoux J, Drew W, Neidhardt F, Plorde J. Sherris Medical Microbiology: An introduction to infectious diseases. Fourth ed. New York: McGraw-Hill companies; 2004. 997 p.
3. Kayser F, Bienz K, Eckert J, Zinkernagel R. Medical Microbiology. First ed. New York: Thieme; 2005. 698 p.
4. Wiley J, Sherwood L, Woolverton C. Prescott, Harley and Klein's Microbiology. Seventh ed. New York: McGraw-Hill companies; 2008. 1222 p.
5. Poole K. Resistance to β -lactam antibiotics. Cellular and Molecular Life Sciences. 2004;61(17):2200-23.
6. Bush K, MacIelag MJ. New β -lactam antibiotics and β -lactamase inhibitors. Expert Opinion on Therapeutic Patents. 2010;20(10):1277-93.
7. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010;54(3):969-76.
8. Ingram PR, Inglis TJJ, Vanzetti TR, Henderson BA, Harnett GB, Murray RJ. Comparison of methods for AmpC β -lactamase detection in *Enterobacteriaceae*. Journal of Medical Microbiology. 2011;60(6):715-21.
9. Gude MJ, Seral C, Sáenz Y, González-Domínguez M, Torres C, Castillo FJ. Evaluation of four phenotypic methods to detect plasmid-mediated AmpC β -lactamases in clinical isolates. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2012;31(8):2037-43.
10. Jacoby GA, Walsh KE, Walker VJ. Identification of extended-spectrum, AmpC, and carbapenem-hydrolyzing β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by disk tests. Journal of Clinical Microbiology. 2006;44(6):1971-6.
11. Seral C, José Gude M, Javier Castillo F. Emergence of plasmid mediated AmpC β -lactamasas: Origin, importance, detection and therapeutical options. Revista Española de Quimioterapia. 2012;25(2):89-99.
12. Ferreira W, Sousa J. Microbiologia. Lisboa: Lidel - edições técnicas; 1998. 350 p.
13. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens. Journal of Infectious Diseases. 2008;197(8):1079-81.
14. Talaro K. Foundations in Microbiology: Basic principles. Seventh ed. New York: McGraw-Hill companies; 2009. 613 p.
15. Kong KF, Schnepfer L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica. 2010;118(1):1-36.
16. Fernandes R, Amador P, Prudêncio C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. Reviews in Medical Microbiology. 2013;24(1):7-17.
17. European Surveillance of Antimicrobial Consumption - yearbook 2009 [17 de Janeiro de 2013]. Available from: http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/esac-net/publications/documents/esac_yearbook_2009.pdf.

18. Bush K. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Critical care (London, England)*. 2010;14(3):224.
19. Suárez C, Gudiol F. Beta-lactam antibiotics. *Antibióticos betalactámicos*. 2009;27(2):116-29.
20. Llarrull LI, Testero SA, Fisher JF, Mobashery S. The future of the β -lactams. *Current Opinion in Microbiology*. 2010;13(5):551-7.
21. Long AJ, Clifton IJ, Roach PL, Baldwin JE, Rutledge PJ, Schofield CJ. Structural studies on the reaction of isopenicillin N synthase with the truncated substrate analogues δ -(L- α -aminoadipoyl)-L-cysteinyl-glycine and δ -(L- α -aminoadipoyl)-L-cysteinyl-D-alanine. *Biochemistry*. 2005;44(17):6619-28.
22. Velasco J, Adrio JL, Moreno MA, Diez B, Soler G, Barredo JL. Environmentally safe production of 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid (7-ADCA) using recombinant strains of *Acetomonium chrysogenum*. *Nature Biotechnology*. 2000;18(8):857-61.
23. Stapley EO, Birnbaum J, Miller AK, Wallick H, Hendlin D, Woodruff HB. Cefoxitin and cephamycins: microbiological studies. *Reviews of infectious diseases*. 1979;1(1):73-89.
24. Elufisan TO, Oyedara OO, Oyelade B. Updates on microbial resistance to drugs. *African Journal of Microbiological Research*. 2012;6(23):4833-44.
25. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010;23(1):160-201.
26. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. β -Lactam antibiotic resistance: A current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*. 2005;8(5):525-33.
27. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995;8(4):557-84.
28. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. 2000;406(6797):775-81.
29. Harbottle H, Thakur S, Zhao S, White DG. Genetics of antimicrobial resistance. *Animal Biotechnology*. 2006;17(2):111-24.
30. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Reviews of infectious diseases*. 1988;10(4):677-8.
31. Kirby WM. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant *Staphylococci*. *Science*. 1944;99(2579):452-3.
32. Massova I, Mobashery S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998;42(1):1-17.
33. Medeiros AA. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*. 1997;24(1 SUPPL.):S19-S45.
34. Jacoby GA. β -lactamase nomenclature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50(4):1123-9.
35. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B: Biological sciences*. 1980;289(1036):321-31.

36. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995;39(6):1211-33.
37. Williams JD. β -Lactamases and β -lactamase inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1999;12(SUPPL. 1):S3-S7.
38. Heinze-Krauss I, Angehrn P, Charnas RL, Gubernator K, Gutknecht EM, Hubschwerlen C, et al. Structure-based design of β -lactamase inhibitors. 1. Synthesis and evaluation of bridged monobactams. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1998;41(21):3961-71.
39. Knott-Hunziker V, Petursson S, Jayatilake GS, Waley SG, Jaurin B, Grundström T. Active sites of β -lactamases. The chromosomal β -lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*. 1982;201(3):621-7.
40. Jacoby GA. AmpC β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009;22(1):161-82.
41. Feller G, Zekhnini Z, Lamotte-Brasseur J, Gerday C. Enzymes from cold-adapted microorganisms. The class C beta-lactamase from the antarctic psychrophile *Psychrobacter immobilis* A5. *European journal of biochemistry / Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology*. 1997;244(1):186-91.
42. Knox JR, Moews PC, Frere JM. Molecular evolution of bacterial β -lactam resistance. *Chemistry and Biology*. 1996;3(11):937-47.
43. Lobkovsky E, Moews PC, Liu H, Zhao H, Frere JM, Knox JR. Evolution of an enzyme activity: Crystallographic structure at 2-Å resolution of cephalosporinase from the ampC gene of *Enterobacter cloacae* P99 and comparison with a class A penicillinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(23):11257-61.
44. Barnaud G, Labia R, Raskine L, Sanson-Le Pors MJ, Philippon A, Arlet G. Extension of resistance to cefepime and ceftazidime associated to a six amino acid deletion in the H-10 helix of the cephalosporinase of an *Enterobacter cloacae* clinical isolate. *Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Letters*. 2001;195(2):185-90.
45. Vakulenko SB, Golemi D, Geryk B, Suvorov M, Knox JR, Mobashery S, et al. Mutational replacement of Leu-293 in the class C *Enterobacter cloacae* P99 β -lactamase confers increased MIC of cefepime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(6):1966-70.
46. Jones RN. Important and Emerging β -Lactamase-mediated Resistances in Hospital-based Pathogens: The Amp C Enzymes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1998;31(3):461-6.
47. Page MI. *The Chemistry of [beta]-lactams*. London; New York: Blackie Academic & Professional; 1992.
48. Minasov G, Wang X, Shoichet BK. An ultrahigh resolution structure of TEM-1 beta-lactamase suggests a role for Glu166 as the general base in acylation. *Journal of the American Chemical Society*. 2002;124(19):5333-40.
49. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(1):1-11.

50. Bush K, Macalintal C, Rasmussen BA, Lee VJ, Yang Y. Kinetic interactions of tazobactam with β -lactamases from all major structural classes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993;37(4):851-8.
51. Kazmierczak A, Cordin X, Duez JM, Siebor E, Pechinot A, Sirot J. Differences between clavulanic acid and sulbactam in induction and inhibition of cephalosporinases in enterobacteria. *Journal of International Medical Research*. 1990;18(SUPPL. 4):67D-77D.
52. Sykes RB, Matthew M. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1976;2(2):115-57.
53. Bonnet R, Chanal C, Ageron E, Sirot D, De Champs C, Grimont P, et al. Inducible AmpC β -lactamase of a new member *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(10):3316-9.
54. Dunne Jr WM, Hardin DJ. Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk approximation assay format to screen for AmpC induction in patient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., and *Serratia* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(12):5945-9.
55. Bennett PM, Chopra I. Molecular basis of β -lactamase induction in bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993;37(2):153-8.
56. Jacobs C, Huang LJ, Bartowsky E, Normark S, Park JT. Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for β -lactamase induction. *European Molecular Biology Organization Journal*. 1994;13(19):4684-94.
57. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1990;34(11):2200-9.
58. Luzzaro F, Brigante G, D'Andrea MM, Pini B, Giani T, Mantengoli E, et al. Spread of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates producing an AmpC-type β -lactamase: epidemiology and clinical management. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009;33(4):328-33.
59. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40(6):2153-62.
60. Pai H, Kang CI, Byeon JH, Lee KD, Park WB, Kim HB, et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(10):3720-8.
61. Pitout JDD, Gregson DB, Church DL, Laupland KB. Population-based laboratory surveillance for AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli*, Calgary. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(3):443-8.
62. D'Andrea MM, Nucleo E, Luzzaro F, Giani T, Migliavacca R, Vailati F, et al. CMY-16, a novel acquired AmpC-type β -lactamase of the CMY/LAT lineage in multifocal monophyletic isolates of *Proteus mirabilis* from northern Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50(2):618-24.

63. Baudry PJ, Mataseje L, Zhanel GG, Hoban DJ, Mulvey MR. Characterization of plasmids encoding CMY-2 AmpC β -lactamases from *Escherichia coli* in Canadian intensive care units. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2009;65(4):379-83.
64. Bou G, Oliver A, Ojeda M, Monzon C, Martinez-Beltran J. Molecular characterization of FOX-4, a new AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase from an *Escherichia coli* strain isolated in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(9):2549-53.
65. Woodford N, Reddy S, Fagan EJ, Hill RLR, Hopkins KL, Kaufmann ME, et al. Wide geographic spread of diverse acquired AmpC β -lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in the UK and Ireland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;59(1):102-5.
66. Roche C, Boo TW, Walsh F, Crowley B. Detection and molecular characterisation of plasmidic AmpC beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary-care hospital in Dublin, Ireland. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008;14(6):616-8.
67. Manageiro V, Jones-Dias D, Domingues G, Ferreira E, Louro D, Caniça M. AmpC beta-lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: ECCMID 20th congress; 2010. Available from: http://registration.akm.ch/2010eccmid_einsicht.php?XNABSTRACT_ID=102811&XN_SPRACHE_ID=2&XNKONGRESS_ID=114&XNMASKEN_ID=900.
68. Willems E, Verhaegen J, Magerman K, Nys S, Cartuyvels R. Towards a phenotypic screening strategy for emerging β -lactamases in Gram-negative bacilli. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2013;41(2):99-109.
69. Slama TG. Gram-negative antibiotic resistance: There is a price to pay. *Critical Care*. 2008;12(SUPPL. 4).
70. Pitout JDD. Infections with extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: Changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs*. 2010;70(3):313-33.
71. Siegel J, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings Atlanta: Centers for disease control and prevention; 2006 [10 de Junho de 2013]. Available from: <http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/MDRO/MDROGuideline2006.pdf>.
72. Conejo MC, Mata C, Navarro F, Pascual A. Detection and reporting β -lactam resistance phenotypes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a multicenter proficiency study in Spain. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2008;62(3):317-25.
73. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC β -lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(7):3110-3.
74. Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(5):1791-6.

75. Mirelis B, Rivera A, Miró E, Mesa RJ, Navarro F, Coll P. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2006;24(6):370-2.
76. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(8):4163-7.
77. Yagi T, Wachino JI, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y, et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(6):2551-8.
78. Jeong SH, Song W, Park M-J, Kim J-S, Kim H-S, Bae IK, et al. Boronic acid disk tests for identification of extended-spectrum β -lactamase production in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing chromosomal AmpC β -lactamases. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008;31(5):467-71.
79. Instituto Nacional de Estatística - Censos 2011 [9 de Maio de 2013]. Available from: http://censos.ine.pt/xportal/xmain?xpid=CENSOS&xpgid=censos_ficheirosintese.
80. Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE [7 de Abril de 2013]. Available from: <http://www.hip.min-saude.pt/Paginas/default.aspx>.
81. Shahid M, Malik A, Sheeba. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring R-plasmids and AmpC β -lactamases isolated from hospitalised burn patients in a tertiary care hospital of North India. *Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Letters*. 2003;228(2):181-6.
82. Shahid M, Malik A, Akram M, Agrawal LM, Khan AU, Agrawal M. Prevalent phenotypes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at an Indian tertiary care hospital: plasmid-mediated cefoxitin resistance. *International Journal of Infectious Diseases*. 2008;12(3):256-64.
83. Ghatole M, Manthalkar P, Kandle S, Yemul V, Jahagirdar V. Correlation of extended spectrum beta lactamases production with cephalosporin resistance in gram negative bacilli. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 2004;47(1):82-4.
84. Rao P, Shivananda P. Bacteraemia Due To Non-Fermenting Gram Negative Bacilli In Immunocompromised Patients. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 1993;11(2):95-9.
85. Veenu A, Sikka R. Isolation and susceptibility pattern of nonfermenting gram-negative bacilli from clinical samples. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 1999;17(1):14-7.
86. Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2004;50(1):59-69.
87. Sader HS, Biedenbach DJ, Jones RN. Global patterns of susceptibility for 21 commonly utilized antimicrobial agents tested against 48,440 *Enterobacteriaceae* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2003;47(1):361-4.
88. European centre for disease prevention and control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. 2011 [24 de Junho de 2013]. Available from:

<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2011.pdf>.

89. European centre for disease prevention and control. Annual epidemiological report reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. 2012 [24 de Junho de 2013]. Available from: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Annual-Epidemiological-Report-2012.pdf>.
90. Lee K, Hong SG, Park YJ, Lee HS, Song W, Jeong J, et al. Evaluation of phenotypic screening methods for detecting plasmid-mediated AmpC β -lactamases-producing isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2005;53(4):319-23.
91. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. BSAC methods for antimicrobial susceptibility testing 2010 [29 de Maio de 2013]. Available from: <http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/Version-10-2011-final.pdf>.
92. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters 2013 [29 de Maio de 2013]. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf.
93. Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Böttger EC, Hombach M. Practical approach for reliable detection of AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. Journal of Clinical Microbiology. 2011;49(8):2798-803.
94. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. Infection. 1989;17(5):316-21.
95. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clinical Infectious Diseases. 2001;32(10 SUPPL. 2):S94-S103.
96. Pitout JD, Le PG, Moore KL, Church DL, Gregson DB. Detection of AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.* and *Proteus mirabilis* in a regional clinical microbiology laboratory. Clinical Microbiology Infection. 2010;16(2):165-70.
97. Thean YT, Ng LSY, He J, Tse HK, Li YH. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009;53(1):146-9.
98. Giske C, Haldorsen B, Lundblad E, Aasnæs B, Simonsen G, Sundsfjord A. Phenotypic detection of AmpC in *E. coli*: comparison of cloxacillin, boronic acid and EDTA disk synergy assays. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2007.
99. Tenover FC, Emery SL, Spiegel CA, Bradford PA, Eells S, Endimiani A, et al. Identification of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, and *Proteus species* can potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results. Journal of Clinical Microbiology. 2009;47(2):294-9.

VII. ANEXOS

Anexo 1

R2759

Abstract (publication only)

Evaluation of phenotypic methods to detect AmpC-producing Enterobacteriaceae in Aveiro, Portugal

C. Brandão*, S. Soares, S. Ferreira, E. Ramalheira (Aveiro, PT)

Background: AmpC beta-lactamases are clinically significant, because they confer resistance to cephalothin, cefazolin, cefoxitin, most penicilins and beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. The aim of the present study was to compare different phenotypic methodologies to screen for AmpC beta-lactamases producers among Enterobacteriaceae isolates, recovered from patients of a community public hospital, Centro Hospitalar Baixo Vouga (CHBV), Aveiro, Portugal. **Methods:** Fifty AmpC-producing isolates were collected, from inpatients and patients attending to the emergency room (ER), at CHBV, Portugal. The strains were isolated from different biological products and were identified by the automatic VITEK 2 system and Advanced Expert System (VITEK 2 AES) (BioMérieux, Marcy L'Étoile, France). The antimicrobial susceptibility profile to >20 antimicrobial agents was evaluated by CLSI broth microdilution methods and interpreted by CLSI M100-S20 (2010). AmpC producers were confirmed using disc tests: cefoxitin 30 µg (Oxoid, UK) and AmpC Detection Set (MAST), according to manufacturer's instructions. Three random *E. coli* isolates, reported by the Vitek2 as negative for the presence of an AmpC, were used to evaluate the specificity and sensitivity of the others methods used. *E. coli* ATCC 25922 and a *Serratia marcescens* were used as a negative and positive control, respectively. **Results:** A similar percentage of isolates was collected from inpatients (52%) and the patients attending to the ER (48%) and belong mainly to *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. species. Most of the isolates were collected from urine, blood cultures and pus. The results obtained with cefoxitin disc were compared with those obtained with AmpC Detection Set (MAST). A discrepancy of ten percent was observed between two methods, with a higher performance for the AmpC Detection Set (MAST). **Conclusions:** The number of AmpC producers collected from the ER is considerable high and requires surveillance since it indicates that these isolates are spreading in the community settings. AmpC producers exhibit a multidrug resistance phenotype; therefore these findings highlight the importance of routine detection of AmpC producers. The results in this study favour the use of the AmpC Detection Set (MAST) for this purpose, without greatly increasing the cost.

Anexo 2**Tabela A:** Composição dos poços da carta de identificação de microrganismos de Gram-negativo para Vitek 2. N/A, Não aplicável.

Poço	Substrato	Quantidade (mg)
2	Ala-Phe-Pro-Arilamidase	0.0384
3	Adonitol	0.1875
4	L-Pirrolidonil-Arilamidase	0.018
5	L-Arabitól	0.3
7	D-Celobiose	0.3
9	Beta-galactosidase	0.036
10	Produção de H ₂ S	0.0024
11	Beta-N-Acetil-Glucosaminidase	0.0408
12	Glutamil arilamidase pNA	0.0324
13	D-Glucose	0.3
14	Gama-Glutamil-Transferase	0.0228
15	Fermentação glucose	0.45
17	Beta-Glucosidase	0.036
18	D-Maltose	0.3
19	D-Manitol	0.1875
20	D-Manose	0.3
21	Beta-Xilosidase	0.0324
22	Beta-Alanina arilamidase pNA	0.0174
23	L-Prolina Arilamidase	0.0234

26	Lipase	0.0192
27	Palatinose	0.3
29	Tirosina Arilamidase	0.0276
31	Urease	0.15
32	D-Sorbitol	0.1875
33	Sacarose/ Sucrose	0.3
34	D-Tagatose	0.3
35	D-Trealose	0.3
36	Citrato de Sódio	0.054
37	Malonato	0.15
39	5-Ceto-D-Gluconato	0.3
40	Alcalinização L-Lactato	0.15
41	Alfa-Glucosidase	0.036
42	Alcalinização do succinato	0.15
43	Beta-N-Acetil-Galactosaminidase	0.0306
44	Alfa-Galactosidase	0.036
45	Fosfatase	0.0504
46	Glicina Arilamilase	0.012
47	Ornitina Descarboxilase	0.3
48	Lisina Descarboxilase	0.15
52	Descarboxilase	N/A
53	Assimilação de L-Histidina	0.087

56	Cumarato	0.126
57	Beta-Glucoronidase	0.0378
58	Resistência O/129	0.0105
59	Glu-Gly-Arg-Arilamidase	0.0576
61	Assimilação de L-Malato	0.042
62	Reagente de Ellman's	0.03
64	Assimilação de L-Lactato	0.186

Anexo 3

Tabela B: Carta AST-N222 para determinação da suscetibilidade de bacilos Gram-negativos aeróbios com significado clínico a agentes antimicrobianos. CMI, Concentração Mínima Inibitória. Os valores numéricos são expressos em µg/mL.

Composição da carta			
Antimicrobiano	Concentração	Intervalo de CMI	
		≤	≥
Amicacina	8, 16, 64	2	64
Aztreonam	2, 8, 32	1	64
Cefepime	2, 8, 16, 32	1	64
Ceftazidima	1, 2, 8, 32	1	64
Ciprofloxacina	0.5, 2, 4	0.25	4
Colistina	4, 16, 32	0.5	16
Gentamicina	4, 16, 32	1	16
Imipenem	1, 2, 6, 12	0.25	16
Meropenem	0.5, 2, 6, 12	0.25	16
Minociclina	2, 4, 8	1	16
Pefloxacina	0.5, 2, 8	0.25	16
Piperacilina	4, 16, 32, 64	4	128
Piperacilina/Tazobactam	2/4, 8/4, 24/4, 32/4, 32/8, 48/8	4/4	128/4
Rifampicina	2, 4, 16	2	32
Ticarcilina	16, 32, 64	8	128

Ticarcilina/Ácido Clavulânico	8/2, 32/2, 64/2	8/2	128/2
Tobramicina	8, 16, 64	1	16
Trimetoprim/Sulfametoxazol	1/19, 4/76, 16/304	20 (1/19)	320 (16/304)

Anexo 4

Tabela C: Carta AST-N192 para determinação da suscetibilidade de bacilos Gram-negativos aeróbios com significado clínico a agentes antimicrobianos. CMI, Concentração Mínima Inibitória; ESBL, β -lactamase de espectro estendido; NEG, Negativo; POS, Positivo. Os valores numéricos são expressos em $\mu\text{g/mL}$. Para ESBL: FEP representa Cefepima; CTX, Cefotaxima; CAZ, Ceftazidima; CA, Ácido Clavulânico. Para estirpes ESBL positivas, o resultado do teste deve ser interpretado como de resistência a todas as penicilinas, cefalosporinas e ao aztreonam. Um resultado negativo não exclui a presença de uma ESBL mascarada por uma beta-lactamase do tipo AmpC.

Composição da carta			
Antimicrobiano	Concentração	Intervalo de CMI	
		\leq	\geq
Amicacina	8, 16, 64	2	64
Amoxicilina/Ácido Clavulânico	4/2, 16/8, 32/16	2/1	32/16
Ampicilina	4, 8, 32	2	32
Cefalotina	2, 8, 32	2	64
Cefotaxima	1, 4, 16, 32	1	64
Ceftazidima	1, 2, 8, 32	1	64
Cefuroxima	2, 8, 32	1	64
Ciprofloxacina	0.5, 2, 4	0.25	4
Ertapenem	0.5, 1, 6	0.5	8
ESBL	FEP 1, CTX 0.5, CAZ 0.5, FEP/CA 1/10, CTX/CA 0.5/4, CAZ/CA 0.5/4	NEG	POS
Gentamicina	4, 16, 32	1	16

Levofloxacina	0.25, 0.5, 2, 8	0.12	8
Meropenem	0.5, 2, 6, 12	0.25	16
Nitrofurantoína	16, 32, 64	16	512
Piperacilina/Tazobactam	2/4, 8/4, 24/4, 32/4, 32/8, 48/8	4/4	128/4
Tobramicina	8, 16, 64	1	16
Trimetoprim/Sulfametoxazol	1/19, 4/76, 16/304	20 (1/19)	320 (16/304)

Anexo 5

Tabela D: Resultados obtidos nos testes de pesquisa e detecção de AmpC, com discos de cefoxitina e cefpodoxime, respetivamente. Indicação da identificação da espécie relativa a cada amostra estudada, bem como do seu perfil de resistência antimicrobiana. CP: Controlo positivo; CN: controlo negativo; I: inconclusivo; N: negativo para a presença de AmpC; NA: não aplicável; P: positivo para a presença de AmpC; AUG: amoxicilina/ácido clavulânico; AMP: ampicilina; CFL: cefalotina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CXM-A: cefuroxima-axetil; CXM-S: cefuroxima-sódica; CIP: ciprofloxacina; SXT: cotrimoxazol; ETP: ertapenem; GEN: gentamicina; LVX: levofloxacina; NIT: nitrofurantoína; PEF: pefloxacina; PIP: piperacilina; P/T: piperacilina/tazobactam; TIC: ticarcilina; TOB: tobramicina e RIF: rifampicina.

Amostra	Microrganismo	Perfil de resistência antimicrobiana	Pesquisa e detecção de AmpC - halos de inibição de crescimento, em milímetros								
			Cefoxitina	Interpretação	Kit comercial da MAST						Interpretação
					Disco A	Disco B	Disco C	C-A	B-A	C-B	
1	<i>Citrobacter freundii</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, CIP, SXT, GEN, LVX, NIT, TOB	6	P	6	6	15	9	0	9	P
2	<i>Escherichia coli</i>	AUG, AMP, CFL, CXM-A	16	P	14	15	28	14	1	13	P
3	<i>Escherichia coli</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, P/T	9	P	6	6	26	20	0	20	P
4	<i>Escherichia coli</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, SXT	6	P	6	6	24	18	0	18	P
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AUG, AMP, CFL, CAZ, CXM-A, CXM-S, CIP, SXT, LVX, NIT, P/T	6	P	6	6	18	12	0	12	P

6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, SXT, GEN, NIT, TOB	6	P	6	6	18	12	0	12	P
7	<i>Escherichia coli</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S	8	P	6	6	23	17	0	17	P
8	<i>Escherichia coli</i>	AUG, AMP, CFL, CXM-A, CXM-S	17	P	21	22	23	2	1	1	N
9	<i>Escherichia coli</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S	11	P	6	6	23	17	0	17	P
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AUG, AMP, CFL, CXM-A, CXM-S, CIP, LVX, NIT, P/T	6	P	6	6	16	10	0	10	P
11	<i>Escherichia coli</i>	PEF	26	N	29	30	30	1	1	0	N
12	<i>Escherichia coli</i>	NA	26	N	30	31	32	2	1	1	N
13	<i>Escherichia coli</i>	SXT, PIP, TIC	24	N	30	30	32	2	0	2	N
14	<i>Enterobacter aerogenes</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, P/T	6	P	6	6	19	13	0	13	P
15	<i>Citrobacter freundii</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S	6	P	6	6	15	9	0	9	P
16	<i>Enterobacter cloacae</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, SXT, GEN, P/T, TOB	6	P	6	6	15	9	0	9	P
17	<i>Citrobacter freundii</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, P/T	6	P	6	6	14	8	0	8	P

18	<i>Enterobacter aerogenes</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, NIT, P/T	6	P	6	6	16	10	0	10	P
19	<i>Morganella morganii</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, SXT, NIT	17	P	6	6	26	20	0	20	P
20	<i>Escherichia coli</i>	AUG, AMP, CFL, CXM-A, CXM-S, CIP, SXT, LVX, TOB	25	N	12	24	25	13	12	1	N
21	<i>Enterobacter cloacae</i>	AUG, AMP, CFL, CXM-A	6	P	6	6	22	16	0	16	P
22	<i>Enterobacter aerogenes</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, GEN, P/T, TOB	6	P	6	6	23	17	0	17	P
23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AUG, AMP, CIP, SXT, GEN, LVX, TOB	24	N	27	28	28	1	1	0	N
24	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AUG, AMP, CFL, CXM-A, CXM-S, CIP, SXT, LVX, NIT, P/T	6	P	6	6	13	7	0	7	P
25	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AUG, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, CIP, SXT, LVX, NIT, P/T	6	P	6	6	13	7	0	7	P
26	<i>Enterobacter cloacae</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, GEN, TOB	9	P	6	6	22	16	0	16	P

27	<i>Enterobacter cloacae</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM- A, CXM-S	6	P	6	6	22	16	0	16	P
28	<i>Escherichia coli</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM- A, CXM-S	12	P	6	6	24	18	0	18	P
29	<i>Escherichia coli</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM- A, CXM-S	6	P	6	6	23	17	0	17	P
30	<i>Escherichia coli</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM- A, CXM-S, CIP, SXT, LVX	6	P	6	6	19	13	0	13	P
31	<i>Escherichia coli</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM- A, CXM-S	13	P	6	7	23	17	1	16	P
32	<i>Morganella morganii</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM- A, CXM-S, CIP, SXT, GEN, LVX, NIT, TOB	16	P	6	6	21	15	0	15	P
33	<i>Morganella morganii</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM- A, CXM-S, CIP, SXT, GEN, LVX, NIT, TOB	6	P	6	6	19	13	0	13	P
34	<i>Citrobacter freundii</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM- A, CXM-S, CIP, SXT, ETP, GEN, LVX, P/T, TOB	6	P	6	6	6	0	0	0	I

35	<i>Citrobacter freundii</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, CIP, SXT, LVX	6	P	6	6	12	6	0	6	P
36	<i>Escherichia coli</i>	AUG, AMP, CFL, CXM-A, CIP, SXT, LVX, TOB	13	P	18	18	21	3	0	3	N
37	<i>Morganella morganii</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, CIP, SXT, GEN, LVX, NIT, TOB	10	P	6	6	20	14	0	14	P
38	<i>Escherichia coli</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, CIP, LVX	13	P	10	10	24	14	0	14	P
39	<i>Escherichia coli</i> CN		23	N	27	27	29	2	0	2	N
40	<i>Escherichia coli</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, CIP, SXT, LVX	11	P	6	6	19	13	0	13	P
41	<i>Morganella morganii</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, NIT	15	P	6	6	25	19	0	19	P
42	<i>Morganella morganii</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM-A, CXM-S, SXT, NIT	15	P	6	6	20	14	0	14	P
43	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CFL, CXM-A, CXM-S, CIP, LVX	19	N	25	25	27	2	0	2	N

44	<i>Citrobacter freundii</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM- A, CXM-S, CIP, SXT, GEN, LVX, NIT, TOB	6	P	6	6	15	9	0	9	P
45	<i>Serratia marcescens</i> CP		16	P	12	12	24	12	0	12	P
46	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM- A, CXM-S, CIP, SXT, GEN, LVX, P/T, TOB	6	P	6	6	16	10	0	10	P
47	<i>Morganella morganii</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM- A, CXM-S, NIT	18	P	6	6	25	19	0	19	P
48	<i>Escherichia coli</i>	AUG, AMP, CFL, CTX, CAZ, CXM- A, CXM-S	6	P	6	6	22	16	0	16	P
49	<i>Escherichia coli</i>	AMP, CFL, CIP, SXT, LVX	24	N	26	26	27	1	0	1	N
50	<i>Serratia marcescens</i> CP		18	P	16	16	26	10	0	10	P