



Universidade de Aveiro
2014

Departamento de Química

Sandra Vicência
Martins Magalhães

Epidemiologia de isolados multirresistentes
na comunidade

**Sandra Vicência
Martins Magalhães**

Epidemiologia de isolados multirresistentes na comunidade

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 convidado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e diretor do serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, EPE – Hospital Infante D. Pedro, Aveiro, e da Doutora Sónia Cristina das Neves Ferreira, Diretora do Departamento de Saúde, Ciência e Educação do Instituto de Educação e Cidadania de Mamarrosa.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

“A persistência é o menor caminho para o êxito”.

Charles Chaplin

o júri

presidente

Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira

Professora auxiliar convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Tânia Isabel Sousa Caetano

Investigadora em Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Elmano José da Cruz Ramalheira

Professor auxiliar convidado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e Diretor do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospital do Baixo Vouga, EPE – Hospital Infante D. Pedro, Aveiro

agradecimentos

Este trabalho representa o finalizar de mais uma etapa do meu percurso académico. Dois anos em que tive a oportunidade de me cruzar com pessoas fantásticas, profissionais dedicados, que contribuíram exemplarmente para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Elmano Ramalheira, o meu muito obrigada pela oportunidade que me deu de trabalhar no seu serviço, pela forma simpática com que me recebeu, pela orientação e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo deste ano, que fizeram de mim uma pessoa melhor.

À Doutora Sónia Ferreira, o meu muito obrigada pelo incansável apoio diário no laboratório, pelos conhecimentos que me transmitiu que me permitem agora ser uma pessoa melhor, pessoal e profissionalmente. Obrigada pela amizade construída, pela motivação dada todos os dias, mesmo nos mais cinzentos, e pelas dicas e críticas que me ajudaram ao longo deste ano e que levo comigo para que me continuem a ajudar, sempre!

Às colegas do serviço de Patologia Clínica do HIP, especialmente à Raquel e à Luísa, e à Inês, parceira de trabalho, obrigada pela forma tão carinhosa com que me receberam no vosso cantinho e pelos sorrisos que espalham diariamente, que tornam o trabalho muito mais divertido!

Ao Filipe, por ser o meu pilar, nesta e em todas as etapas que tenho alcançado ao longo da minha formação académica! Obrigada por me amparares nos maus momentos e por te alegrares comigo nas conquistas! Sem ti nada disto seria possível! Obrigada, por tudo!

Aos meus pais, porque são eles o motivo da minha vida! Porque eles são o meu sustento. Obrigada por acreditarem em mim, por me darem a oportunidade de realizar todos os meus sonhos! Obrigada por lutarem para que eu seja todos os dias uma pessoa melhor! Este trabalho é para vocês! Obrigada!

Aos meus avós, obrigada pelo orgulho que sentem na vossa menina! Obrigada por me fazerem sentir especial todas as vezes que chego a vossa casa ao fim de semana! Obrigada pelo incansável apoio e por me fazerem acreditar que o que faço é importante, embora não percebam muito bem o que é! Obrigada por serem vocês e estarem sempre aqui, comigo, para mim!

A toda a restante família e amigos, obrigada por partilharem comigo esta caminhada!

palavras-chave

Epidemiologia, Infecções do trato urinário, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacteriaceae*, β -lactamases de espectro estendido (ESBL), antibióticos β -lactâmicos, resistência

resumo

A utilização massiva de antibióticos β -lactâmicos para o tratamento de infecções, nomeadamente infecções do trato urinário, levou ao desenvolvimento de mecanismos de resistência nos microorganismos, principalmente nas bactérias da família *Enterobacteriaceae*. De entre os mecanismos de resistência, a produção de β -lactamases é o mais comum entre estes microorganismos. Nos últimos anos, a produção e disseminação de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), principalmente na Europa, tem sido grande motivo de preocupação para os profissionais de saúde. Assim, é de crucial importância o correto diagnóstico *in vitro* destes isolados e dos mecanismos de resistência subjacentes, assim como a realização de estudos de vigilância epidemiológica que permitam monitorizar o comportamento destas estirpes multirresistentes e avaliar a sua distribuição na comunidade. Este estudo teve assim como principais objetivos apurar quais os microorganismos responsáveis por infecções do trato urinário na comunidade servida pelo Hospital Infante D. Pedro e inferir na epidemiologia de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL causadoras deste tipo de infecções.

Durante o ano de 2013 estudaram-se 540 amostras das quais 88% foram bactérias Gram-negativas, principalmente da família *Enterobacteriaceae*. *E. coli* foi o microorganismo mais comum (45,6% do total), seguido de *K. pneumoniae* (18,5% do total). Do total de *E. coli* isoladas, 13,4% revelaram-se positivas para a presença de ESBLs, assim como 39% do total de *K. pneumoniae*. Os carbapenemos, cefepime, aztreonam, colistina, minociclina, piperacilina, rifampicina, ticarcilina, ticarcilina/ácido clavulânico e tigeciclina revelaram-se os fármacos com menores taxas de resistência nestes isolados.

Este estudo permite tirar ilações sobre o panorama de disseminação destes isolados entre a comunidade servida por este hospital, podendo ser implementadas medidas de controlo de infeção e antibioterapia adequada a esta região geográfica para que, nos próximos anos, estas taxas de resistência tendam a diminuir.

keywords

Epidemiology, Urinary Tract Infections, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacteriaceae*, Extended-spectrum β -lactamases (ESBL), β -lactam antibiotic, resistance

abstract

The massive use of β -lactam antibiotics for the treatment of infections, including urinary tract infections, led to the development of resistance mechanisms in microorganisms, mainly bacteria of *Enterobacteriaceae* family. Among these mechanisms, β -lactamase production is the most common among *Enterobacteriaceae*. In recent years, the production and dissemination of extended spectrum β -lactamases (ESBL), mainly in Europe, has been a major concern for health professionals. Thus, the correct *in vitro* diagnosis of these isolates and the underlying mechanisms of resistance, as well as conducting studies of epidemiological surveillance in order to monitoring these multiresistant strains and determine their distribution in the community is crucial. The main aims of this study were to determine which are the microorganisms responsible for urinary tract infections in the community served by the Hospital Infante D. Pedro and to infer in the epidemiology of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* causing this type of infections. During 2013, 540 isolates were studied, of which 88 % were Gram-negative bacteria, mostly *Enterobacteriaceae*. *E. coli* was the most common microorganism (45.6% of total), followed by *K. pneumoniae* (18.5%). Of the total *E. coli* strains, 13.4% were positive for the presence of ESBLs, as well as 39 % of *K. pneumoniae*. Carbapenems, cefepime, aztreonam, colistin, minocycline, piperacillin, rifampicin, ticarcillin, ticarcillin/clavulanic acid and tigecycline were the drugs with lower rates of resistance in these isolates.

This study allows us to draw conclusions about the panorama of dissemination of these isolates in community served by this hospital. Consequently, infection control measures and appropriate antibiotic therapy to this geographic region can be implemented in order to decrease the resistance rates of these isolates in the next years.

ÍNDICE

Lista de publicações originais	i
Abreviaturas	ii
Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	iv
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. Infecções do trato urinário	7
2. <i>Enterobacteriaceae</i>	11
3. Antibióticos	13
3.1. Antibióticos β -lactâmicos: definição e mecanismo de ação.....	14
3.2. Mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos	16
3.3. β -lactamases	17
3.3.1. Caracterização e classificação das β -lactamases.....	18
3.3.2. β -lactamases de espectro estendido (ESBLs)	21
3.3.2.1. ESBL do tipo TEM	23
3.3.2.2. ESBL do tipo SHV	24
3.3.2.3. ESBL do tipo CTX-M	24
3.3.2.4. ESBL do tipo OXA	25
3.3.2.5. Outros tipos de ESBLs	25
4. Detecção laboratorial de estirpes produtoras de ESBL	26
4.1. Métodos fenotípicos.....	26
5. Epidemiologia de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBL	28
III. OBJETIVOS	31
IV. MATERIAL E MÉTODOS	35
1. Caracterização do Hospital Infante D. Pedro	37
2. Amostra	37
2.1. Urocultura e identificação bacteriana.....	38
2.2. Testes de suscetibilidade aos antibióticos (TSA)	39
2.3. Teste VITEK [®] 2 para deteção de ESBL	40
2.4. Método quantitativo E-test	41
3. Tratamento estatístico	41
V. RESULTADOS	43
1. Caracterização da amostra	45
2. Caracterização dos isolados microbianos	46

3. Perfil de resistência aos antibióticos	48
VI. DISCUSSÃO	55
VII. CONCLUSÃO	69
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
IX. ANEXOS	87

Lista de publicações originais

Esta dissertação contém resultados das seguintes publicações:

Magalhães S., Brandão C., Soares S., Ramalheira E., Ferreira S., Surveillance of ESBL-producing isolates in urine in elderly during a period of 3 years (2011-2013) in Aveiro, Portugal. Publicação online no *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014.

Magalhães S., Brandão C., Soares S., Diaz, R., Ramalheira E., Ferreira S., Prevalence of *Staphylococcus aureus* in Aveiro, Portugal, between 2001 and 2012. Publicação online no *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014.

Magalhães S., Soares, S., Brandão C., Ramalheira E., Ferreira S., Surveillance of *Acinetobacter baumannii* isolates resistant to carbapenems during a 10-year period (2003-2012) in Aveiro, Portugal. Publicação online no *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014.

ABREVIATURAS

AES	<i>Advanced Expert System</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>bla</i>	β -lactamase
CHBV	Centro Hospitalar do Baixo Vouga
CFU	Unidade formadora de colónias
CLED	<i>Cystine Lactose Eletrolyte Deficient</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CT	Cefotaxima
CTL	Cefotaxima + Ácido clavulânico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
ESBL	β -lactamase de espectro estendido
ESCMID	<i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
GNI	<i>Gram-negative identification</i>
HIP	Hospital Infante D. Pedro
IC	Infeção adquirida na comunidade
IN	Infeção nosocomial
ITU	Infeção do trato urinário
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MBL	Metallo- β -lactamase
NCCLS	<i>National Committee of Clinical Laboratory Standards</i>
OMP	<i>Outer Membrane Protein</i>
PBP	<i>Penicillin Binding Protein</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
qPCR	PCR em tempo real
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SSCP	<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i>
TSA	Teste de suscetibilidade a antibióticos
TZ	Ceftazidima
TZL	Ceftazidima + Ácido Clavulânico

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição dos organismos responsáveis por ITUs	9
Figura 2: Diferentes classes de antibióticos β -lactâmicos	15
Figura 3: Mecanismo de ação das beta-lactamases	18
Figura 4: Diferentes etapas do método automático VITEK®2	40
Figura 5: Configuração das tiras E-test®	42
Figura 6: Distribuição dos pacientes por faixa etária	43
Figura 7: Incidência dos isolados clínicos	43
Figura 8: Incidência das principais bactérias Gram-negativas.....	43
Figura 9: Número de isolados de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> produtores e não produtores de ESBL	43
Figura 10: Número de isolados produtores de ESBL por género e por faixa etária	43
Figura 11: Taxas de resistência aos antibióticos entre as bactérias Gram-negativas.	43
Figura 12: Taxas de resistência dos isolados de <i>E. coli</i> , produtores e não produtores de β -lactamases, aos antibióticos testados.....	43
Figura 13: Taxas de resistência dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> , produtores e não produtores de β -lactamases, aos antibióticos testados	43
Figura 14: Taxas de resistência dos isolados de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> ESBL- aos antibióticos testados	43
Figura 15: Taxas de resistência dos isolados de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> ESBL+ aos antibióticos testados	43
Figura A1: Base de dados de vigilância epidemiológica do CHBV (parte 1).....	89
Figura A2: Base de dados de vigilância epidemiológica do CHBV (parte 2).....	90
Figura A3: Base de dados de vigilância epidemiológica do CHBV (parte 3).....	91
Figura A4: Base de dados de vigilância epidemiológica do CHBV (parte 4).....	92

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das ITUs de acordo com o local da infecção	8
Tabela 2: Terapêutica antimicrobiana inicial para os diferentes tipos de UTIs e duração média de tratamento.....	10
Tabela 3: Suscetibilidade de diferentes uropatógenos a alguns agentes antimicrobianos.....	10
Tabela 4: Sistemas de classificação das β -lactamases	21
Tabela 5: Avaliação do crescimento bacteriano em urocultura.....	39
Tabela 6: Guidelines para a interpretação das tiras E-test [®] ESBL.....	42
Tabela A: Substratos utilizados na carta VITEK2 GNI para identificação de bactérias Gram-negativas	94
Tabela B: Carta VITEK2 AST-N192 para antibiograma de microorganismos Gram-negativos	95
Tabela C: Carta VITEK2 AST-N222 para antibiograma de microorganismos Gram-negativos	96

I. INTRODUÇÃO

Introdução

As infecções são uma das principais causas de recurso aos serviços de saúde, dentro das quais as infecções do trato urinário (ITUs) são as segundas mais prevalentes (1–4). Estima-se que, em 2009, 137000 americanos com mais de 85 anos tenham sido hospitalizados devido a uma ITU (2). Dada a prevalência das ITUs a nível mundial, é de esperar que as amostras de urina sejam das mais frequentes amostras com que os laboratórios de microbiologia clínica trabalham diariamente. Assim, é crucial que os métodos de identificação bacteriana permitam dar resposta com a maior brevidade possível e com uma elevada relação qualidade/custo (5,6). Entre as estirpes mais frequentemente isoladas neste tipo de infecções estão bactérias da família *Enterobacteriaceae*, nomeadamente *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (7). Para o tratamento das ITUs são muitas vezes utilizados antibióticos β -lactâmicos, no entanto nos últimos anos tem aumentado a taxa de *Enterobacteriaceae* resistentes a esta grande família de antimicrobianos (8,9).

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos, nomeadamente por produção de enzimas β -lactamases, é uma realidade há mais de 70 anos, mesmo antes do início da utilização clínica da penicilina (10,11). Porém, foi apenas nas últimas décadas, com a utilização massiva de agentes antimicrobianos, que este mecanismo se tornou um grave problema de saúde pública à escala mundial (8,9). A utilização massiva e indiscriminada dos antibióticos β -lactâmicos fez emergir o universo das β -lactamases e, com ela, surgiu uma nova classe destas enzimas, as β -lactamases de espectro estendido (ESBL), presentes em elevada percentagem nas bactérias mais frequentemente causadoras de ITUs (12). Esta classe de enzimas é muito extensa e diversificada, limitando cada vez mais as opções terapêuticas disponíveis (12). Assim, estes mecanismos de resistência são motivo de preocupação crescente para todos os profissionais de saúde (11,13,14), justificando a existência de estudos de vigilância epidemiológica a nível local e mundial de forma a monitorizar o comportamento destas estirpes e formular medidas rígidas de controlo de infeção.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Infecções do trato urinário

As infecções do trato urinário (ITUs) são o segundo tipo de infecções bacterianas mais prevalentes na comunidade, atrás das infecções respiratórias (4). As ITUs são definidas como uma condição em que uma ou mais regiões do trato urinário são infetadas por fungos, vírus, parasitas ou bactérias (mais comum) (15). Quando a infecção é adquirida fora do ambiente hospitalar e em pacientes sem alterações funcionais do trato urinário, diz-se que a ITU é não complicada. Por outro lado, em pacientes com doenças crônicas, imunodeprimidos, com tumores malignos, grávidas, entre outros, nos quais existe maior suscetibilidade do organismo à infecção, as ITUs são consideradas complicadas (15,16). A prevalência das ITUs difere entre população, sendo mais frequente (prevalência aproximadamente 10 vezes maior (revisto em (17)) nas mulheres em relação aos homens (15,16,18). Estima-se que durante toda a vida aproximadamente 50% da população do sexo feminino sofra de, pelo menos, uma ITU (16). Esta discrepância das ITUs entre os sexos é explicada, maioritariamente, por fatores anatómicos característicos do aparelho reprodutor feminino, nomeadamente a menor extensão da uretra e a existência de flora saprófita na região periuretral (15).

Apesar da maioria das ITUs não necessitarem de internamento hospitalar, os custos com este tipo de infecções é enorme. Nos EUA, por ano, cerca de 7 milhões de pessoas recorrem a um serviço de saúde devido a uma ITU, levando a uma despesa total de mais de 1,6 bilhões de dólares (15) e aproximadamente 15% das prescrições anuais de antibióticos neste país são para o tratamento de ITUs (revisto em (4)). As ITUs são também muito comuns em pacientes hospitalizados, representando 8 a 35% de todas as infecções nosocomiais (IN) (19,20).

A classificação das ITUs é feita mediante o local onde ocorre a infecção, como sumarizado na Tabela 1. O diagnóstico clínico deste tipo de patologias nem sempre é fácil, uma vez que não existem sintomas específicos que indiquem ao clínico inequivocamente a presença de uma ITU (15,21). Os sintomas mais comuns incluem febre, urgência e dor localizada, embora esteja reportado que apenas em 65% das mulheres com estes sintomas se confirma a ITU (22). O diagnóstico definitivo é feito com recurso a exame microbiológico da urina, nomeadamente com urocultura, contagem do número de unidades formadoras de colónias (CFUs), identificação bacteriana, teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA) e análise do sedimento urinário, que inclui contagem de células, eritrócitos e leucócitos, entre outros elementos figurados (15,21). De ressaltar que apenas quando há uma bacteriúria significativa por uma estirpe ($>10^5$ CFUs) se realiza a identificação bacteriana e respetivo TSA. Existem também casos de bacteriúria assintomática, isto é, quando existem mais do que 10^5 CFUs na amostra analisada mas o paciente não apresenta nenhum dos outros sintomas

de infecção supracitados. Estes casos aumentam o risco do desenvolvimento de uma bacteriúria sintomática, que normalmente se manifesta no prazo de uma semana (15).

Tabela 1: Classificação das ITUs de acordo com o local da infecção (adaptado de (15)).

Classificação da ITU	Características principais
Cistite	Infeção da bexiga. Forma mais comum de ITU. Os sintomas mais típicos incluem disúria, urgência, dor suprapúbica e hematúria. Febre, náuseas e vômitos são raros.
Pielonefrite	Infeção que envolve parênquima renal. Além dos sintomas descritos para a cistite, a pielonefrite é frequentemente acompanhada de febre, vômitos severos e choque séptico (hemoculturas positivas em 20% dos casos). Em alguns casos pode ocorrer necrose papilar e falência renal, nomeadamente em pacientes diabéticos.
Uretrite	Normalmente apresenta sintomas como disúria e corrimento uretral, no entanto é comumente assintomática. É predominantemente uma doença sexualmente transmissível.
Prostatite	Infeção que pode ser aguda ou crónica, dependendo da duração dos sintomas. Sintomas como dor perianal ou escrotal, urgência e disúria são comuns. É a ITU mais comum nos homens.

Os microorganismos mais comumente associados às infecções urinárias são os bacilos de Gram-negativo, nomeadamente *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Proteus* spp., principalmente em ITUs não complicadas (7) (cf. secção II.2. *Enterobacteriaceae* para caracterização destes microorganismos). Nas ITUs complicadas são comumente isoladas outras estirpes, nomeadamente *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (23). A Figura 1 mostra a distribuição percentual das

estirpes causadoras de ITUs num estudo levado a cabo por K.R. Rajesh *et al.*, em 2010 (24). Depois de estabelecido o diagnóstico de uma ITU e identificado o agente etiológico causador da mesma é necessário iniciar uma terapêutica antimicrobiana que vá de acordo às características específicas do patogéneo em questão.

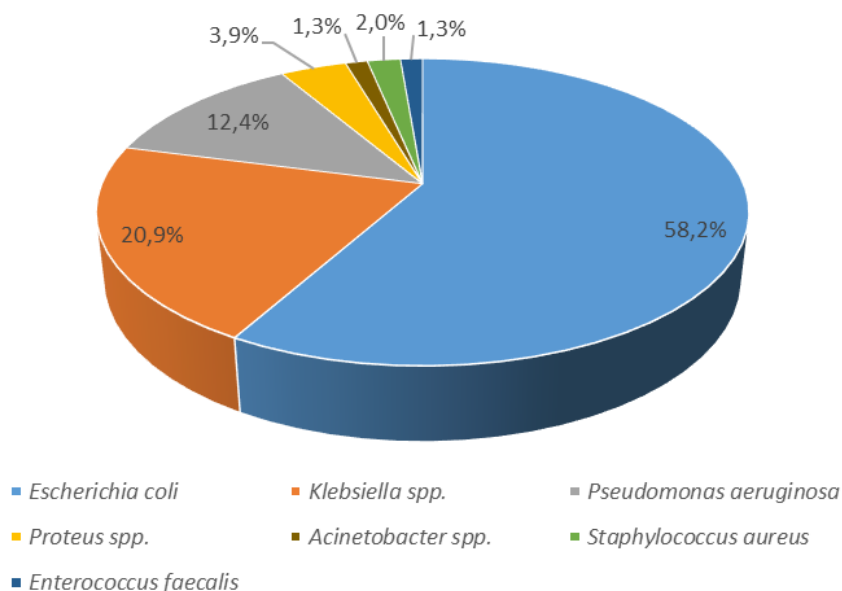


Figura 1: Distribuição dos organismos responsáveis por ITUs (adaptado de (24)).

A IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) e a ESCMID (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*) possuem guias práticos que descrevem qual a terapia antimicrobiana adequada às ITUs, de acordo com o local e tipo de infecção, a idade e sexo dos pacientes, os microorganismos causadores da mesma assim como a duração média do tratamento (25,26). Esta informação encontra-se sintetizada na Tabela 2. Apesar de existir um leque de antibióticos que é usado empírica e inicialmente para combater as ITUs a verdade é que as taxas de resistência bacteriana têm vindo a aumentar e agentes antimicrobianos que há umas décadas eram eficazes contra um determinado microorganismo hoje revelam-se inúteis, dado o desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte de diversos microorganismos (24) (cf. secção 2.4. β -lactamases). A Tabela 3 apresenta um resumo de algumas taxas de resistência e suscetibilidade dos microorganismos mais comumente causadores de ITUs a diversos antibióticos. É necessário ressaltar que existem microorganismos que são intrinsecamente resistentes a algumas classes de antibióticos, como é o caso da *K. pneumoniae* que, por possuir β -lactamases cromossomais é resistente às penicilinas, como é o caso da amoxicilina (15,27). Além disso, este microorganismo pode também adquirir resistência às cefalosporinas, por produção de β -lactamases de espectro alargado (ESBLs) (27).

Tabela 2: Terapêutica antimicrobiana inicial para os diferentes tipos de UTIs e duração média de tratamento (adaptado de (8)).

Diagnóstico	Patogêneos mais frequentes	Terapêutica antimicrobiana empírica	Duração do tratamento (em dias)
Cistite aguda, não complicada	<i>E. coli</i> <i>Klebsiella</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp.	Trimetoprim/Sulfametoxazole ¹ Nitrofurantoína	3 5 a 7
Pielonefrite aguda, não complicada	<i>E. coli</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp. Outras enterobactérias <i>Staphylococcus</i> spp.	Fluoroquinolonas ² Cefalosporinas (3ª geração)	7 a 10
ITUs complicadas	<i>E. coli</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp.	Fluoroquinolonas ² Aminopenicilina/IBL ³ Cefalosporinas (2ª e 3ª geração) Aminoglicosídeos	3 a 5
Pielonefrite aguda, complicada	<i>Enterobacter</i> spp. Outras enterobactérias		
ITUs nosocomiais	<i>Klebsiella</i> spp. <i>Proteus</i> spp.		
Prostatite	<i>E. coli</i> Outras enterobactérias <i>Pseudomonas</i> spp.	Fluoroquinolonas ² Cefalosporinas (3ª geração) Macrólidos	Casos agudos: 14 a 28 Casos crônicos: 28 a 42 ou mais
Urosépsis	<i>E. coli</i> Outras enterobactérias	Cefalosporinas (3ª geração) Fluoroquinolonas ² Carbapenemos	3 a 5

¹ apenas em áreas em que a taxa de resistência de *E. coli* é <20%

² utilizar preferencialmente fluoroquinolonas de excreção renal

³ IBL: Inibidor de β-lactamase

Tabela 3: Suscetibilidade de diferentes uropatogêneos a alguns agentes antimicrobianos (adaptado de (15)).

	Taxa de suscetibilidade de uropatogêneos a diferentes antibióticos (%)				
	Amoxicilina	Cefradina	Trimetoprim	Nitrofurantoína	Ciprofloxacina
<i>E. coli</i>	51	79	73	96	98
<i>K. pneumoniae</i>	1	72	85	16	95
<i>P. mirabilis</i>	73	5	58	0	87

Como é possível analisar na Tabela 3 e tal como referido anteriormente, *K. pneumoniae* não apresenta suscetibilidade à amoxicilina e apresenta uma taxa consideravelmente baixa de suscetibilidade à nitrofurantoína. Para esta espécie, assim como para os uropatógenos mais frequentes, as melhores opções terapêuticas, segundo a Tabela 3, passam pela utilização de quinolonas, nomeadamente a ciprofloxacina. No entanto, um estudo de 2010 (24) mostra que, na amostra analisada, a sensibilidade das estirpes isoladas de *K. pneumoniae* em pacientes com ITUs fica a rondar os 50%, pondo em causa a utilização deste agente para o tratamento da patologia (24). Neste mesmo estudo, o imipenem e a nitrofurantoína revelaram-se os antibióticos mais eficazes contra este patógeno (24). Estes dados contraditórios provam a diversidade de fenótipos de resistência encontrados em diferentes estirpes da mesma espécie, reforçando a importância da realização de TSAs à estirpe isolada de um paciente, de modo a que seja possível a administração de um antimicrobiano adequado e aumentar a eficácia da terapêutica.

2. *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae é uma família de bactérias bacilares muito abundantes, de Gram-negativo, da qual fazem parte uma grande variedade de espécies, estando descritas na literatura 40 géneros diferentes e mais de 150 espécies (28). Apesar de algumas destas espécies serem inofensivas para o Homem, vivendo com mecanismos de simbiose (29), fazem também parte desta família algumas das espécies patogénicas mais comuns, como *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., entre outras, que são frequentemente isoladas de todos os produtos biológicos (28,29). Estas espécies apresentam diversos fatores de virulência responsáveis pela patogenicidade das mesmas (30). Como referido na secção II.1. as bactérias da família *Enterobacteriaceae* são responsáveis pela esmagadora maioria das ITUs (aproximadamente 80%) (7,15,16) e por mais de 50% de todas as infeções nosocomiais (31), pneumonias e infeções da corrente sanguínea e intra-abdominais (32). Em Portugal, um relatório efetuado em 2009 pelo Departamento de Qualidade na Saúde e pela Direção Geral da Saúde mostra que 34,4% de todas as infeções adquiridas na comunidade estudadas foram causadas por espécies da família *Enterobacteriaceae* (33). Estes dados comprovam a importância da identificação e monitorização contínua de todas estas estirpes.

Morfologicamente as enterobactérias são dos maiores microorganismos conhecidos, podendo medir até 4µm de comprimento e apresentar-se sob a forma de cocobacilos ou bacilos, não esporulados (30). Estes microorganismos apresentam um

crescimento não fastidioso, sendo as colónias facilmente visíveis ao fim de 12-18h de incubação em meios simples como o de agar-sangue (não seletivo) ou em gelose MacConkey (seletivo), tanto em aerobiose como em anaerobiose (30). A diferenciação da família *Enterobacteriaceae* das restantes bactérias bacilares de Gram-negativo é feita tendo em conta características fenotípicas, como os padrões de fermentação dos carboidratos, e capacidade de desaminação de aminoácidos (28,30). Bactérias deste tipo são oxidase-negativas, catalase-positivas (exceto raras exceções), redutoras de nitratos a nitritos e fermentadoras da glucose (29,30). Para ser possível distinguir entre os diferentes serotipos da mesma espécie é necessário recorrer à identificação dos antigénios presentes na membrana externa (para informação adicional acerca da classificação serológica de enterobactérias consultar ref. (28)).

As estirpes de *E. coli* colonizam normalmente o intestino de um indivíduo saudável, no entanto são também agentes comuns de infeções oportunistas em todo o organismo, nomeadamente infeções da corrente sanguínea, peritonites e infeções de feridas, quando o sistema imunitário do hospedeiro está debilitado (29,34). Esta patogenicidade está relacionada com a quantidade de antigénios que esta espécie possui (28). Na maioria das vezes apresentam mobilidade e cerca de 80% das estirpes são fimbriadas (maioritariamente hemaglutinantes) (28). Esta enterobactéria é, segundo um estudo levado a cabo em Portugal, o segundo agente mais frequentemente isolado de IN, representando 14,5% do total destas e 24,1% de todas as IC (33). Quando nos reportamos apenas a ITUs, *E. coli* aparece no topo da lista, como a bactéria mais frequente deste tipo de patologias (7,24,29,34,35).

K. pneumoniae é, ao contrário de *E. coli*, uma espécie imóvel, mas que apresenta também fímbrias do tipo 1, hemaglutinantes (29). Na maioria das vezes possui cápsula e é isolada frequentemente de vegetação, solo, água e fezes (29,30). Estas estirpes são facilmente reconhecidas pelas suas grandes colónias mucoides, que têm este aspeto graças à secreção de um polissacarídeo conhecido como “substância mucóide” (29). A *K. pneumoniae* é frequentemente isolada em pacientes com ITUs (35) mas também em produtos biológicos do aparelho respiratório e sangue (30). Esta espécie coloniza habitualmente o trato gastrointestinal, a pele, orofaringe e vias aéreas de pacientes hospitalizados, sendo frequentemente associada a infeções oportunistas em pacientes imunodebilitados (34). Este microorganismo tem uma taxa de disseminação muito rápida, quer por via gastrointestinal, aérea ou pelas mãos, sendo muitas vezes responsável por surtos hospitalares (34). Assim, é fácil perceber os resultados do Inquérito Nacional de Prevalência da Infeção, que mostram que *K. pneumoniae* está mais associada a IN (7,9%) do que a IC (6,1%) (33).

Para tratar as infecções causadas por bactérias da família *Enterobacteriaceae* os antibióticos preferenciais são os beta-lactâmicos (8). No entanto, são cada vez mais os casos de resistência a estas classes de antimicrobianos, principalmente pela produção de ESBLs (32). A resistência de enterobactérias causada pela produção deste tipo de β -lactamases é um grave problema hospitalar (36), mas estudos recentes mostram que a taxa de resistência nas ITUs adquiridas na comunidade já igualou os valores registados nas IN (24), sendo um motivo extra de preocupação para os clínicos. Atualmente e tendo em conta estes dados, a terapêutica mais eficaz no combate às infecções causadas por enterobactérias passa pela utilização de associações entre penicilinas e inibidores das β -lactamases (como o caso da amoxicilina/ácido clavulânico) ou então, em casos de resistência, a administração de carbapenemos (35).

3. Antibióticos

A descoberta dos antibióticos remonta a 1928, ano em que Alexander Fleming descobriu e isolou a penicilina, produzida por um fungo do género *Penicillium*, quando percebeu que a presença deste fungo era capaz de inibir o crescimento de estafilococos e outras bactérias (37). Esta pesquisa, premiada com um Nobel em 1945, revolucionou a medicina e a terapêutica. Já nos anos 40 e 50 desenvolveram-se a estreptomicina e as tetraciclina e, mais tarde, os aminoglicosídeos, cefalosporinas, quinolonas e penicilinas semissintéticas (28). Esta rápida emergência de antibióticos tornou possível o tratamento e a cura de um grande número de patologias infecciosas que eram, naquela altura, fatais (28,38). Por outro lado, esta utilização massiva rapidamente levou ao aparecimento de diversas resistências que são, hoje em dia, um grande entrave à eficácia das terapêuticas administradas (38).

Os antibióticos são definidos como substâncias que, administradas em pequenas quantidades, são capazes de matar ou inibir o crescimento bacteriano, sem efeito tóxico no hospedeiro e, como tal, são utilizados no combate a infecções (28,30). Se o antimicrobiano for letal para o microorganismo designa-se por bactericida, caso contrário, se apenas for capaz de inibir o crescimento bacteriano, designa-se por bacteriostático (28,38). Neste último caso, o sistema imune do hospedeiro é o responsável pela erradicação da infeção (30). A terapia antimicrobiana é seletiva, isto é, um determinado antibiótico atua numa estrutura-alvo específica da célula bacteriana (38). Assim, os antibióticos podem classificar-se em inibidores da membrana plasmática, inibidores da síntese proteica, inibidores da síntese da parede celular e podem ainda possuir atividade antimetabólica ou interferir na síntese de material genético (38).

Existem duas grandes famílias de antibióticos: os β -lactâmicos e os não β -lactâmicos (28). Estes últimos são divididos em várias classes: quinolonas, macrólidos, aminoglicosídeos, glicopéptidos, tetraciclinas, lipopéptidos, fosfomicinas, inibidores do metabolismo do ácido fólico, lincosamidas, nitrofuranos, oxazolidinonas, estreptograminas, ansamicinas e gliciliclinas (30). Na prática clínica, e para o tratamento das ITUs, os antibióticos não β -lactâmicos mais usados são, como é possível extrapolar da Tabela 2, os aminoglicosídeos, os nitrofuranos, os inibidores do metabolismo do ácido fólico e as quinolonas (8). No entanto, dada a sua elevada toxicidade, estes últimos não são a primeira escolha de terapia antimicrobiana. Vários estudos têm reportado a ocorrência de lesões do ligamento patelar do joelho em pacientes sujeitos a tratamento com antibióticos pertencentes à classe das quinolonas (ciprofloxacina, entre outros) (39–42). De facto, o uso desta classe de antibióticos é frequentemente associado a tendinites e artralguas, o que levou a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América a colocar a ciprofloxacina na chamada “lista negra” de agentes antimicrobianos (43). Por outro lado, também os aminoglicosídeos apresentam efeitos adversos graves, nomeadamente nefrotoxicidade (44) e, por isso, a sua utilização deve ser controlada. Assim, os antibióticos β -lactâmicos parecem ser a melhor opção terapêutica para o tratamento de ITUs e, por isso, serão objeto de discussão aprofundada na subsecção seguinte.

3.1. Antibióticos β -lactâmicos: definição e mecanismo de ação

Os antibióticos β -lactâmicos são os agentes antimicrobianos mais antigos e mais utilizados na clínica, uma vez que, dado o seu mecanismo de ação, não causam toxicidade no Homem, contrariamente ao que acontece com outras classes de antibióticos, nomeadamente as quinolonas e os aminoglicosídeos (30,43–45). Os antibióticos β -lactâmicos interferem com as reações de transpeptidação na fase final da síntese da cadeia de peptidoglicano da parede celular bacteriana e têm, por isso, uma ação bactericida (30). O composto mais conhecido e mais antigo desta família é a penicilina, no entanto são considerados β -lactâmicos todos os antibióticos pertencentes às seguintes classes: penicilinas, inibidores das β -lactamases, monobactâmicos, carbapenemos e cefalosporinas (28). O nome desta grande família deriva da presença de um anel β -lactâmico na estrutura de todos estes compostos, que lhes confere atividade antimicrobiana (30). Este anel pode ser combinado com diversas estruturas, resultando nas diferentes classes de antibióticos β -lactâmicos conhecidos, como se pode ver na Figura 2. Enquanto os antibióticos monobactâmicos têm na sua estrutura apenas um anel, as penicilinas e os carbapenemos apresentam-se sob a forma de um

anel β -lactâmico fundido com um anel de cinco lados e as cefalosporinas têm, além do anel β -lactâmico, um anel de seis lados (30). Estas diferentes estruturas, todas com um anel comum, conferem às várias classes de antibióticos desta família diferentes níveis de atividade bactericida, por apresentarem distintos níveis de permeabilidade na célula bacteriana e diferente afinidade com o local-alvo (9,30). Interferem também com a farmacocinética dos compostos, fazendo variar a forma de administração do fármaco (30,45).

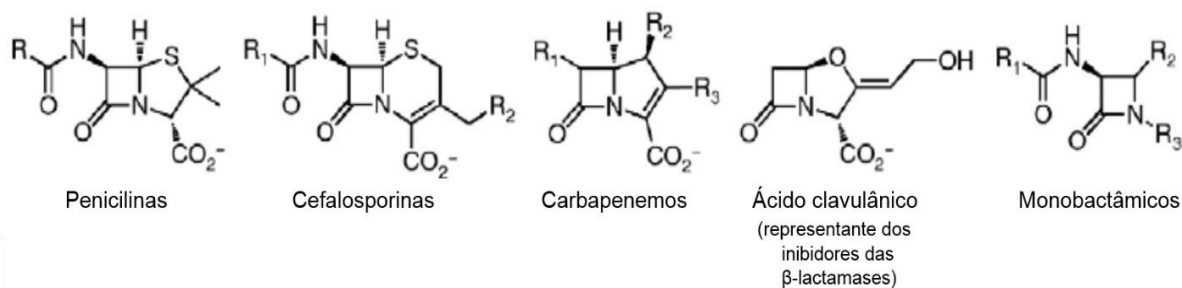


Figura 2: Diferentes classes de antibióticos β -lactâmicos (adaptado de (9)). As cadeias R, R₁, R₂ e R₃ são diferentes entre os diversos antibióticos de cada uma das classes, conferindo a cada um deles características únicas, nomeadamente no que respeita à farmacocinética e atividade bactericida do antibiótico (30,45).

A camada de peptidoglicano (também denominado mureína) da parede celular bacteriana confere rigidez e forma ao organismo (30). Esta grande molécula é formada pelo entrecruzamento de dois açúcares: o ácido *N*-acetilmurâmico e a *N*-acetilglucosamina, ligados entre si por ligações glicosídicas $\beta 1 \rightarrow 4$. A ligar os resíduos de ácido *N*-acetilmurâmico entre si existem oligopéptidos, conferindo à estrutura do peptidoglicano uma forma de rede (46). A síntese desta grande molécula é conseguida com recurso a diversas enzimas pertencentes à família das proteases serínicas, nomeadamente as transpeptidases, que catalisam as reações de entrecruzamento de péptidos entre as cadeias de polissacarídeo (46,47). Estas enzimas são o alvo dos antibióticos β -lactâmicos, sendo denominadas *Penicillin Binding Proteins* (PBPs) (28). Quando a bactéria está na fase de crescimento e é exposta a antibióticos β -lactâmicos, estes ligam-se ao local alvo em PBPs específicas, inibindo deste modo a formação de pontes entre as cadeias de peptidoglicano. Por outro lado, este processo irá ativar autolisinas bacterianas que degradam a parede celular, provocando a morte da bactéria, por lise osmótica (28,30).

O espectro de ação dos antibióticos β -lactâmicos engloba bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. No entanto, tendo em conta o seu mecanismo de ação, esta família de antimicrobianos não tem atividade contra bactérias do género *Mycoplasma*, pois estes não possuem parede celular (30,45). A este mecanismo dá-se o nome de resistência natural (28). Este tipo de resistência ocorre também nas micobactérias, que, além das características da sua parede celular dificultarem a penetração do antibiótico

até ao local-alvo (38), produzem naturalmente β -lactamases que degradam o antibiótico (45). Apesar dos antibióticos β -lactâmicos terem atividade tanto em bactérias Gram-negativas como em bactérias Gram-positivas, o local onde se encontram as suas estruturas alvo difere entre estas duas famílias de bactérias (45). Nas bactérias Gram-positivas, a parede celular é composta por uma espessa camada de peptidoglicano, do lado exterior da célula. Assim, as PBPs estão localizadas do lado externo da membrana citoplasmática, sendo este o local-alvo dos antibióticos β -lactâmicos (30). Já nas bactérias Gram-negativas, como a parede celular se encontra mais estratificada, com duas membranas constituídas, entre outros, por fosfolípidos, lipoproteínas e porinas, a camada de peptidoglicano é mais fina e encontra-se localizada entre as membranas, no espaço periplásmico (47). Assim, para atingir o local-alvo, o antibiótico terá que atravessar a membrana externa da bactéria (30).

3.2. Mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos

A utilização massiva de antibióticos β -lactâmicos causou, nas populações bacterianas, uma grande pressão seletiva que levou, através da flexibilidade genética, à capacidade de algumas estirpes sobreviverem em ambientes com uma grande carga de antimicrobianos (38). Nos últimos anos têm sido detetados diversos fenótipos de resistência em várias espécies bacterianas (9). Este aumento das taxas de resistência representa um motivo de preocupação para os clínicos, na medida em que leva, em muitos casos, à falência terapêutica, que pode ser decisiva no tratamento de um doente em estado crítico (48).

Atualmente são conhecidos três principais mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos (45,49). Um destes é a modificação do alvo, isto é, alterações nas PBPs. Mutações ao nível desta enzima, principalmente no seu local ativo, podem dificultar a ligação do antibiótico (9,48). As bactérias podem também ser capazes de hiper-expressar esta proteína, diminuindo assim a eficácia do agente antimicrobiano (45). Este é o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em microorganismos Gram-positivos (45). Outro dos mecanismos de resistência comuns é a presença bombas de efluxo, conjugadas com alterações de permeabilidade. Como os antibióticos β -lactâmicos são pouco lipofílicos, a sua entrada na célula através da membrana celular nas bactérias Gram-negativas só é possível graças à presença de proteínas, denominadas *Outer membrane proteins* (OMPs) que formam poros, facilitando a passagem da molécula até ao espaço periplásmico, onde se encontram as PBPs (38). Alterações nestas proteínas podem diminuir o influxo do antibiótico, diminuindo a suscetibilidade do microorganismo ao mesmo (30,45). Por outro lado, algumas bactérias

adquirem genes que codificam proteínas denominadas bombas de efluxo, que “bombeiam” o antibiótico para o espaço extracelular antes deste conseguir atingir o local-alvo (45). Existem ainda genes que codificam proteínas reguladoras que são capazes de promover a expressão de genes responsáveis pelas bombas de efluxo e, ao mesmo tempo, reprimir a expressão génica de genes que codificam para as OMPs (38). Estes mecanismos conjugados provocam uma diminuição significativa da sensibilidade do microorganismo ao antibiótico (38).

Além dos mecanismos supra-citados, a maior causa de resistência aos antibióticos β -lactâmicos prende-se com a produção de enzimas (β -lactamases) (45). Este mecanismo é muito frequente, nomeadamente em microorganismos Gram-negativos, como *E. coli* e *K. pneumoniae* (9). As β -lactamases são enzimas que têm a capacidade de degradar o anel β -lactâmico desta família de antibióticos, levando à inativação dos mesmos (30). Estas enzimas podem estar codificadas em plasmídeos ou no cromossoma bacteriano (48). No primeiro caso, estas enzimas são, normalmente, inativadas pelos inibidores das β -lactamases, como é o caso do ácido clavulânico (45). No entanto, a presença de genes de resistência em plasmídeos é problemática, na medida em que estes podem ser transferidos entre diferentes espécies, na chamada transferência horizontal de genes, levando a uma disseminação da resistência aos antibióticos (48). As β -lactamases codificadas no cromossoma são, normalmente, induzíveis. Isto significa que a sua produção é exacerbada pela exposição do microorganismo ao antibiótico (nomeadamente às cefalosporinas) e não são inativadas pela presença de um inibidor como o ácido clavulânico (45). Aliás, no caso das AmpC, a sua expressão é induzida pela presença deste inibidor (45).

3.3. β -Lactamases

Desde a descoberta da penicilina e da sua utilização no combate a infeções que o universo bacteriano tem procurado formas de sobreviver em ambientes hostis, isto é, na presença de agentes antimicrobianos (50). Assim, a utilização em massa de antibióticos β -lactâmicos levou à rápida emergência de diversas β -lactamases, que se tornam, hoje em dia, num sério entrave à eficácia terapêutica (11,13). De facto, a primeira β -lactamase foi identificada antes do uso clínico da penicilina, quando Alexander Fleming se apercebeu que o crescimento de algumas linhagens de *Bacillus (Escherichia) coli* não era inibido pela penicilina (10,11). Num artigo publicado há mais de 70 anos, Abraham e Chain comprovaram esta descoberta e descreveram o *B. coli* como “penicilinase”, devido a esta característica (10). Esta descoberta não foi tida como clinicamente relevante pois aquando a descoberta da penicilina esta era apenas usada

para tratamento de infecções provocadas por espécies do género *Streptococcus* e *Staphylococcus* e os autores acima mencionados não conseguiram isolar a enzima em organismos Gram-positivos (11). No entanto, mais de 70 anos depois, as β -lactamases são o principal mecanismo de resistência adquirida aos antibióticos em microorganismos Gram-negativos, tanto em infecções nosocomiais como em infecções adquiridas na comunidade e a sua caracterização e classificação torna-se crucial na procura de soluções para o combate a este problema (11,13,14).

Como referido na subsecção anterior, as β -lactamases constituem um grupo de enzimas capazes de inativar o anel β -lactâmico, por clivagem (30), como é possível analisar na Figura 3. A destruição do anel implica a disfunção do antibiótico, que se torna incapaz de se ligar às PBPs e impedir a formação da parede celular bacteriana (30).

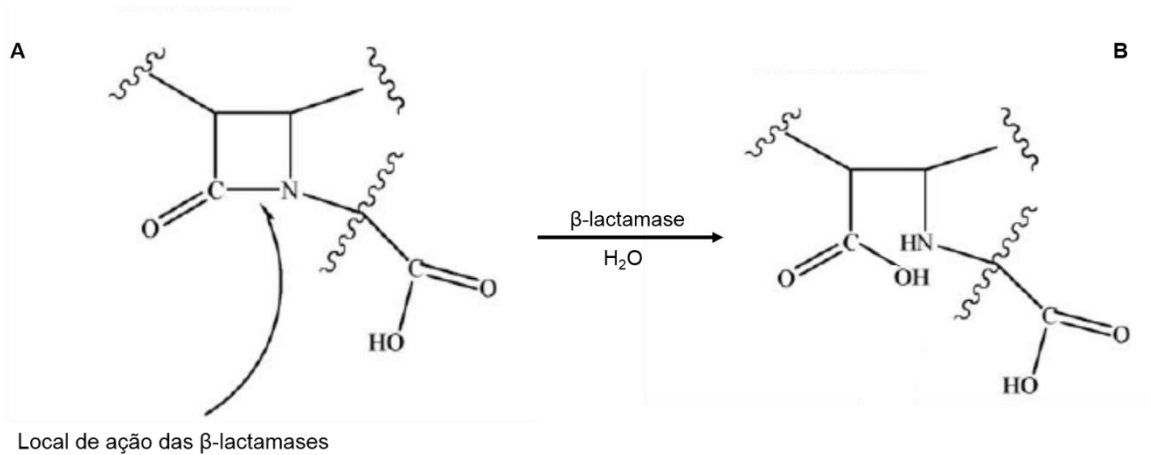


Figura 3: Mecanismo de ação das beta-lactamases (adaptado de (49)). À esquerda (A) é possível ver a estrutura base de um antibiótico β -lactâmico, com o anel β -lactâmico intacto. À direita (B), depois da ação da enzima, é possível verificar que ocorreu hidrólise do anel na ligação C-N, com formação de uma amina secundária e um grupo carboxilo, levando à perda de função do antibiótico.

3.3.1. Caracterização e classificação das β -lactamases

As β -lactamases (*bla*) são codificadas por genes que se podem encontrar tanto no cromossoma bacteriano como em elementos móveis, como plasmídeos, transposões, entre outros (49). Os genes *bla* encontram-se frequentemente em integrões, que constituem um método eficiente de troca de genes de resistência (51). Estes elementos genéticos móveis que contêm integrões são uma importante fonte para a rápida disseminação de genes *bla* por transferência horizontal (49).

A classificação das β -lactamases tem sido motivo de grande discussão científica nos últimos anos, dada a dificuldade de categorizar adequadamente as mais de 850 β -lactamases identificadas até hoje (11,52). Ao longo dos anos vários sistemas de classificação foram surgindo, no entanto existem dois sistemas de classificação mais

consensualmente aceites e que são utilizados para a classificação destas enzimas: o sistema de classificação de Ambler (53), baseado nas semelhanças entre a sequência de aminoácidos, e o sistema de Bush-Jacoby-Medeiros (54), que é baseado no perfil de substratos e inibidores. Este último sistema sofreu algumas alterações desde a sua publicação original e é, agora, denominado de sistema de classificação de Bush-Jacoby (14). A Tabela 4 resume as principais características de cada uma das classes de β -lactamases, assim como as principais enzimas de cada grupo.

A necessidade de se criar um sistema de classificação capaz de categorizar as β -lactamases de uma forma funcional advém do facto do nome das enzimas acarretar uma grande complexidade, uma vez que não existe uma lógica passível de ser seguida. De facto, os nomes das β -lactamases são extremamente variados, e a sua escolha apresenta motivos que vão desde o substrato preferencial (OXA – oxacilina; CTX-M - cefotaxima) até ao local onde foi pela primeira vez isolada a enzima (VIM – Vietname; BEL - Bélgica) ou ao nome do paciente onde foi isolada (TEM – Temoniera), entre outros (55). Assim, segundo a classificação proposta por Ambler, as β -lactamases podem ser divididas em 4 grupos, identificados alfabeticamente de A a D (53). As classes A, C e D partilham a característica de possuírem, no seu local-ativo, uma serina e são, por isso, denominadas de serina β -lactamases (11,53). Já as enzimas pertencentes à classe B são metalo- β -lactamases pois possuem, no local ativo, um ou dois iões Zn^{2+} , coordenados com os resíduos de histidina, cisteína e aspartato da cadeia polipeptídica da enzima (14). Por outro lado, a classificação proposta por *Bush et al.* em 1995 (54) e revista, mais tarde em 2009 (14), assenta no perfil de substrato e inibidores de cada uma destas enzimas (14). Assim, segundo este sistema, as β -lactamases são divididas em quatro grupos, numerados de 1 a 4, subdivididos depois em grupos representados por letras de a até f (11,14,54).

Cada uma das classes de cada um dos sistemas de classificação apresenta características que as distinguem das restantes e permitem agrupar as diversas enzimas. A classe A de Ambler, que corresponde à classe 2 de Bush, é composta por penicilinases que são sensíveis à ação do ácido clavulânico ou do tazobactam, inibidores mais utilizados para estas enzimas (11). Como se pode verificar na Tabela 4, algumas das enzimas mais significativas deste grupo incluem a PC1 (grupo 2a), isolada de *Staphylococcus aureus* e as enzimas TEM-1 e SHV-1 (grupo 2b), comuns em bacilos de Gram-negativo, como *E. coli* e *K. pneumoniae*, que conferem resistência às penicilinas (11,54). A classe B de Ambler (grupo 3 de Bush) engloba as metalo- β -lactamases (MBL), capazes de conferir resistência aos carbapenemos e cefalosporinas, além da resistência às penicilinas (14). Estas enzimas são encontradas em grande parte das bactérias que apresentam fenótipos de resistência, onde normalmente se

encontram combinadas com outros tipos de β -lactamases (11,49). Inicialmente as MBL foram identificadas no cromossoma de cocos Gram-positivo e apenas em alguns bacilos Gram-negativos, como *Bacteroides fragilis* e *Stenotrophomonas maltophilia*, no entanto, a incorporação destes genes em elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposões, levou à disseminação de MBL no universo bacteriano (14). O grupo 1 de Bush, correspondente à classe C de Ambler engloba as cefalosporinas, como descrito na Tabela 4, sendo a enzima cromossomal AmpC, comum em *Enterobacteriaceae*, a mais representativa do grupo (11,49). Apesar das enzimas deste grupo conferirem resistência às cefalosporinas em geral, o cefepime é normalmente ativo em bactérias que apresentam AmpC (11,49). A classe D de Ambler (grupo 2d de Bush) é também conhecida pela classe das oxacilinas ou das OXA β -lactamases, precisamente pela capacidade de hidrólise da oxacilina (49). Diversos autores consideram esta classe uma das mais diversificadas, uma vez que, dependendo do tipo de OXA β -lactamase, estas podem apenas hidrolisar penicilinas ou cefalosporinas de espectro estreito ou podem ser capazes de hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido e carbapenemos (revisto em (49)). Por fim falta referir apenas o grupo 4 de Bush, que não apresenta nenhuma classe homóloga na classificação de Ambler (49). Como se pode verificar na Tabela 4, este grupo foi omitido da classificação de Bush aquando da sua revisão em 2009. Deste grupo faziam parte enzimas que ainda não estão completamente identificadas e que, por isso, não podem ser ainda corretamente categorizadas (14).

A primeira β -lactamase codificada em plasmídeos foi identificada em 1965, com o nome de TEM-1, num isolado de *E. coli* (55). A partir daí, outras espécies adquiriram estes genes de resistência, dando origem a variantes, como é o caso da SHV-1, identificada em *K. pneumoniae*, que partilha 68% da sequência de aminoácidos com a TEM-1 (11). Com a introdução das cefalosporinas de largo-espectro para o tratamento de infeções, no início da década de 80, aumentou a pressão seletiva no universo bacteriano, que levou ao surgimento de uma nova classe de β -lactamases, que conferem resistência a estes fármacos (11,49,52,55). Estas enzimas são chamadas β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (55).

Tabela 4: Sistemas de classificação das β -lactamases (adaptado de (14)).

Classificação Bush-Jacoby (14)	Classificação Bush-Jacoby-Medeiros (54)	Classificação de Ambler (53)	Substrato preferencial	Inibida por		Enzima(s) representativa(s)
				AC ou TZB	EDTA	
1	1	C	Cefalosporinas	N	N	AmpC de <i>E. coli</i>
1e	ND	C	Cefalosporinas	N	N	CMY-37
2a	2a	A	Penicilinas	S	N	PC1
2b	2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas	S	N	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas de largo-espectro, monobactâmicos	S	N	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15
2br	2br	A	Penicilinas	N	N	TEM-30, SHV-10
2ber	ND	A	Cefalosporinas de largo-espectro, monobactâmicos	N	N	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilina	S	N	CARB-3
2ce	ND	A	Carbenicilina, Cefepime	S	N	RTG-4
2d	2d	D	Oxacilina	Variável	N	OXA-1, OXA-10
2de	ND	D	Cefalosporinas de largo-espectro	Variável	N	OXA-11, OXA-15
2df	ND	D	Carbapenemos	Variável	N	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de largo-espectro	S	N	CepA
2f	2f	A	Carbapenemos	Variável	N	KPC-2, SME-1
3 ^a	3	B (B1)	Carbapenemos	N	S	IMP-1, VIM-I, L1
3b	3	B	Carbapenemos	N	S	CphA, Sfh-1
ND	4	ND	Hidrólise de imipenem, grupo heterogêneo	N	S	-

Legenda: AC – Ácido clavulânico; TZB – Tazobactam; NI – Não determinado; N – Não; S – Sim.

3.3.2. β -lactamases de espectro estendido (ESBL)

As β -lactamases de espectro estendido foram pela primeira vez descritas na Alemanha, em 1983, em isolados de *K. pneumoniae* e *Serratia marcescens*, mas depressa se disseminaram, através de plasmídeos, a outras bactérias da família *Enterobacteriaceae*, nomeadamente *E. coli* e *Proteus* spp. (56). Estas enzimas têm a particularidade de hidrolisarem as penicilinas, monobactâmicos e todas as cefalosporinas, incluindo as de largo-espectro (13), mas são sensíveis à ação dos inibidores das β -lactamases e não têm a capacidade de hidrolisar os carbapenemos

(56). Apesar de serem mais frequentes em *E. coli* e *K. pneumoniae*, já foram descritas ESBLs noutros organismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Capnocytophaga ochracea*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* (revisto em (12)). Infecções causadas por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs estão associadas a um aumento significativo da taxa de morbidade e mortalidade dos pacientes, e a um aumento dos custos associados aos cuidados de saúde (57).

As ESBL surgiram de mutações nas outras beta-lactamases, como nas classes TEM e SHV (49,56). Estas enzimas são codificadas em plasmídeos, o que torna a disseminação entre o universo bacteriano muito rápida, comprometendo a eficácia dos antibióticos β -lactâmicos (49,56). Dada a sua importância clínica e à quantidade de ESBL já descritas na literatura – mais de 300, até 2013 (56) – Bush e Jacoby criaram uma base de dados, que pode ser consultada online em <http://www.lahey.org/Studies>. Nesta base é possível aceder à informação detalhada das β -lactamases com maior interesse clínico, nomeadamente as ESBL, e introduzir as enzimas recém-descobertas (49,50).

Tal como a classificação das β -lactamases, também a categorização das ESBL tem vindo a ser objeto de discussão entre a comunidade científica. A classificação de Bush é a mais utilizada, em que as ESBL pertencem ao grupo 2be (classe molecular A), com exceção das ESBL do tipo OXA, que pertencem ao grupo 2d, no entanto, em 2009, uma equipa de investigadores liderada por Timothy Walsh (58) propôs uma nova classificação, na qual as ESBL são divididas em três grupos: ESBL_A, que englobam todas as enzimas pertencentes ao grupo 2be de Bush; ESBL_M, ou “miscellaneous ESBLs”, onde se incluem as OXA-ESBLs e as AmpC mediadas por plasmídeos (grupos 1 e 2d); e ESBL_{CARBA} onde, como o nome indica, se incluem todas as carbapenemases (58). Segundo os autores, esta nova classificação seria menos complexa e, por isso, era passível de uma melhor interpretação por parte dos clínicos (58). No entanto, no mesmo ano da sua publicação, Bush *et al.* revogaram a nova categorização, alegando que esta engloba β -lactamases que não eram, até à data, reconhecidas como ESBLs, como é o caso das metalo- β -lactamases e β -lactamases serínicas com mecanismos hidrolíticos e inibitórios distintos (59). Concluem que, ao contrário do que foi atestado por Giske *et al.* (58), esta nova classificação irá dificultar o trabalho dos laboratórios clínicos e dos profissionais de saúde (59).

Quando surgiram, a grande maioria das ESBLs que se encontravam em *Enterobacteriaceae* pertenciam às classes TEM, comuns em *E. coli* e mediadas por plasmídeos, ou SHV, codificadas no cromossoma de *K. pneumoniae* (12). Atualmente as ESBL mais comuns nesta família de microorganismos são do tipo CTX-M (60). Podem, no entanto, ser encontradas em enterobactérias outras ESBL, nomeadamente

do tipo OXA (12). Cada uma destas classes de ESBL será caracterizada nas subseções seguintes.

3.3.2.1. ESBL do tipo TEM

As β -lactamases de espectro estendido do tipo TEM são a maior família deste tipo de enzimas e derivam da TEM-1 e TEM-2, que não são ESBL (12,61). De facto, a enzima TEM-2 difere apenas da TEM-1 num aminoácido e tem os mesmos substratos preferenciais desta, isto é, ambas hidrolisam a ampicilina, penicilina, cefalosporinas de primeira geração, como a cefalotina (12).

Em 1984 foi detetada a primeira variação desta classe de β -lactamases, num plasmídeo, com a capacidade de hidrolisar também as cefalosporinas de espectro estendido (*Christian Brun-Buisson et al., 1987*, revisto em (62)). Inicialmente, esta variante foi denominada CTX-M mas, atualmente, é conhecida como TEM-3 (62). Em relação à TEM-2, a TEM-3 apenas apresenta duas substituições na cadeia peptídica (12). Apesar da TEM-3 ter sido a primeira ESBL do tipo TEM a ser descrita, sabe-se agora que não foi a primeira a ser isolada pois em 1982, em Liverpool, foi detetado um plasmídeo com uma β -lactamase que conferia resistência à ceftazidima, em *Klebsiella oxytoca*, que é hoje denominada TEM-12 (62).

Apesar de existirem inúmeras variantes de ESBL do tipo TEM, as alterações de aminoácidos entre as enzimas ocorrem em locais muito bem definidos (63). As alterações mais frequentes são de glutamato para lisina na posição 104, arginina para serina ou histidina na posição 164, glicina para serina na posição 238 e glutamato para lisina na posição 240 (63). Estas pequenas alterações fazem alterar o substrato preferencial da enzima e são causadas por mutações no gene *bla_{TEM-1}* (12). Além destas alterações, foram também já reportados na literatura outros tipos diferentes de ESBL-TEM. Um deles, denominado *complexo mutante da TEM*, é resistente à ação dos inibidores como o ácido clavulânico ou o tazobactam (62). Um outro tipo, chamado TEM-AQ, foi identificado apenas uma vez, em Itália, e resulta da deleção de um aminoácido não reportada em mais nenhum tipo de TEM-ESBLs, além de inúmeras substituições na cadeia peptídica (62).

Como as restantes classes de β -lactamases, as TEM-ESBLs são mais comuns em *E. coli* e *K. pneumoniae*, no entanto já foram isoladas enzimas desta família noutros bacilos Gram-negativos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus* spp. e *Salmonella* spp. (12,62,63).

3.3.2.2. ESBL do tipo SHV

As ESBL do tipo SHV derivam da SHV-1 que é encontrada, em todo o mundo, em *K. pneumoniae* (64). Esta β -lactamase é responsável por mais de 20% das resistências à ampicilina mediadas por plasmídeos nesta espécie (63). As SHV-ESBLs são muito comuns em muitas espécies de *Enterobacteriaceae* mas foram também já reportados casos destas enzimas em isolados de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (62,63).

Em 1983, na Alemanha, foi pela primeira vez identificada uma variante da SHV-1, num isolado de *Klebsiella ozaenae* (Knothe, H et al., 1983, revisto em (62)). Esta enzima, agora chamada SHV-2, mostrou hidrolisar eficientemente a cefotaxima e, em menor extensão, a ceftazidima (62). O alargamento do espectro de ação desta β -lactamase em relação à SHV-1 é causado pela substituição de um único aminoácido, a glicina por uma serina, na posição 238, resultado de mutações no gene *bla_{SHV-1}* (12,62,63). No entanto podem ser encontradas algumas variantes de SHV-ESBLs com substituição de um resíduo de lisina por glutamato na posição 240 (63). O número de SHV-ESBL descritas até então é consideravelmente inferior ao de TEM-ESBL (65). Até ao momento estão categorizadas mais de 60 SHV-ESBL, sendo as mais comuns a SHV-5 e a SHV-12 (65).

3.3.2.3. ESBL do tipo CTX-M

As β -lactamases de espectro estendido do tipo CTX-M devem o seu nome ao seu substrato preferencial, a cefotaxima (63). Esta classe de ESBL não é tão estreitamente relacionada com as duas classes anteriores, estimando-se que partilha apenas 40% da sequência polipeptídica com as classes TEM e SHV (65). Estas enzimas são cromossomais e encontram-se frequentemente em *Salmonella enterica* e *E. coli* (64). Pensa-se que as ESBL do tipo CTX-M derivam da enzima AmpC cromossomal de *Kluyvera* spp., dada a homologia entre estas (63). De facto, a enzima CTX-M-8 partilha 99% da sequência de aminoácidos com a KLUG-1 de *Kluyvera georgiana* (62).

As CTX-M já foram detetadas em todos os continentes e são, atualmente, o tipo mais frequente de ESBLs, sendo isoladas muito frequentemente em áreas densamente povoadas como a Índia ou a China (62). Estas enzimas encontram-se frequentemente em estirpes de *E. coli* causadoras de infeções do trato urinário, nomeadamente a CTX-M-15, em países do sul da Europa, como Portugal e Itália (66). O espectro de ação das CTX-M-ESBL não se restringe às infeções hospitalares, e são cada vez mais comuns os casos de infeções adquiridas na comunidade causadas por estirpes produtoras de uma CTX-M (66). Esta disseminação para a comunidade é conseguida, principalmente,

através dos lares de idosos, que servem de reservatórios destas estirpes, sendo depois transferidas para a comunidade ou para os hospitais, dando origem a graves problemas de saúde pública (66).

3.3.2.4. ESBL do tipo OXA

As β -lactamases de espectro estendido do tipo OXA pertencem ao grupo 2d de Bush e caracterizam-se por possuírem capacidade de hidrólise da cloxacilina e oxacilina que é em 50% superior à capacidade de hidrólise da benzilpenicilina e por serem fracamente inativadas pelo ácido clavulânico (62,63). A maioria das β -lactamases OXA não são ESBLs, no entanto algumas destas, nomeadamente a OXA-10, têm capacidade de inativar a ação da cefotaxima e ceftriaxone, conferindo às bactérias onde se encontram uma baixa suscetibilidade a estes antibióticos (62). Entre as OXA-ESBL com ação mais exacerbada sobre cefalosporinas de espectro alargado encontram-se a OXA-11, -14 a -19, -28, -31, -32, -35 e -45, que derivam da OXA-10 (63). Pensa-se que a alta taxa de resistência à ceftazidima em estirpes produtoras de OXA-ESBL está relacionada com a substituição de um resíduo de glicina por aspartato na posição 157 (63). As ESBL do tipo OXA foram pela primeira vez isoladas em *Pseudomonas aeruginosa*, na Turquia, e é nesta espécie que são mais frequentemente encontradas, ao contrário do que acontece com as ESBL do tipo TEM, SHV e CTX-M, que são mais comuns em *Enterobacteriaceae* (64).

3.3.2.5. Outros tipos de ESBLs

Apesar dos tipos acima descrito serem os mais comuns, estão descritas na literatura outras famílias de β -lactamases de espectro estendido que não estão relacionadas com as TEM, SHV, CTX-M ou OXA-ESBLs. Como exemplo encontra-se a PER-1, plasmídica, descoberta primeiramente em *Pseudomonas aeruginosa* e que se encontra presente em 60% dos isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes à ceftazidima (65). Existem outras enzimas relacionadas com a PER-1, como a β -lactamase PER-2, que foi isolada de *Salmonella enterica* na Argentina, a VEB-1, isolada em *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e a TLA-1, identificada também em *E. coli*, no México (63,65). Estas quatro enzimas, apesar de relacionadas, apresentam apenas uma percentagem de homologia entre os 40 e 50% (63). Todas conferem resistência à ceftazidima e ao aztreonam e pensa-se que tiveram origem nas cefalosporinases cromossomais de *Bacteroides* spp (63). Mais raras que estas β -lactamases são a SFO-1, que hidrolisa a cefamicina e a GES-1, que apresenta homologia com a carbenicilinase de *Proteus mirabilis* (63).

4. Detecção laboratorial de estirpes produtoras de ESBL

As infeções causadas por *Enterobacteriaceae* produtoras de um ou mais tipos de ESBL estão associadas a um pior prognóstico do paciente, com aumento das taxas de mortalidade e morbidade dos mesmos (57). Dada a alta taxa de disseminação destas enzimas por transferência horizontal de genes e a taxa de multiplicação bacteriana é necessário adotar medidas imediatas de isolamento e de terapia individualizada para assegurar a saúde do paciente e evitar surtos hospitalares por estas estirpes (57). Assim, é crucial a existência de métodos de deteção eficientes nos laboratórios clínicos que permitam a administração de uma terapia antimicrobiana adequada a cada caso específico, uma vez que na presença de uma ESBL, as opções terapêuticas reduzem-se à utilização de carbapenemos, antibióticos não- β -lactâmicos ou inibidores das β -lactamases (67). No entanto, a identificação das β -lactamases é um processo complexo, muitas vezes sujeito a erros de interpretação, que acontecem, sobretudo, na avaliação fenotípica da ação de um inibidor, como o ácido clavulânico (67). A presença de mais que um tipo de β -lactamases pode causar interferência negativa no resultado do teste, pois diferentes enzimas apresentam diferentes susceptibilidades aos inibidores (67).

Existem dois grandes grupos de métodos de deteção laboratorial de estirpes produtoras de ESBL: os métodos fenotípicos e os métodos genotípicos (68). A grande diferença entre estes dois grupos reside no facto dos métodos genotípicos pressuporem uma análise por biologia molecular que permite identificar especificamente o tipo de enzima presente, ao contrário dos métodos fenotípicos, em que o resultado apenas permite afirmar a presença ou ausência de uma ESBL (68,69). Nos laboratórios clínicos os métodos fenotípicos são os mais utilizados, por serem mais fáceis de aplicar, terem um menor custo e estarem já incorporados nos sistemas automatizados, tornando-os mais acessíveis (69). Os métodos genotípicos são mais comumente aplicados em laboratórios de investigação, para identificação do gene responsável pela produção de determinada ESBL (69).

4.1. Métodos fenotípicos

Dada a relevância clínica das estirpes produtoras de ESBL, o NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) criou guias de referência específicos para a deteção fenotípica destas enzimas (12). Estes guias têm por base o princípio de que as ESBL hidrolisam cefalosporinas de largo-espectro e são inibidas pelo ácido clavulânico (12,69). Existem quatro métodos fenotípicos principais para identificação de estirpes produtoras de ESBL.

O método qualitativo E-Test é um método simples para a pesquisa de ESBLs e consiste numa tira de plástico que contém, num dos lados, um gradiente de concentração constante de uma cefalosporina (ceftazidima 0,5-32 µg/ml ou cefotaxima 0,25-16µg/ml) e do outro lado a mesma cefalosporina associada ao ácido clavulânico (12,66). Esta tira é colocada numa placa com meio Mueller-Hinton, semeada com a estirpe em estudo (62,70). Uma redução de ≥ 3 diluições na concentração mínima inibitória (MIC) da cefalosporina na presença de ácido clavulânico em comparação com a MIC da cefalosporina isolada é considerado um resultado positivo, sendo a estirpe em causa produtora de uma ESBL (12). O método E-Test apresenta uma sensibilidade que varia entre os 87 e os 100% e uma especificidade superior a 95% (62).

Outro dos métodos fenotípicos disponíveis para a deteção de ESBL é o método da dupla difusão (12,62). A interpretação deste teste é feita tendo em conta fenómenos de sinergismo, isto é, a estirpe considera-se produtora de uma ESBL quando se verifica um aumento do halo de inibição da cefalosporina em direção ao disco de amoxicilina/ácido clavulânico (70). Este método é o mais utilizado na prática clínica e apresenta taxas de sensibilidade entre os 79 e 97% e especificidade superior a 94% (62).

Um outro método utilizado consiste na adição de ácido clavulânico a um disco de ceftazidima. Neste método são utilizados dois discos de antibiótico: um com ceftazidima e outro com ceftazidima/ácido clavulânico (70). A bactéria é considerada produtora de ESBL se o raio do halo de inibição em torno do disco de ceftazidima/ácido clavulânico for no mínimo 5mm superior ao raio do halo de inibição em torno do disco da cefalosporina isolada (70).

Por fim, faltam apenas referir os métodos de deteção automatizados. Os sistemas comerciais automatizados Vitek® (BioMérieux) e MicroScan® (Dade Behring) incorporaram nos seus sistemas painéis de microdiluição que permitem testar a presença de ESBL (12,62,70). Estes testes utilizam cefalosporinas e cefalosporinas em associação com ácido clavulânico e, por fórmulas matemáticas, é possível determinar se a estirpe em estudo é ou não produtora de ESBL (12). Este teste apresenta sensibilidade e especificidade superiores a 90% (62). A grande vantagem deste método é a rapidez, uma vez que os resultados podem ser dados com apenas 4 a 5h de incubação, contrariamente ao que acontece com os métodos de difusão em disco, que necessitam de um mínimo de 18h de incubação (62,70). Por outro lado, em certos microorganismos esta diminuição do tempo de incubação torna-se uma desvantagem deste método, uma vez que bactérias do género *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp. ou *Yersinia* spp. não crescem suficientemente neste período (70).

5. Epidemiologia de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL

A dificuldade em detetar eficazmente todas as estirpes produtoras de ESBL torna, por vezes, difícil determinar a verdadeira prevalência destas isolados (63,71). No entanto sabe-se que os organismos produtores de ESBLs estão distribuídos por todo o mundo, com incidência crescente (63). O primeiro isolado produtor de ESBL foi descrito na Alemanha, em 1983 e, desde esse ano que a disseminação a outros países não tem parado de aumentar (62,63). Até ao início da década de 2000, as espécies produtoras de ESBL eram isoladas essencialmente de pacientes hospitalizados (72). No entanto, nos últimos anos vários estudos têm demonstrado que infeções causadas por estirpes produtoras de ESBLs são cada vez mais comuns em pacientes vindos da comunidade, nomeadamente estirpes de *E. coli* (revisto em (72)). Estes dados mostram que existem, fora do ambiente hospitalar, grandes reservatórios destes microorganismos, nomeadamente em lares de idosos (72,73). O primeiro caso reportado de uma estirpe produtora de ESBL vindo da comunidade aconteceu em 1998, na Irlanda, numa paciente idosa que, apesar de não ter histórico de internamento, tinha estado sujeita a vários tratamentos com antibióticos (74).

Até ao final dos anos 90, a maioria dos microorganismos produtores de ESBLs expressava enzimas do tipo TEM ou SHV (73). Porém, nos últimos anos, a situação tem-se alterado e atualmente os microorganismos produtores de enzimas do tipo CTX-M são os mais prevalentes, isolados maioritariamente em *E. coli* e *K. pneumoniae* de pacientes vindos da comunidade, com ITUs, particularmente na Europa e América do Sul (69,73). Um estudo levado a cabo em 2002, em Espanha, demonstrou que o gene *bla*_{CTX-M-14} pode ser responsável pela expressão desta enzima nos pacientes não hospitalizados (74). Atualmente, na Europa, a enzima do tipo CTX-M mais prevalente em pacientes vindos da comunidade é a CTX-M-15, que foi descrita pela primeira vez na Índia, em 2001, mas depressa se espalhou um pouco por todo o mundo, nomeadamente a países do sul da Europa, como Portugal, Espanha e Itália (64,73,75).

Apesar das espécies produtoras de ESBLs estarem distribuídas por todo o mundo, existem subtipos de ESBLs que parecem ser específicas de uma dada região (63). Como exemplo veja-se a TEM-10 que foi, desde a sua descoberta em 1988, responsável por vários surtos nos EUA, mas só no início da década de 2000 começou a ser frequentemente identificada na Europa (62,63). Na América do Sul, os surtos provocados por estirpes produtoras de ESBL apresentam maioritariamente enzimas do tipo CTX-M, sendo raros os casos reportados de enzimas TEM ou SHV nesta região (62). Nestes países, a percentagem de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL pode, em muitos casos chegar aos 60% (62).

Na Europa, a prevalência de isolados produtores de ESBLs entre as espécies da família das *Enterobacteriaceae* apresenta grandes variações de país para país (62,63). Como exemplo temos a Holanda, em que a percentagem de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBL ronda os 1% e a França, que chegou a registar valores na ordem dos 40% para *K. pneumoniae*, antes da implementação de rigorosas políticas de controlo de infeção (62). Contrariamente ao que acontece na Europa, os países asiáticos apresentam menores taxas de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs (63). No Japão, um estudo mostrou que a percentagem destes isolados varia entre os 0,1% para *E. coli* e 0,3% para *K. pneumoniae* (63). Estes valores podem chegar aos 12%, em Hong Kong, mas são, mesmo assim, significativamente inferiores aos reportados na Europa (63).

Portugal é um dos países da Europa com maior taxa de produtores de ESBLs (71). Em 2012, segundo dados do Sistema de Vigilância Europeu de Resistência Antimicrobiana do Centro Europeu para o Controlo e Prevenção de Doenças, a percentagem de *E. coli* resistentes às cefalosporinas de espetro estendido fixou-se nos 13,5%, sendo superior aos valores registados em 2010 e 2011 (76). Desta percentagem de isolados, 95,9% confirmaram-se produtores de ESBL (76). Já a percentagem de *K. pneumoniae* resistentes às cefalosporinas de espetro estendido fixou-se em 2012, segundo o mesmo estudo, nos 38,7% e destas 94,9% confirmaram-se produtoras de ESBL (76). Estes valores elevados, quer em Portugal, quer no resto do mundo, podem ser explicados por diversos fatores (62,63). Entre eles destacam-se o tempo de internamento do doente, assim como o uso de ventiladores mecânicos ou cateteres e problemas renais (62,63). Por outro lado, as fracas políticas de controlo de administração de antibióticos, com uso indiscriminado de cefalosporinas de largo-espetro, contribuem também para aumentar a pressão seletiva no universo bacteriano, aumentando o número de estirpes portadoras de genes que codificam para as ESBL, com aumento também da taxa de disseminação por transferência horizontal de genes entre espécies (62,63). Assim, é importante não só a existência de uma política rigorosa de controlo da administração de antibióticos para diminuir a pressão seletiva dos microorganismos mas também adotar medidas laboratoriais que permitam a rápida e eficaz deteção destas enzimas de forma a administrar as terapias antimicrobianas adequada e atempadamente (57).

III. OBJETIVOS

Objetivos

Tendo em conta o impacto clínico das estirpes produtoras de β -lactamases, nomeadamente de ESBL e considerando a crescente necessidade de obtenção de resultados com elevado grau de confiança no menor tempo possível que permitam um tratamento mais direcionado, esta tese tem quatro objetivos essenciais:

- i) A otimização de uma base de dados relativa a doentes com exames microbiológicos positivos;
- ii) Inferir na epidemiologia de bactérias multirresistentes no Centro Hospitalar do Baixo Vouga;
- iii) Inferir sobre a disseminação de ESBLs em isolados causadores de Infecções de Trato Urinário;

IV. MATERIAL E MÉTODOS

1. Caracterização do Hospital Infante D. Pedro

O presente trabalho foi realizado no serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. – Hospital Infante D. Pedro (HIP), no laboratório de microbiologia. O HIP é uma das três unidades hospitalares que compõem o Centro Hospitalar do Baixo Vouga (CHBV) e apresenta vários serviços clínicos e valências de internamento, nomeadamente Medicina Interna, Cirurgia Geral, Ortopedia, Pediatria, Urologia, Infeciologia, Cardiologia, Pneumologia e Obstetrícia e Ginecologia. O serviço de urgência deste hospital engloba também várias especialidades médico-cirúrgicas, incluindo a Patologia Clínica.

O serviço de Patologia Clínica é composto pelos setores de hematologia e coagulação, bioquímica geral, imunoquímica (inclui hormonologia, alergologia e autoimunidade) e microbiologia geral (inclui micobacteriologia, serologia e biologia molecular). Este serviço funciona 24 horas por dia, dando apoio às valências de internamento, consulta externa, bloco operatório, cirurgia em ambulatório, hospital de dia e serviço de urgência.

Neste estudo foram recolhidos os dados demográficos dos pacientes que deram entrada no HIP entre Janeiro e Dezembro de 2013 com pedidos de exame bacteriológico de urina. Estes dados foram inseridos numa base de dados de vigilância epidemiológica de pacientes do CHBV, onde são inseridos diversos dados. O laboratório de microbiologia é responsável pelo preenchimento de dados demográficos do paciente, como nome, sexo, data de nascimento, números de processo e episódio e serviço requisitante. Os dados microbiológicos são também preenchidos pelo laboratório e incluem o produto biológico, microorganismo, números da amostra e do exame, data do pedido e informação sobre produção de β -lactamases e multirresistência. Nesta base de dados estão ainda incluídos dados relativos ao internamento do paciente e antibioterapia, cujo preenchimento está a cargo da Comissão de Controlo de Infeção do CHBV (Anexo I).

2. Amostra

Para o presente estudo foram selecionados microorganismos presentes em amostras de urina recebidas no laboratório de microbiologia do serviço de Patologia Clínica do HIP entre os dias 1 de Janeiro e 31 de Dezembro de 2013, de acordo com os seguintes critérios: diagnóstico primário de ITU em paciente com idade igual ou superior a 65 anos proveniente unicamente do serviço de urgência, tendo sido excluídos os duplicados. A identificação e o perfil de suscetibilidade a antibióticos dos isolados foi realizada utilizando o sistema de deteção automático VITEK[®]2, configurado de acordo

com a *guideline* do *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI e pelo *software* VITEK®2 AES (*Advanced Expert System*) (BioMérieux, Marcy L'Étoile, França).

As cartas utilizadas para a identificação de microorganismos Gram-negativos (GNI) e para o estudo do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos (AST-N192 e AST-N222) encontram-se em anexo (anexos III, IV e V respetivamente). As espécies de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foram estudadas para a deteção de ESBL. A confirmação da produção de ESBL por estas espécies bacterianas foi efetuada com recurso ao método E-test (AB BioMérieux) com tiras de cefotaxima/cefotaxima + ácido clavulânico e ceftazidima/ceftazidima + ácido clavulânico, de acordo com as instruções do fabricante.

No período do estudo foram recebidas no laboratório de microbiologia 2075 pedidos de exames bacteriológicos de urina. Destas, 540 foram incluídas no presente estudo, por se encontrarem de acordo com os critérios pré-estabelecidos.

2.1. Urocultura e identificação bacteriana

Ao darem entrada no serviço de Patologia Clínica do HIP, as amostras de urina passam pela zona de triagem e são imediatamente encaminhadas ao laboratório de microbiologia. Aqui, as amostras são semeadas em meios de cultura selecionados, de acordo com as normas do serviço, e incubadas a 35°C durante 18-24h. A urocultura é realizada em meio agar CLED (do inglês *Cystine Lactose Electrolyte Deficient*), específico para as urinas e que permite o crescimento de microorganismos aeróbios e microaerofílicos. Sendo um meio com elevada quantidade de substâncias nutritivas e por não possuir substâncias inibidoras, o agar CLED é considerado o meio de cultura universal para urina. Este meio é não seletivo mas diferencial, permitindo boa diferenciação entre as bactérias fermentadoras de lactose (colónias de cor amarela) e bactérias não fermentadoras (colónias de cor azul). Devido ao défice de eletrólitos este meio limita a proliferação de espécies de *Proteus*, evitando o *swarming* característico destas bactérias.

A identificação bacteriana dos isolados é efetuada tendo em conta as características morfológicas das colónias, o exame direto através da coloração de Gram, segundo o protocolo descrito no anexo II, e a carta de identificação VITEK®2 de Gram-negativos. De salientar que, tal como referido no capítulo *II.1. Infecções do trato urinário*, a identificação bacteriana e o respetivo TSA só são realizados quando se verifica uma bacteriúria significativa por uma estirpe, de acordo com a Tabela 5. Nos restantes casos, o crescimento bacteriano é desvalorizado. Para a identificação, a coloração de Gram é o primeiro passo a ser efetuado uma vez que permite a diferenciação das bactérias

quanto à forma, em bacilos ou cocos, e quanto à estrutura da membrana e parede celular, em bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas. O resultado da coloração de Gram permite a escolha e utilização de um tipo de carta de identificação VITEK[®]2.

A identificação da espécie bacteriana e respetivo TSA são feitos com recurso aos equipamentos da gama VITEK[®] (BioMérieux, Marcy L'Étoile, França), que são sistemas automatizados onde os inóculos são incubados em cartas de identificação criadas para o efeito. A carta de identificação GNI é utilizada com o sistema VITEK[®] para identificação de microorganismos da família *Enterobacteriaceae* e um grupo selecionado de microorganismos Gram-negativos não fermentadores da glucose e possui vários poços com agentes bioquímicos, além de um poço de controlo de crescimento. O tempo de incubação no sistema VITEK[®] até à obtenção de uma identificação varia entre as 18 e as 24h.

Tabela 5: Avaliação do crescimento bacteriano em urocultura (adaptado de (8)).

	Número de colónias	CFU/mL de urina
Bacteriúria não significativa	<10	<10 ⁴
Bacteriúria duvidosa	10-100	≥10 ⁴ e <10 ⁵
Bacteriúria significativa	≥100	≥10 ⁵

2.2. Testes de suscetibilidade aos antibióticos (TSA)

Segundo as normas do laboratório, o TSA é realizado para os microorganismos que são responsáveis por um processo infeccioso e, como tal, justificam a administração de uma terapia antimicrobiana. O TSA baseia-se na determinação da CMI de diferentes antibióticos, cada um deles em concentrações derivadas de diluições duplas sucessivas e é realizado com o apoio do equipamento VITEK[®]2, como ilustrado na Figura 4 (77). Cada carta de suscetibilidade (AST) contém 64 micropoços com antibióticos selecionados em concentrações variadas, liofilizados, pré-medidos e pesados individualmente, conjugados com meios de cultura microbianos. Em todas as cartas existe um poço de controlo, que não contém nenhum agente antimicrobiano, que permite garantir o crescimento do microorganismo. O inóculo que é realizado pelo técnico para identificação do microorganismo é suficiente para a realização do antibiograma, e deve ter uma densidade, na escala de MacFarland, que varie entre os 0,5 e 0,65 para bactérias e entre 1,80 e 2,20 para fungos.

A determinação da CMI de cada um dos antibióticos testados é realizada pelo aparelho por monitorização do crescimento em cada um dos poços da carta durante um

período de tempo que pode chegar às 18h, no caso das bactérias. Por medição da intensidade da luz de cada poço que chega ao leitor ótico o sistema determina qual o poço que apresenta crescimento do microorganismo e, no final do tempo de incubação, é reportado um resultado interpretativo para cada agente antimicrobiano (Sensível, Intermédio ou Resistente), assim como o valor da CMI, de acordo com as normas do CLSI.



Figura 4: Diferentes etapas do método automático VITEK[®]2 (adaptado de (77)).

2.3. Teste VITEK[®]2 para detecção de ESBL

A carta AST-N192, utilizada para bactérias Gram-negativas tem incorporado um teste para detecção de ESBL, denominado teste VITEK[®]2 ESBL (BioMérieux, Marcy-L'Etoile, França). Este teste é constituído pelos seguintes antibióticos: cefepime (1 µg/mL), cefotaxima (0,5 µg/mL), ceftazidima (0,5 µg/mL) e por associações destas cefalosporinas com ácido clavulânico, com as concentrações de 1/10 µg/mL, 0,5/4 µg/mL e 0,5/4 µg/mL, respetivamente. A suspensão contendo o microorganismo em estudo foi diluída numa concentração padronizada em 0,45% de solução salina antes de ser introduzida na carta. Tal como acontece no TSA, o aparelho monitoriza o crescimento em cada um dos poços da carta durante um período de tempo definido, findo qual os resultados do teste são determinados para cada antibiótico contido na carta. O resultado é considerado positivo quando nos poços que contêm cefalosporinas associadas ao ácido clavulânico se verifica uma redução do crescimento bacteriano, em relação aos poços que contêm a cefalosporina sem inibidor das β-lactamases.

2.4. Método quantitativo E-test

Todas as estirpes identificadas pelo método descrito anteriormente como produtoras de ESBL foram sujeitas ao método quantitativo E-test para confirmação. A suspensão bacteriana de densidade 0,5 MacFarland foi semeada em meio de Müller-Hinton, com zaragatoa em três planos diferentes. As tiras E-test (AB BioMérieux) utilizadas contêm uma combinação de uma cefalosporina e da mesma cefalosporina associada ao ácido clavulânico: cefotaxima/cefotaxima + ácido clavulânico (CT/CTL) ou ceftazidima/ceftazidima + ácido clavulânico (TZ/TZL) (Figura 5). Estas tiras contêm um gradiente de concentração da cefalosporina (numa das extremidades) e da mesma cefalosporina associada ao ácido clavulânico (na outra extremidade). Estas tiras de plástico são aplicadas no meio inoculado com a suspensão bacteriana, com o auxílio de uma pinça, lado a lado, como ilustrado na Figura 5, sendo a placa incubada durante 18 a 24 horas, a uma temperatura que pode variar entre os 35 e os 37°C.

Quando a razão CT/CTL ou TZ/TZL é superior a 8 o resultado é considerado positivo. Pelo contrário, quando as razões CT/CTL e TZ/TZL são ambas inferiores a 8 o resultado é considerado negativo. Se não for possível estabelecer uma CMI para a cefalosporina ou para a cefalosporina + ácido clavulânico, o resultado é não determinado, como é possível verificar na Tabela 6. Para garantir a viabilidade do teste foram testadas duas estirpes de referência ATCC (*American Type Culture Collection*): *Escherichia coli* ATCC 25922 (ESBL-negativa) e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL-positiva) e os resultados dos testes às estirpes em estudo só foram aceites quando o resultado do controlo de qualidade se encontrava dentro dos limites aceitáveis, de acordo com os critérios definidos pelo CLSI.

3. Tratamento estatístico

Os resultados foram analisados com recurso ao *software* Microsoft Office Excel 2013®, Microsoft Corporation®. Para análise estatística foi utilizada estatística descritiva simples, como a média, desvio padrão e frequências. No decurso deste trabalho foram ainda utilizados o *software* VITEK®2 *Advanced Expert System* (BioMérieux, Marcy-L'Etoile, França) e o sistema informático *Appolo*, para gestão laboratorial do serviço de Patologia Clínica do HIP, que permite a consulta do histórico de dados microbiológicos, a realização de estatísticas diversas e a gestão de pacientes e requisições.

V. RESULTADOS

1. Caracterização da amostra

No presente trabalho foram estudadas 540 amostras de urina, selecionadas de acordo com os critérios pré-estabelecidos. Todos os resultados dos exames bacteriológicos dos pacientes estudados se encontram na base de dados de vigilância epidemiológica do HIP, permitindo assim a consulta e monitorização dos doentes ao longo do tempo.

Dos 540 pacientes estudados, 60,4% (n=326) são do sexo feminino e apenas 39,6% (n=214) são do sexo masculino. A maioria dos pacientes apresentava, à data de admissão, idades compreendidas entre os 75 e 84 anos (47,4%, n=256) e entre os 85 e os 94 anos (33,7%, n=182). Apenas 16,3% (n=88) dos pacientes tinha idades compreendidas entre 65 e 74 anos e 2,6% (n=14) dos pacientes apresentavam 95 anos ou mais, como se pode extrapolar da Figura 6. A média de idades fixou-se nos 81,5 anos, com um desvio padrão de 7,2 anos ($81,5 \pm 7,2$). A distribuição de idades por género mostra que em todas as faixas etárias existe um predomínio de isolados provenientes de indivíduos do sexo feminino, sendo este mais acentuado na faixa etária entre os 85 e os 94 anos onde apenas 33,0% (n=60) do total de isolados recolhidos nesta faixa etária (n=182) pertencem a indivíduos do sexo masculino. Apesar disto não se verificaram diferenças significativas na média de idades dos pacientes masculinos e femininos.

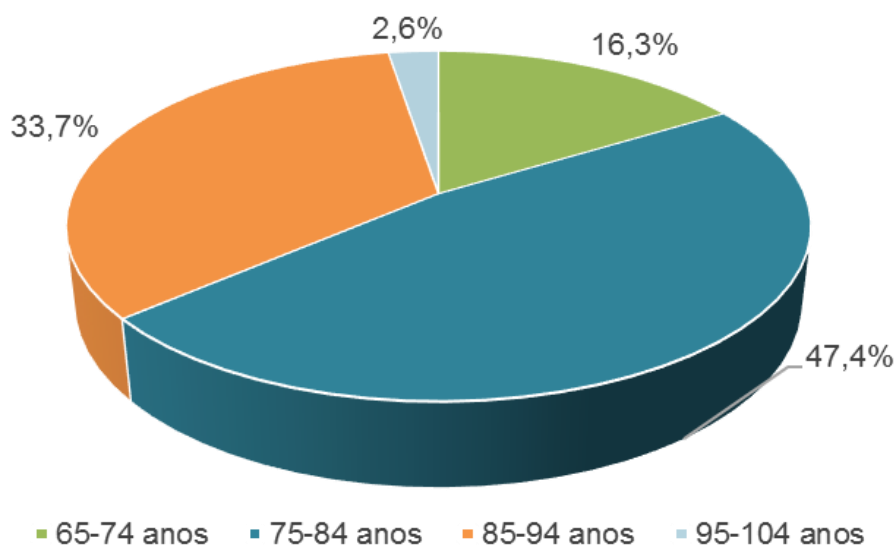


Figura 6: Distribuição dos pacientes por faixa etária.

2. Caracterização dos isolados microbianos

Das 540 amostras de urina analisadas, os isolados mais prevalentes foram bactérias Gram-negativas, representando esta classe 88,7% do total de isolados (n=479). Apenas foram isoladas 29 bactérias Gram-positivas (5,4%) e 32 fungos (5,9%), como se pode ver na Figura 7.

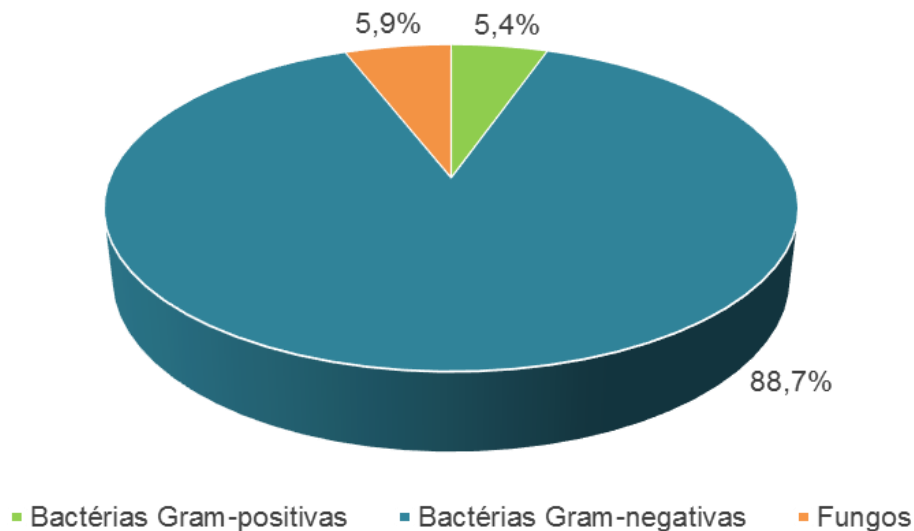


Figura 7: Incidência dos isolados clínicos.

Nas amostras de urina estudadas foram encontradas um total de 24 espécies diferentes, entre bactérias e fungos. De entre os isolados Gram-positivos, a espécie mais frequente foi *Enterococcus faecalis* (n=17), representando 58,6% do total de bactérias Gram-positivas. De entre os fungos, a espécie mais prevalente foi a *Candida albicans* (n=20), perfazendo 62,5% do total de fungos. Entre as bactérias Gram-negativas, as espécies mais isoladas pertencem à família *Enterobacteriaceae* (n=403), sendo as espécies mais frequentes *E. coli*, que perfaz 51,4% (n=246) do total de bactérias Gram-negativas, *K. pneumoniae*, com 20,9% (n=100) e *P. mirabilis*, num total de 6,4% (n=31). Entre as bactérias Gram-negativas não pertencentes à família *Enterobacteriaceae* destaca-se a *P. aeruginosa*, com 11,7% (n=56) dos isolados. Na Figura 8 é possível analisar a distribuição percentual de isolados Gram-negativos. Neste gráfico, a parcela “Outros” representa o conjunto dos isolados que, individualmente, contribuíram com menos de 5% para o total de bactérias Gram-negativas, sendo eles: *Acinetobacter baumannii* (2,3%, n=11), *Citrobacter freundii* (0,8%, n=4), *Citrobacter koseri* (0,2%, n=1), *Enterobacter aerogenes* (0,2%, n=1), *Enterobacter cloacae* (0,6%, n=3), *K. oxytoca* (0,8%, n=4), *Morganella morganii* (1,9%, n=9), *Providencia stuartii* (2,3%, n=11), *Salmonella* grupo D (0,2%, n=1) e *Serratia liquefaciens* (0,2%, n=1).

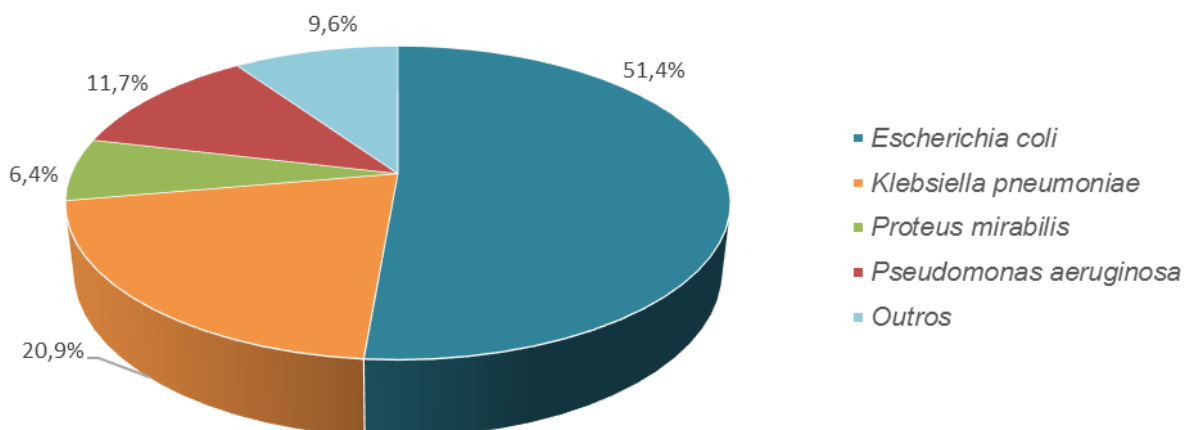


Figura 8: Incidência das principais bactérias Gram-negativas.

De todos os isolados Gram-negativos estudados, apenas em três espécies se verificou a produção de ESBL, num total de 73 estirpes: *E. coli*, com 13,4% (n=33) dos isolados a produzir ESBL, *K. oxytoca*, com 25% (n=1) e *K. pneumoniae*, em que 39% (n=39) dos isolados se verificaram ser produtores de ESBL. Para este estudo foram apenas analisadas as estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* dada a sua maior prevalência nas ITUs (Figura 9).

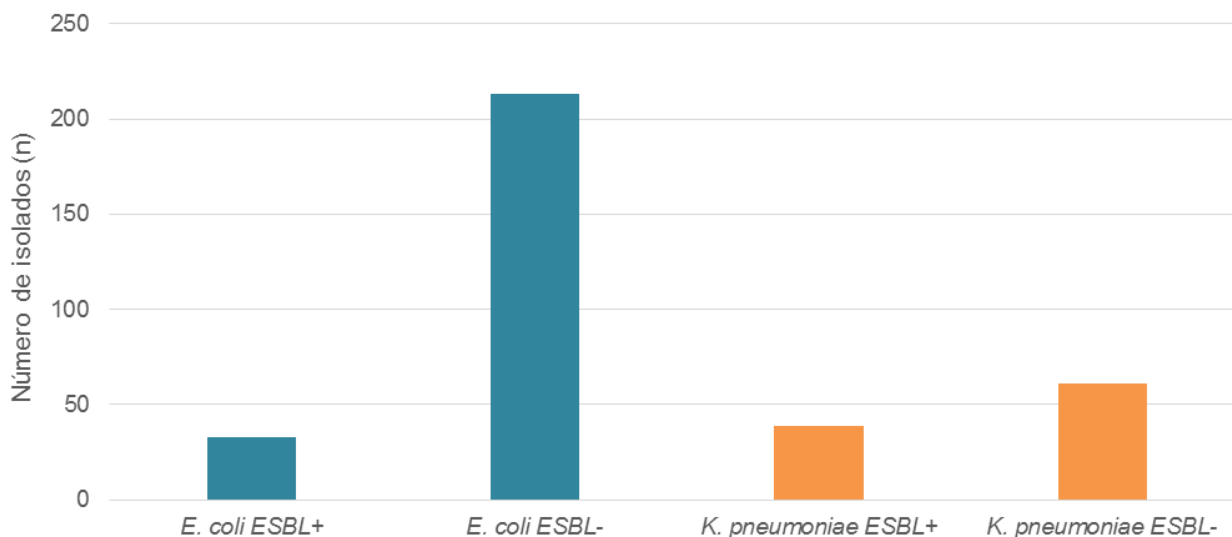


Figura 9: Número de isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores e não produtores de ESBL.

Se analisarmos a distribuição das estirpes produtoras de ESBL por género, verifica-se que 62,5% (n=45) do total de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBL foram isoladas de pacientes do sexo feminino e apenas 37,5% (n=27) no sexo masculino, sendo estes valores significativamente diferentes. Relativamente à distribuição destes isolados por faixa etária, é possível dizer que é entre os 85 e os 94 anos que se encontra a maior percentagem de bactérias produtoras de ESBL (23,1%, n=15 para a *E. coli* e 26,2%, n=17 para *K. pneumoniae*). Fazendo a distinção também por género (Figura 10), tanto em *E. coli* como em *K. pneumoniae* o maior número de isolados ESBL-positivos no sexo feminino é encontrado em pacientes com idades compreendidas entre os 85 e os 94 anos e no sexo masculino entre os 75 e os 84 anos.

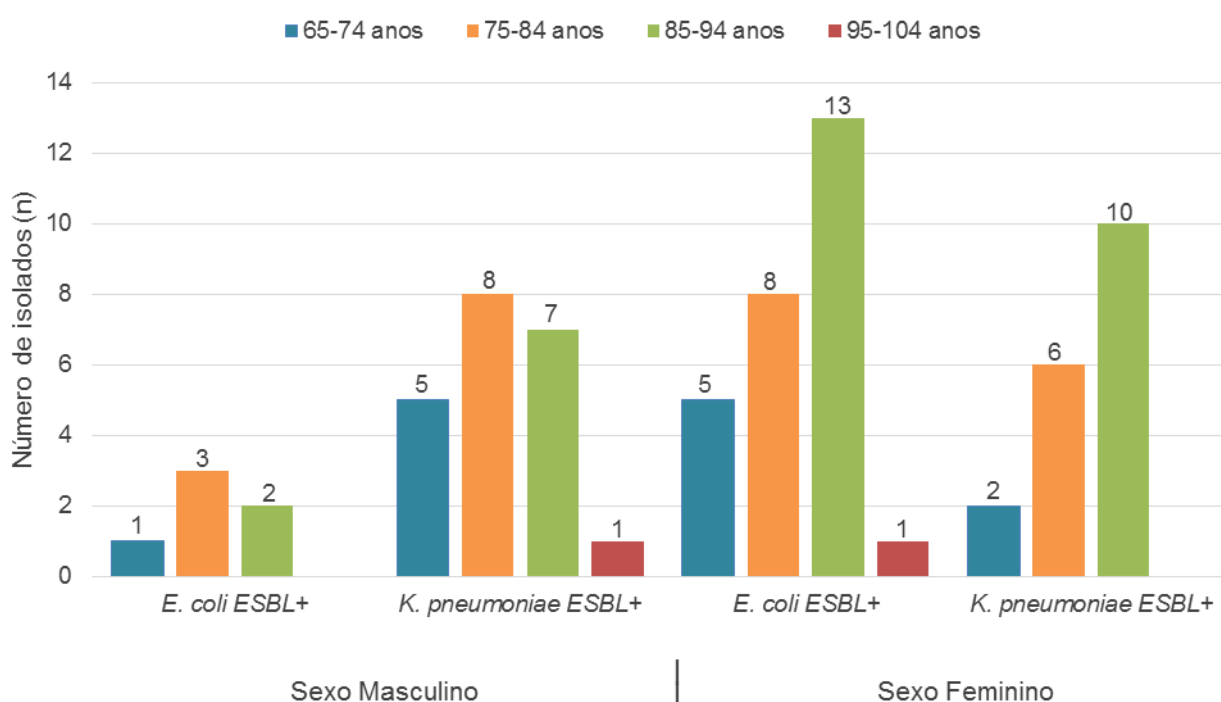


Figura 10: Número de isolados produtores de ESBL por género e por faixa etária.

3. Perfil de resistência aos antibióticos

O TSA realizado pelo método automático VITEK®2 utiliza cartas AST que testam uma variada gama de agentes antimicrobianos, que diferem dependendo se estamos perante uma bactéria Gram-negativa, Gram-positiva ou de fungos. Neste estudo, todos os fungos analisados (n=32) revelaram-se sensíveis a todos os antibióticos testados. As bactérias Gram-positivas (n=29) apresentaram altas taxas de resistência à eritromicina (93,1%) e à clindamicina (89,7%). Contra esta família de bactérias, os TSAs realizados mostraram que os fármacos com menores taxas de resistência são a ciprofloxacina, a daptomicina, fosfomicina, mupirocina, penicilina-G e tigeciclina, com 0% de taxa de

resistência nos organismos estudados, e ainda a vancomicina, teicoplanina e a nitrofurantoína, todos com taxas de resistência inferiores a 10%.

De entre os antibióticos testados contra bactérias Gram-negativas (n=479), aqueles a que estes microorganismos apresentam mais altas taxas de resistência são, como se pode verificar na Figura 11, a ampicilina (59,1%), ciprofloxacina (49,7%), cefalotina (47,8%), cotrimoxazol (45,9%), levofloxacina (39,9%), amoxicilina/ácido clavulânico (35,3%), cefuroxima-axetil (34,7%) e a nitrofurantoína (34,4%). Em contrapartida, nenhum dos microorganismos estudados mostrou resistência contra a tigeciclina e apenas 1 (0,2%) apresentou resistência à colistina. Os carbapenemos revelaram também elevada taxa de sucesso, sendo que as resistências aos antibióticos desta subclasse (ertapenem, meropenem e imipenem) fixaram-se abaixo dos 10% (1,3%, 8,6% e 8,4%, respetivamente) (Figura 11). Dos 479 microorganismos Gram-negativos, 83 revelaram-se sensíveis a todos os antibióticos testados, todos eles da espécie *E. coli*.

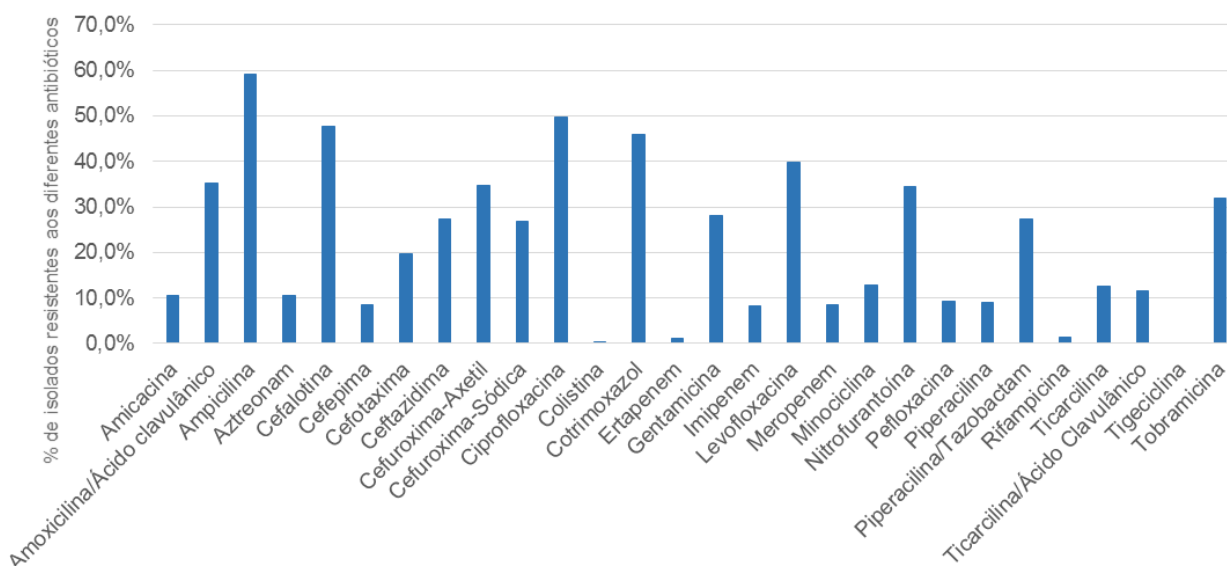


Figura 11: Taxas de resistência aos antibióticos entre as bactérias Gram-negativas.

Como já referido anteriormente, dada a sua alta taxa de prevalência nas ITUs, *E. coli* e *K. pneumoniae* serão analisadas detalhadamente no decorrer deste trabalho. Do total de 246 *E. coli* importa distinguir, para efeito do perfil de resistências, aquelas que são produtoras de ESBL das não produtoras. As estirpes não produtoras deste tipo de β -lactamases (n=213) apresentam taxas de resistência abaixo dos 50% para qualquer um dos antibióticos testados, sendo os valores mais elevados registados para a ampicilina (45,1%), cefalotina (39,9%), ciprofloxacina (25,4%), cotrimoxazol (25,4%) e levofloxacina (24,9%). Estes isolados revelaram 0,0% de resistência à tigeciclina,

ticarcilina, ticarcilina/ácido clavulânico, rifampicina, piperacilina, minociclina, colistina, cefepime, aztreonam e ainda aos carbapenemos (ertapenem, meropenem e imipenem), como é possível ver na Figura 12. As taxas de resistência aumentam drasticamente nos isolados produtores de ESBL (n=33), verificando-se 100% de resistência à cefalotina, cefuroxima-axetil e cefuroxima-sódica, 97% de resistência à ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacina e levofloxacina, 87,9% de resistência na associação de amoxicilina e ácido clavulânico e o mesmo valor para a ceftazidima (Figura 12). Nestes isolados, os antibióticos com menores taxas de resistência são, um pouco à semelhança do que acontece nos isolados não produtores de ESBL, a tigeciclina, ticarcilina, ticarcilina/ácido clavulânico, rifampicina, piperacilina, minociclina, colistina, cefepime, aztreonam, pefloxacina e ainda aos carbapenemos (ertapenem, meropenem e imipenem), como se pode comprovar pela Figura 12.

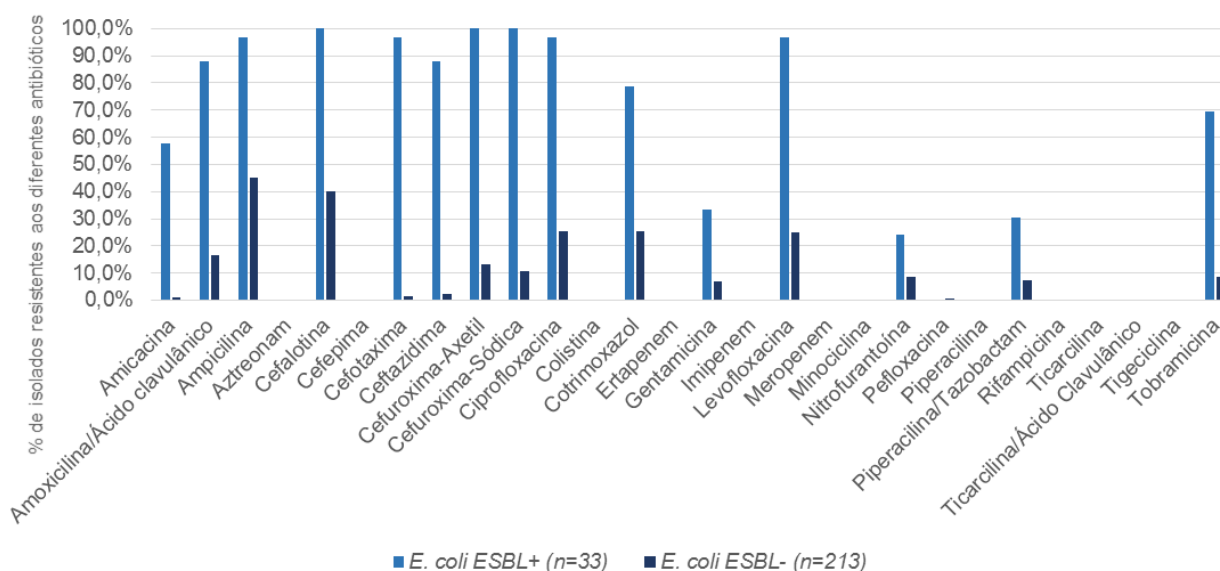


Figura 12: Taxas de resistência dos isolados de *E. coli*, produtores e não produtores de β -lactamases, aos antibióticos testados.

Dos 100 isolados de *K. pneumoniae* recolhidos durante o período de estudo verifica-se que, à semelhança do que acontece com as estirpes de *E. coli*, as taxas de resistência aos antibióticos testados são superiores nos isolados produtores de ESBL (n=39) em relação aos não produtores (n=61) (Figura 13). No entanto, esta relação não se verifica para a ampicilina, em que em ambos os casos, e como esperado, 100% dos isolados são resistentes ao antibiótico, uma vez que esta espécie possui uma β -lactamase cromossomal que lhe confere resistência natural à ampicilina (79). Nos isolados não produtores de ESBL as maiores taxas de resistência verificam-se para a ampicilina (100%), nitrofurantoina (78,7%), ciprofloxacina (55,7%), levofloxacina (54,1%), tobramicina (49,2%), cefalotina (44,3%), cefuroxima-axetil (42,6%),

cotrimoxazol (41,0%) e gentamicina (41,0%). Nestas estirpes os antibióticos que apresentaram os melhores resultados foram a tigeciclina, com 0% de resistência, aztreonam, cefepime, colistina, imipenem, meropenem, minociclina, pefloxacina, piperacilina, rifampicina, ticarcilina e ticarcilina/ácido clavulânico, todos com resistências fixadas em 1,6%, como é possível extrapolar da Figura 13. Já nos isolados produtores de ESBL as maiores taxas de resistência observaram-se nas cefalosporinas, com exceção do cefepime, ao qual nenhum isolado apresenta resistência. As restantes cefalosporinas apresentam taxas que variam entre os 94,9% para a ceftazidima e os 100% para a cefalotina (97,4% para a cefuroxima-axetil, cefuroxima-sódica e cefotaxima) (Figura 13). Além das cefalosporinas, as estirpes produtoras de ESBL apresentam altas taxas de resistência à levofloxacina (92,3%), amoxicilina/ácido clavulânico (89,7%), nitrofurantoína (87,2%) e tobramicina (82,1%). As menores taxas de resistência verificam-se para a amicacina (2,6%), ertapenem (7,7%), aztreonam, cefepime, colistina, imipenem, meropenem, minociclina, pefloxacina, piperacilina, rifampicina, ticarcilina, ticarcilina/ácido clavulânico e tigeciclina, todos estes com 0,0% de resistência (Figura 13).

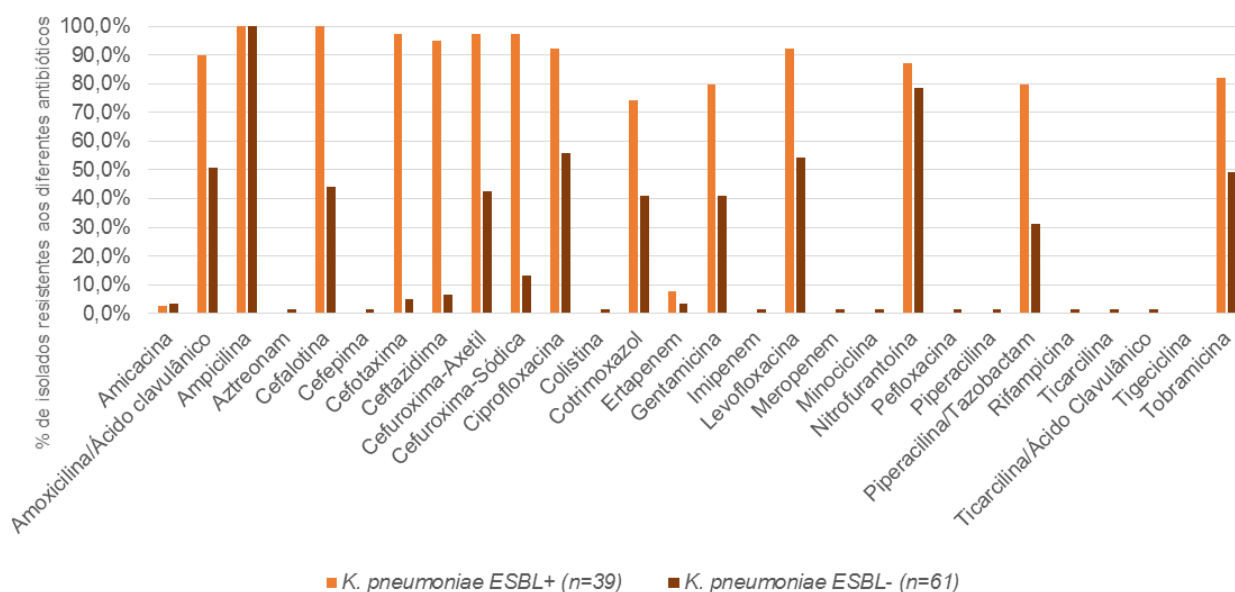


Figura 13: Taxas de resistência dos isolados de *K. pneumoniae*, produtores e não produtores de β -lactamases, aos antibióticos testados.

Se compararmos o perfil de resistências entre as estirpes de *E. coli* e de *K. pneumoniae* (Figura 14 e Figura 15) verificamos que, nos isolados não produtores de ESBL (Figura 14), as taxas de resistência de *K. pneumoniae* são superiores às de *E. coli* para todos os antibióticos testados, sendo as diferenças mais notórias verificadas para a amicacina, associação amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, cefuroxima-axetil, ciprofloxacina, gentamicina, levofloxacina, nitrofurantoína, piperacilina/tazobactam e tobramicina (Figura 14).

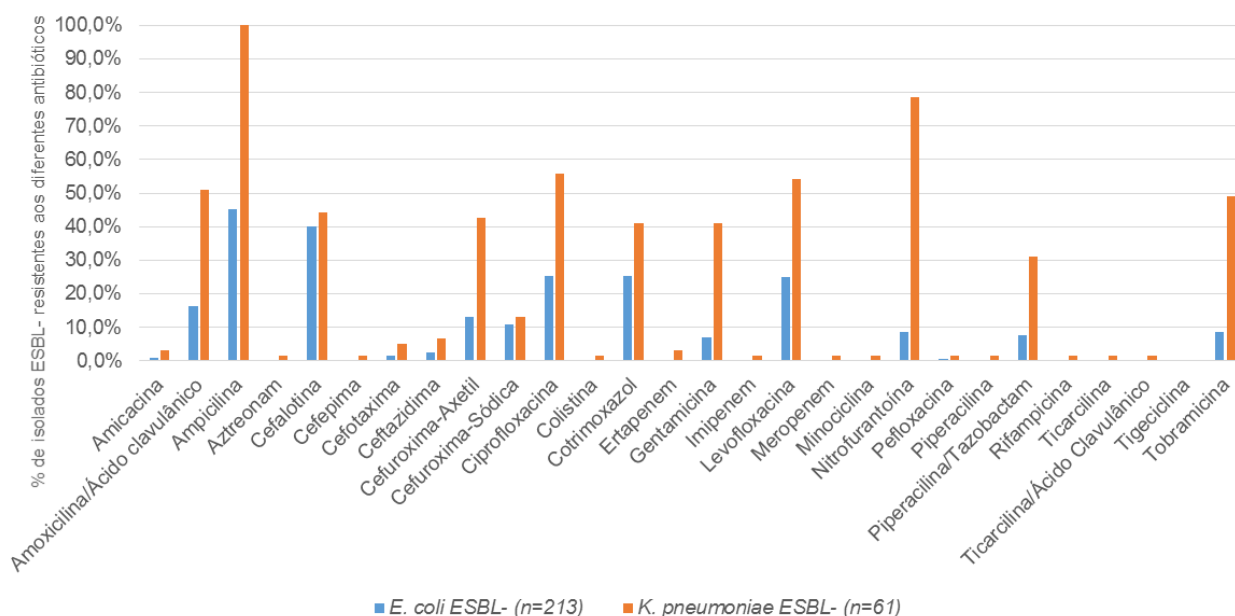


Figura 14: Taxas de resistência dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* ESBL- aos antibióticos testados.

Nos isolados destas duas espécies produtores de ESBL, apenas para oito dos antibióticos testados, as estirpes de *K. pneumoniae* apresentam percentuais de resistência superiores à *E. coli*, sendo eles a amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, gentamicina, nitrofurantoina, piperacilina/tazobactam e tobramicina, como se pode ver na Figura 15. Mesmo assim, as taxas de resistência dos isolados das duas espécies à amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, todas as cefalosporinas, cotrimoxazol e levofloxacina apresentam valores muito similares. Estas duas espécies apresentam ainda 0,0% de resistência a aztreonam, cefepime, colistina, imipenem, meropenem, minociclina, piperacilina, rifampicina, ticarcilina, ticarcilina/ácido clavulânico e tigeciclina, sendo que *E. coli* apresenta ainda total sensibilidade ao ertapenem (Figura 15).

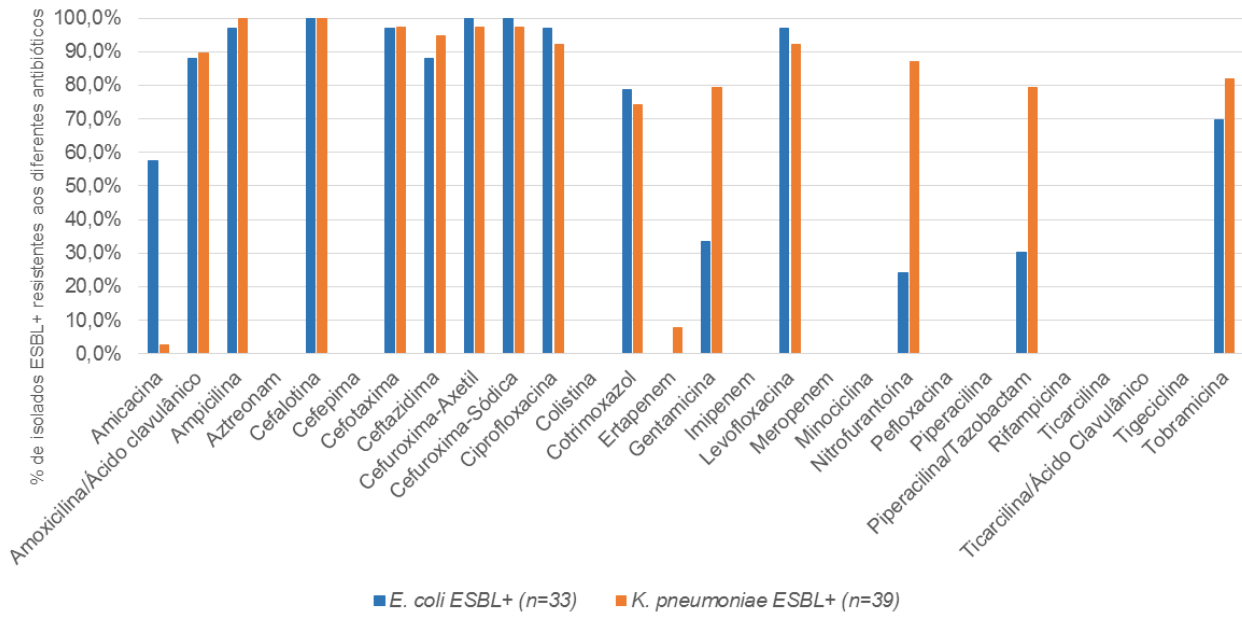


Figura 15: Taxas de resistência dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* ESBL+ aos antibióticos testados.

VI. DISCUSSÃO

Dicussão

As ITUs causadas por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL têm vindo a aumentar nos últimos anos e são, atualmente, um forte motivo de preocupação para os profissionais de saúde de todo o mundo, uma vez que as altas taxas de resistência aos agentes antimicrobianos apresentadas por estes isolados leva ao crescimento das taxas de mortalidade e morbidade nos pacientes infetados (12,13,57). Inicialmente encontradas em ambiente hospitalar, dada a grande pressão seletiva causada pelos antibióticos, estas estirpes multirresistentes, isto é, resistentes a pelo menos três classes de antibióticos, estão também já disseminadas na comunidade, nomeadamente em lares de idosos, sendo um motivo extra de preocupação para os clínicos (66). Assim, é crucial a monitorização individualizada destes doentes, do ponto de vista terapêutico e epidemiológico de forma a controlar a disseminação destas estirpes. É neste ponto de vista que a base de dados de vigilância epidemiológica criada no CHBV é de importância extrema, permitindo a qualquer altura a consulta de dados de um determinado doente, sejam eles introduzidos pelo laboratório de microbiologia ou pela CCI. Esta base multidisciplinar é preenchida e analisada diariamente, de forma a possibilitar a introdução de novos dados ou atualizar campos existentes, para que a sua utilização seja cada vez mais simples e objetiva. Além disso, esta ferramenta permite a aplicação de filtros que possibilitam a visualização da evolução de um determinado doente, desde a sua entrada no hospital no que respeita aos microorganismos isolados, resistências, antibioterapia empírica inicial e posterior antibioterapia dirigida. Esta informação pode ser fornecida ao clínico sempre que solicitada, permitindo melhor adequação da terapêutica empírica para aquele paciente num episódio similar no futuro.

Neste trabalho foram estudadas as amostras de urina de pacientes do serviço de urgência do HIP com mais de 65 anos, com um diagnóstico primário de ITU. A distribuição das 540 amostras recolhidas por género traduz aquilo que está documentado na literatura, havendo um predomínio de pacientes do sexo feminino (60,4%). Como referido no ponto 2.1. desta dissertação, as ITUs têm maior incidência em pacientes do sexo feminino, por fatores anatómicos do aparelho reprodutor das mulheres, acentuando-se após a menopausa (15,80).

A escolha da faixa etária a trabalhar neste estudo foi realizada tendo em conta diversos fatores relacionados com a incidência e gravidade das ITUs na população. Em primeiro lugar, a esperança média de vida está a aumentar em ambos os géneros, levando a um aumento da população idosa a nível mundial (81,82). Nestas faixas etárias, as doenças infecciosas são um grave problema de saúde, sendo responsáveis por um terço das mortes (82). Destas, as ITUs são uma das infeções mais comuns,

sejam elas adquiridas na comunidade ou associadas aos cuidados de saúde e estão associadas com elevadas taxas de mortalidade e morbidade (83,84). A população geriátrica é, só por si, mais suscetível a desenvolver ITUs devido a complicações associadas ao envelhecimento, como é o caso do sistema imunitário mais fragilizado, mobilidade reduzida, incontinência, má nutrição, diabetes, demência e acidentes vasculares cerebrais, que levam ao descuido nos cuidados de higiene (82). Além destes fatores, nos idosos, devido a alterações funcionais e estruturais, a maioria das ITUs são complicadas e apresentam sintomas atípicos, dificultando o diagnóstico atempado (85). A maioria da amostra estudada insere-se na faixa etária entre os 75 e os 84 anos (47,4%), sendo a faixa etária menos representada aquela que compreende pacientes com mais de 94 anos, contemplando apenas 2,6% do total.

A distribuição percentual dos isolados nas urinas estudadas revela um acentuado predomínio de bactérias Gram-negativas em relação a bactérias Gram-positivas e fungos. De facto, as bactérias Gram-negativas, nomeadamente da família *Enterobacteriaceae* são descritas por diversos autores como os principais agentes causadores de ITUs, podendo representar mais de 80% dos casos (7,9,16). Os resultados deste trabalho corroboram os dados descritos na literatura, tendo sido isoladas 403 bactérias desta família, representando mais de 84% do total de bactérias Gram-negativas e quase 75% do total de isolados. De entre as bactérias Gram-positivas isoladas a espécie mais isolada foi *E. faecalis* e de entre os fungos, *C. albicans*. No global, neste estudo, os microrganismos mais isolados foram *E. coli* (n=246), que perfaz 46% do total de isolados, seguida de *K. pneumoniae* (n=100), *P. aeruginosa* (n=56), *P. mirabilis* (n=31), *C. albicans* (n=20) e *E. faecalis* (n=17).

Nos últimos anos têm sido realizados diversos estudos entre a comunidade científica que incidem na etiologia de ITUs adquiridas na comunidade em que os resultados mostram, inequivocamente, que *E. coli* é o agente mais frequentemente causador deste tipo de infeções (24,86–92). Num estudo de vigilância levado a cabo entre 2000 e 2009, em Aveiro, Portugal, onde foram analisadas 155597 amostras de pacientes em regime de ambulatório, das quais 18797 tiveram exame microbiológico positivo, os resultados mostram que *E. coli* foi responsável por 64,5% dos casos, contra apenas 6,0% de *S. aureus*, 4,7% de *P. mirabilis*, 4,3% de *Klebsiella* spp., 3,6% de *E. faecalis* e 2,4% de *P. aeruginosa* (88). Neste estudo de Linhares *et al.* é ainda possível perceber que os indivíduos com 65 anos ou mais são responsáveis por 38,6% do total de ITUs, com maior prevalência nas mulheres, em todas as faixas etárias. Se nos centrarmos nas percentagens de isolados apenas nos idosos, a tendência é um pouco diferente do global do estudo, obtendo-se um perfil um pouco mais idêntico ao obtido no presente trabalho, com os isolados de *Klebsiella* spp. a surgirem logo atrás de *E. coli*

como os isolados mais frequentes, ainda assim com uma percentagem muito inferior à apresentada no presente trabalho, perfazendo apenas 6,3% dos casos. Nesta faixa etária, a distribuição dos principais isolados é a seguinte: *E coli*, 66,2%; *Klebsiella spp.*, 6,3%; *S. aureus*, 5,0%; *P. mirabilis*, 4,8%; *E. faecalis*, 4,3% e *P. aeruginosa*, 4,2% (88). Em 2007, Carlos Correia, *et al.* (86) publicaram um estudo sobre a etiologia das ITUs na Unidade Hospitalar de Bragança, Portugal, onde foram reportados os resultados de 428 exames bacteriológicos de urina positivos em pacientes em regime de ambulatório. Mais uma vez, *E. coli* é o microorganismo mais isolado, com 70,6% do total, seguindo-se *Klebsiella spp.* (8,6%), *P. mirabilis* (4,9%), *P. aeruginosa* (4,4%) *Enterococcus spp.* e *Staphylococcus spp.*, com 3,5% cada.

Fora do nosso país têm sido também reportados diversos estudos epidemiológicos com resultados semelhantes aos obtidos em Portugal. Na Europa, em Itália, Enrico Magliano *et al.* (91) reportaram, em 2011, resultados de um estudo onde concluem sobre a etiologia das ITUs adquiridas na comunidade. Mais uma vez, *E. coli* é o microorganismo mais isolado, seguindo-se *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* (91). No Kuwait, um grupo de investigadores determinou o perfil bacteriano de ITUs adquiridas na comunidade num hospital local durante 3 anos (2005 a 2007) e os resultados mostram que *E. coli* é o microorganismo mais isolado, perfazendo 54,9% dos casos (89). Curiosamente, neste hospital, o segundo microorganismo mais frequentemente isolado é o *Streptococcus agalactiae*, com 12,7% e só de seguida aparece *K. pneumoniae*, perfazendo 10,8% do total de ITUs adquiridas na comunidade. A elevada percentagem de isolados de *S. agalactiae* já anteriormente tinha sido descrita neste país, e parece estar relacionada com o alto número de pacientes com diabetes mellitus, uma vez que esta doença é um fator predisponente ao aparecimento de infeções por esta espécie em adultos (89). De facto, apesar de *E. coli* ser definitivamente o uropatógeno mais comum, as restantes espécies mais frequentemente isoladas diferem dependendo da área geográfica em questão, como se pode também notar nos estudos de Akoachere *et al.* (90), Bahadin, J, *et al.* (92) e Akram, M *et al.* (93), mostrando uma distribuição desigual dos uropatógenos na comunidade.

As estirpes produtoras de ESBL preocupam os profissionais de saúde de todo o mundo. Na Europa, os casos de infeções por estas estirpes têm aumentado drasticamente desde a sua descoberta na década de 1980 (75). Inicialmente as ESBL mais encontradas pertenciam às famílias TEM e SHV, em *K. pneumoniae* isoladas em pacientes internados, causando surtos nosocomiais. No entanto, atualmente, estas enzimas são também frequentemente encontradas em *E. coli*, com uma rápida emergência das ESBL do tipo CTX-M, não estando só restritas a ambientes hospitalares

mas disseminadas pela comunidade (75). Assim, neste estudo foi avaliada a (não) produção destas enzimas nas espécies causadoras de ITUs através dos dois métodos referidos na secção anterior (cf. secção V. Resultados). Os resultados mostram que 39% (n=39) do total de *K. pneumoniae* são produtoras deste tipo de enzimas, contra 13,4% (n=33) quando nos referimos à *E. coli*. O número de estirpes produtoras desta classe de β -lactamases têm aumentado drasticamente ao longo dos anos, principalmente na última década. Em 1999, um grupo de investigadores espanhóis levou a cabo um estudo sobre a suscetibilidade aos antimicrobianos de isolados obtidos de pacientes com ITUs adquiridas na comunidade e, de 2798 estirpes diferentes, apenas 7 estirpes de *E. coli* eram produtoras de ESBL (94). No entanto, no mesmo país, mas uma década depois, em 2009, 6% (n=162) do total de *E. coli* revelaram-se produtoras de ESBL e em 2010 o número subiu para 7% (n=210), segundo o estudo de Briongos-Figuero *et al.* (95). De ressaltar que este estudo englobou pacientes hospitalizados e vindos da comunidade, tornando mais difícil a perceção da disseminação destes isolados apenas entre doentes não hospitalizados. No entanto, um trabalho com a duração de 10 anos, entre 1994 e 2004, neste mesmo país, por Javier Ena *et al.* (96) mostra precisamente que houve um drástico aumento no número de *E. coli* produtoras de ESBL em ITUs na comunidade. Os investigadores concluem que o número de *E. coli* ESBL-positivas subiu de 2 por ano (0,20%) para 89 (5,52%), mostrando a crescente disseminação na comunidade (96). No Brasil, em 2007, Aldalise Lago *et al.* (97) levaram a cabo um estudo sobre a produção de ESBL entre as bactérias da família *Enterobacteriaceae* em pacientes internados. De 1546 isolados, 208 produtores revelaram-se produtores destas enzimas, representando 13,5% do total. Destas, aproximadamente 38% foram isoladas de amostras de urina. *E. coli* foi a espécie com maior número de isolados ESBL-positivos, representando 46,2% destes, seguindo-se o género *Enterobacter*, com 30,3%. Neste trabalho, apenas 2,4% das bactérias do género *Klebsiella* se revelaram produtoras de ESBL (97).

Na Arábia Saudita um grupo de investigadores levou a cabo, entre Janeiro de 2004 e Dezembro de 2005, um trabalho de investigação para determinar a prevalência de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBL num hospital local (98). Os resultados mostram que 4,5% do total de isolados recolhidos nesses dois anos de pacientes vindos da comunidade (266/5823) produzem esta classe de enzimas, sendo *E. coli* responsável por 88% dos casos. Entre o total de *E. coli* nestes pacientes, 4,8% revelou-se produtora de ESBL, contra 3,1% do total de *K. pneumoniae*. Apesar deste estudo ter sido realizado com recurso a várias amostras biológicas, os autores salientam que 74,4% dos casos de produtores destas enzimas entre os isolados vindos da comunidade foi isolado de amostras de urina (98). Em 2011, um grupo de investigadores publicou um estudo

levado a cabo no Paquistão entre 2007 e 2008, num total de 19 meses (99). Os resultados mostram que, de 260 *E. coli* isoladas, aproximadamente 39% era ESBL-positiva, assim como 26% dos 40 isolados de *Klebsiella* spp., sendo que a maioria das amostras eram de urina, em pacientes com ITUs, tanto provenientes de internamento como da comunidade (99). O Paquistão é, de facto, um país com elevadas taxas de prevalência de isolados produtores de ESBL não só na população adulta como também nas crianças. Entre Junho de 2009 e Dezembro de 2010 Hasan Ejaz *et al.* (100) realizaram um estudo epidemiológico num hospital pediátrico local e concluíram que 57,4% do total de *E. coli* e 71,7% do total de *K. pneumoniae* isoladas de urina dos pacientes internados apresenta fenótipo de multirresistência aos antibióticos devido à presença de ESBL (100). Mais recentemente, em 2013, um grupo de investigadores do Bangladesh publicou os resultados de um estudo com a duração de 12 meses realizado entre 2010 e 2011 em amostras de urina de pacientes internados e vindos da comunidade, com diagnóstico de ITU (101). Os dados mostram que, dos 114 isolados de *E. coli* recolhidos no período de estudo, 53,5% é produtor de ESBL. A percentagem de *Klebsiella* spp. produtoras destas enzimas é ainda superior, chegando perto dos 73%, seguindo-se os géneros *Enterobacter*, com 66,7% e *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp., com 20% cada (101). Nos EUA, Yohei Doi *et al.* realizaram uma investigação para inferir sobre isolados de *E. coli* produtores de ESBL responsáveis por infeções adquiridas na comunidade (102). No estudo, levado a cabo entre 2009 e 2010, foram analisadas 291 amostras de pacientes provenientes da comunidade (36,8%) ou com 48h ou menos de hospitalização (63,2%). A maioria das infeções adquiridas na comunidade são ITUs (81,5%, n=75). De todas as *E. coli* ESBL-positivas provenientes de pacientes da comunidade (n=104), 91,3% (n=95) produzem enzimas do tipo CTX-M.

Em Portugal, um estudo realizado entre Março de 2004 e Março de 2006, com isolados de *E. coli* recolhidos em 9 hospitais de 3 regiões diferentes mostra que, do total de 181 isolados, 65,7% (n=19) produz ESBLs do tipo CTX-M (103). Estas estirpes são de alta prevalência em infeções adquiridas na comunidade (56%), ITUs (76%) e pacientes com mais de 60 anos (76%) (103). Outro estudo, levado a cabo por S. Ferreira *et al.* no HIP, em Aveiro, entre 2008 e 2010 (104) mostrou que, de 15843 isolados, foram detetados fenótipos ESBL em 222 *E. coli* e 263 *K. pneumoniae*, provenientes maioritariamente de amostras de urina, sangue e secreções brônquicas. Através de testes de biologia molecular, os autores verificaram que a maioria destas estirpes produzia ESBL do tipo CTX-M (104). Mais tarde, entre 2011 e 2012, outro estudo levado a cabo em Aveiro (105) centrou-se nas ITUs em pacientes da comunidade. Dos 272 isolados incluídos no trabalho, as espécies mais prevalentes foram *K. pneumoniae*, com 35,7% do total de isolados, seguida de *E. coli*, com 29,8%. Foi detetado um fenótipo

ESBL em 82,5% do total de *K. pneumoniae* e em 44,4% do total de *E. coli* (105). Estes valores de prevalência de estirpes produtoras de ESBL em Aveiro são altos e motivo de preocupação. No entanto, desde 2011 tem-se verificado um acentuado decréscimo tanto na percentagem de *E. coli* como de *K. pneumoniae* ESBL-positivas. Como se pode verificar pelo estudo (106), que inclui os resultados deste trabalho, em 2011 a percentagem de *E. coli* com fenótipo ESBL em idosos com ITUs provenientes da comunidade era de 44,4%, tendo este valor descido para 12,1% em 2013. Já quando nos referimos a *K. pneumoniae* o decréscimo é ainda mais acentuado, variando entre 82,5% em 2011 e 38,7% em 2013 (106). De ressaltar que os valores aqui apresentados para o ano de 2013 não coincidem com os apresentados na secção V. *Resultados* do presente trabalho pois não contemplam o mês de Dezembro de 2013.

Os resultados do presente trabalho mostram, assim, que *K. pneumoniae* é a estirpe com maior percentagem de ESBL-positivos. De facto, *E. coli* e as bactérias do género *Klebsiella* são, de todas as *Enterobacteriaceae* aquelas que apresentam mais fenótipos de resistência causados por ESBL. Estes dados mostram ainda que, dependendo da localização geográfica, as β -lactamases de espectro estendido se encontram mais disseminadas numa espécie em detrimento de outras, reforçando, mais uma vez, a importância de estudos locais de epidemiologia para monitorizar estas espécies e impedir a sua propagação desmedida.

Apesar da prevalência de estirpes produtoras de ESBL ser elevada, a sua distribuição entre os géneros é desigual. Assim, no presente trabalho, verificou-se uma maior prevalência destes isolados em pacientes do sexo feminino (62,5%) em relação ao sexo masculino (37,5%). De facto esta distribuição encontra-se amplamente referenciada na literatura (97–99,101,103,107). Como exemplos, Riaz *et al.* (99) reportam, no seu estudo, prevalências de *E. coli* ESBL-positivas de 60% nas mulheres e 40% nos homens. No caso das espécies de *Klebsiella* ESBL-positivas esta diferença de prevalência entre géneros é mais ténue, fixando-se nos 55%-45%, com predomínio de pacientes do sexo feminino (99). Num outro trabalho publicado em 2006 (96) os autores reportam que os pacientes do género masculino são responsáveis por apenas 36% do total de *E. coli* ESBL-positivas, na amostra estudada. Esta discrepância entre sexos está diretamente relacionada com a maior prevalência de ITUs no sexo feminino por diversos fatores que já foram referenciados ao longo desta dissertação. No entanto, se nos reportarmos apenas a infeções nosocomiais por *E. coli* produtoras de ESBL, alguns autores referem o maior predomínio destes casos em pacientes do sexo masculino (102).

Quanto à distribuição dos isolados produtores de ESBL por faixa etária, neste trabalho verifica-se um predomínio de *E. coli* e *K. pneumoniae* ESBL-positivas em

pacientes na faixa etária entre os 85 e os 94 anos para o sexo feminino e entre os 75 e os 84 anos para o sexo masculino. De facto, a idade avançada é um dos vários fatores de risco que predispõem ao aparecimento de infeções por *Enterobacteriaceae* produtoras desta classe de β -lactamases. Segundo diversos autores, a idade avançada, hospitalizações recentes, uso de antibióticos nos dois meses anteriores, diabetes mellitus, utilização de cateteres urinários e viver em lares de idosos são alguns dos fatores de risco mais frequentemente associados a ITUs por *Enterobacteriaceae* ESBL-positivas (95,96).

A determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos é um passo fundamental para a escolha adequada da terapia antibiótica a administrar a um determinado paciente. Atualmente, as elevadas taxas de resistência que os microorganismos têm a estes fármacos representa um grande motivo de preocupação para os profissionais de saúde, levando a um aumento das falhas terapêuticas e consequente aumento das taxas de mortalidade por doenças causadas por bactérias. Tendo também em consideração que, no caso das ITUs, há normalmente a administração de uma terapia antibiótica empírica antes dos resultados da identificação e TSA serem dados, é importante a realização de estudos locais de monitorização das taxas de resistência dos microorganismos mais comumente causadores destas infeções, de forma a adequar a terapia empírica (108).

De entre os países europeus, Portugal é um dos que apresenta maiores taxas de resistência aos antibióticos, uma realidade contrastante com a dos países nórdicos (109). Além disso, segundo dois estudos, levados a cabo em 2002 (109) e 2008 (110), os antibióticos β -lactâmicos são os mais utilizados no nosso país, reforçando a importância da monitorização das taxas de resistência aos mesmos. Neste trabalho verificou-se são precisamente os antibióticos desta família que estão entre aqueles às quais as bactérias Gram-negativas apresentam maiores taxas de resistência (ampicilina, 59,1%; cefalotina, 47,8%; amoxicilina/ácido clavulânico, 35,3% e cefuroxima-axetil, 34,7%). Em contraste, os carbapenemos, tigeciclina e colistina revelaram-se bastante eficazes, com taxas de resistência bem abaixo dos 10%, destacando-se a colistina, onde apenas 1 isolado, dos 479 Gram-negativos, se revelou resistente. De facto, a colistina é apenas utilizada quando mais nenhum outro antibiótico está disponível, dados os seus graves efeitos secundários (111,112). Isto pode assim explicar a quase inexistência de resistência a este fármaco, uma vez que as bactérias não estão sujeitas a pressão seletiva do mesmo.

Quando particularizamos e nos reportamos apenas a *E. coli* e *K. pneumoniae*, importa distinguir as taxas de resistência dos isolados produtores de ESBL daqueles que não produzem este mecanismo de resistência. Assim, como esperado, as estirpes

não produtoras de ESBL apresentam menores taxas de resistência que, para *E. coli*, se fixam abaixo dos 50% para todos os antibióticos testados. No caso de *K. pneumoniae*, as estirpes não produtoras apresentam, ainda assim, altas taxas de resistência para vários antibióticos, nomeadamente ampicilina, nitrofurantoína, ciprofloxacina e levofloxacina, todas acima dos 50%. Comparando agora as taxas de resistência das estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, verifica-se que, para 8 dos antibióticos testados, *K. pneumoniae* apresenta taxas de resistência superiores à *E. coli*. No entanto os resultados mostraram-se muito idênticos entre estas duas espécies, nomeadamente para a amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, todas as cefalosporinas, cotrimoxazol e levofloxacina. De realçar a total sensibilidade (0% de resistência) dos isolados ESBL-positivos ao aztreonam, cefepime, colistina, imipenem, meropenem, minociclina, piperacilina, rifampicina, ticarcilina, ticarcilina/ácido clavulânico e tigeciclina. Atendendo ao fenótipo característicos das estirpes produtoras de ESBLs seria de esperar uma diminuição da taxa de resistência de uma penicilina associada a um inibidor destas enzimas, quando comparada com a penicilina isolada. De facto, os resultados deste estudo comprovam isso mesmo, verificando-se que, para *E. coli* ESBL+ apresenta 97% de taxa de resistência à ampicilina, sendo este valor mais baixo para a combinação amoxicilina/ácido clavulânico (87,9%). A mesma relação é verificada nos isolados de *K. pneumoniae* ESBL+. O decréscimo da resistência é ainda mais acentuado para a associação piperacilina/tazobactam, onde para *E. coli* ESBL+ se verificou 30,6% de resistência, contra 79,5% em *K. pneumoniae* ESBL+. No entanto, estes valores são ainda elevados, o que pode ser explicado pela presença de outro mecanismo de resistência acoplado à produção de ESBL, que se traduza na resistência à associação da penicilina com o inibidor da β -lactamase.

Além da resistência aos antibióticos β -lactâmicos, característica das estirpes produtoras de β -lactamases, os isolados ESBL-positivos apresentaram também altas taxas de resistência ao cotrimoxazol (>70% para *E. coli* e *K. pneumoniae*) e às quinolonas (exceto pefloxacina), em que se observaram resistências acima dos 90%, quer para *E. coli* quer para *K. pneumoniae*. Estes valores são preocupantes uma vez que, segundo o *Guidelines on urological infections*, da *European Association of Urology* (8), estas duas classes de antibióticos (quinolonas e cotrimoxazol) são duas das mais utilizadas no tratamento empírico de uma ITU, embora esteja definido que o cotrimoxazol não deve ser utilizado em áreas em que a resistência de *E. coli* seja superior a 20% (8), como se verificou neste trabalho. Este antibiótico tem vindo a sofrer, na última década, um aumento exacerbado da taxa de resistência nos isolados vindo da comunidade, tendo sido reportados casos um pouco por todo o mundo (113,114). Nos EUA, um estudo levado a cabo por Gupta *et al.* (114), mostrou que a resistência ao

cotrimoxazol em *E. coli* em mulheres com ITUs não complicadas duplicou num período temporal de 4 anos (1992-1996), passando de 9 a 18% (114). Em Israel a taxa de resistência a este fármaco chegava já perto dos 50%, em 1995 (115). A resistência ao cotrimoxazol parece ser característica dos países em desenvolvimento (70% na América Latina) e estar relacionada com o uso deste antibiótico quer em humanos quer na veterinária, aumentando a pressão seletiva (113). No presente trabalho, a resistência encontrada ao cotrimoxazol por parte do total de *E. coli*, independentemente de ser produtora ou não de ESBLs foi de 32,5% (dados não apresentados), bem acima do limite estabelecido para a não-utilização deste antibiótico no tratamento de ITUs, impedindo a utilização do mesmo empiricamente, nesta região geográfica, sob o risco de falência terapêutica, como defendem Raz *et al.* num trabalho publicado já neste ano de 2014 (113). Quanto à resistência às quinolonas em estirpes produtoras de ESBL, este fenótipo é relativamente recente no nosso país. De facto, foi apenas em 2010 que foi reportado o primeiro isolado de *K. pneumoniae* ESBL também resistente às quinolonas (116). Neste estudo, levado a cabo por Ferreira, S. *et al.*, em isolados provenientes do serviço de medicina intensiva do HIP, é demonstrada a presença, no mesmo plasmídeo, de genes de resistência às quinolonas (*qnrA1* e *qnrB4*) e genes que codificam para ESBL (116). Esta associação permite assim explicar a resistência a estas duas classes de fármacos e foi também já reportada em 2006, no trabalho de Bermejo *et al.* (117). Mais uma vez, os resultados deste estudo são motivo de preocupação uma vez que estes isolados são unicamente provenientes da comunidade e apresentam resistência às quinolonas em alto nível, juntamente com a produção de ESBL.

Outro antibiótico também amplamente usado para tratar ITUs, nomeadamente cistites agudas não complicadas é a nitrofurantoína. A nitrofurantoína pertence à classe dos nitrofuranos e é muitas vezes utilizada como profilaxia para ITUs (8). No entanto, segundo reportado na literatura, este antibiótico é mais eficaz nas estirpes de *E. coli* do que em *K. pneumoniae* (15). Os resultados deste trabalho corroboram estes dados, podendo-se constatar que, para as estirpes não produtoras de ESBL, as taxas de resistência a este fármaco fixam-se nos 8,5% para *E. coli* e 75,7% para *K. pneumoniae*. Nas estirpes produtoras destas β -lactamases a relação mantém-se, havendo um aumento da percentagem de resistência em ambas as espécies (24,2% para *E. coli* e 74,2% para *K. pneumoniae*). Um estudo publicado em 2012 (118) conclui que a nitrofurantoína pode ser uma alternativa terapêutica viável no tratamento de ITUs causadas por *E. coli* produtoras de ESBL, dada a sua baixa taxa de resistência (118), tal como verificado no presente trabalho, e pode ser utilizada empiricamente em substituição do cotrimoxazol e/ou fluoroquinolonas (118,119) que, segundo os resultados do presente trabalho, apresentam altas taxas de resistência na comunidade.

No que respeita aos aminoglicosídeos, nomeadamente a amicacina, neste trabalho verificou-se uma taxa de resistência muito baixa nos isolados de *K. pneumoniae*, quer nos produtores de ESBL quer nos não produtores (2,6% e 3,3%, respetivamente). Por oposição, as estirpes de *E. coli* produtoras de ESBL apresentam uma taxa de resistência à amicacina de 57,6%, contra os apenas 0,9% ocorridos nos isolados não produtores. Um estudo publicado recentemente e levado a cabo na Noruega (120), mostrou que, naquele país, a resistência a esta classe de antibióticos em isolados de *E. coli* e *Klebsiella* spp. é sobretudo causada pela presença de enzimas de modificação de aminoglicosídeos. Os autores também observaram uma co-associação entre a resistência a esta classe de fármacos e a produção de ESBL (120). Por outro lado, um outro trabalho, levado a cabo por Drago *et al.* (121), conclui que a combinação de uma fluoroquinolona com um β -lactâmico ou com a amicacina pode aumentar a atividade antimicrobiana e ajudar a limitar as taxas de resistência em *E. coli* produtoras de ESBL (121). No entanto, dados os seus efeitos secundários tóxicos, nomeadamente de nefrotoxicidade, a administração de aminoglicosídeos deve ser evitada sempre que possível (44).

Em relação aos carbapenemos, estes são normalmente utilizados no tratamento de infeções de maior gravidade, uma vez que obrigam ao internamento do doente (122). Neste trabalho, as taxas de resistência verificadas foram reduzidas para os três antibióticos desta classe testados (ertapenem, meropenem e imipenem), sendo a taxa mais alta de resistência verificada em *K. pneumoniae* ESBL-positiva, para o ertapenem de apenas 7,7%. A resistência aos carbapenemos em isolados de *K. pneumoniae* foi pela primeira vez descrita há uma década e desde então tem-se disseminado por diversos países, sendo um motivo de preocupação crescente (123). Um estudo levado a cabo por Eser, O. K. *et al.* (124) mostrou a presença de resistência aos carbapenemos em *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL em infeções da corrente sanguínea, maioritariamente devido à expressão do gene bla_{OXA} (124). Outro grupo de investigadores concluiu que a presença de β -lactamases do tipo CTX-M-15, TEM-1 e OXA-1 está relacionado com a diminuição da suscetibilidade aos carbapenemos em isolados de *E. coli* em que há mutações espontâneas nos genes que codificam para as porinas, levando à diminuição ou ausência da expressão das mesmas (125). Assim, como alternativa à utilização de carbapenemos em estirpes produtoras de ESBL têm sido proposta a utilização de cefepime associado ao tazobactam (122,126,127). Recentemente, Mudshingkar, S. *et al.* (126) reforçaram a ideia já proposta por outros autores (122,127), atestando a eficácia da utilização da associação cefepime/tazobactam em substituição dos carbapenemos. Esta teoria é suportada pelo facto do cefepime ter ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e não

perder eficácia na presença de β -lactamases dos tipos OXA e/ou AmpC. A desvantagem da utilização isolada do cefepime seria a sua fraca atividade na presença de ESBLs. No entanto, a utilização simultânea do tazobactam, um inibidor destas enzimas, torna esta associação eficaz contra três mecanismos de resistência (126). Esta combinação é ainda fracamente utilizada devido à falta de ensaios clínicos na área e, por isso, os carbapenemos continuam, atualmente a ser alternativa usada nos casos de infecções causadas por produtores de ESBL (126).

Os resultados deste trabalho refletem aquilo que é a realidade preocupante da resistência aos antibióticos. Enquanto há poucos anos as resistências eram uma realidade confinada apenas ao meio hospitalar, pela pressão seletiva que aí existe, hoje em dia diversos mecanismos estão fortemente disseminados pela comunidade, levando à diminuição do leque de fármacos disponíveis para o tratamento de ITUs, nomeadamente entre a população idosa, que apresenta muitos outros fatores debilitantes e que agravam o quadro clínico. Assim, é necessária e urgente a sensibilização dos profissionais de saúde para a importância da adequada prescrição de agentes antimicrobianos e da correta identificação das estirpes produtoras de mecanismos de resistência, como é o caso das ESBL, assim como a sensibilização de toda a população em geral para a importância da toma correta de antibióticos, de forma a impedir o aumento da pressão seletiva no universo microbiano, que pode levar, em poucos anos, à quase escassez destes fármacos para o tratamento de simples ITUs.

VII. CONCLUSÃO

Conclusão

As ITUs são umas das infeções mais prevalentes na comunidade e, nos últimos anos, tem aumentado drasticamente o número de estirpes produtoras de ESBL nestes pacientes em todo o mundo, que diminuem drasticamente as opções terapêuticas disponíveis. As estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* são aquelas que apresentam maior prevalência entre todos os microorganismos causadores de ITUs e são também, de todas as *Enterobacteriaceae*, aquelas que apresentam maior percentagem de produção de ESBL. Assim, a monitorização contínua destes isolados multirresistentes é crucial e devem ser tomadas medidas de isolamento de contacto em doentes identificados com este tipo de microorganismos, de forma a evitar possíveis surtos epidémicos, quer nos hospitais quer na comunidade. Outro dos fatores de extrema importância para evitar a propagação desmedida destes mecanismos de resistência é a sensibilização de todos os profissionais de saúde e população em geral para a correta prescrição e toma de antibióticos.

É, por isso, necessário adotar medidas preventivas de prescrição antimicrobiana, nomeadamente na terapêutica empírica e profilática, que devem ser adequadas ao mapa microbiológico de uma determinada região ou hospital. Assim, é imprescindível a existência de uma unidade de controlo de infeção que, em colaboração com os laboratórios clínicos, realize estudos periódicos de vigilância epidemiológica, estabelecendo tendências que permitam ao laboratório e ao clínico adotar as melhores medidas preventivas. É neste sentido que este trabalho se revela de total importância e adequação e dele é possível retirar as seguintes conclusões:

- (i) A base de dados de vigilância epidemiológica é uma ferramenta muito útil que permite não só aceder às estatísticas por período de tempo de todo o panorama microbiológico de uma dada região geográfica mas também monitorizar a evolução de um doente ao longo do tempo e sujeito (ou não) a terapia antibiótica;
- (ii) A maioria das amostras estudadas pertencem a indivíduos do sexo feminino na faixa etária entre os 75 e os 84 anos, sendo a média de idades de 81,5 anos ($\pm 7,2$);
- (iii) Das 540 amostras estudadas de pacientes com ITUs, em mais de 88% foram identificadas bactérias Gram-negativas, das quais a maioria foi identificada como pertencente à família *Enterobacteriaceae* (84,1%);
- (iv) Os agentes etiológicos mais comuns das ITUs foram *E. coli* (45,6%) e *K. pneumoniae* (18,5%);

- (v) 13,4% do total de *E. coli* e 39% do total de *K. pneumoniae* revelaram-se positivos para a presença de ESBLs;
- (vi) A grande maioria (62,5%) do total de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBL foram isoladas em mulheres entre os 85 e os 94 anos;
- (vii) De entre os antibióticos testados contra bactérias Gram-negativas, a maior taxa de resistência verificou-se para a ampicilina (59,1%) e a menor para a tigeciclina (0%);
- (viii) Do total de bactérias Gram-negativas, 83 isolados de *E. coli* apresentaram 100% de suscetibilidade a todos os antibióticos testados;
- (ix) As estirpes de *E. coli* não produtoras de ESBL apresentam resistências inferiores a 50% para todos os antibióticos testados;
- (x) As taxas de resistência em *K. pneumoniae* não produtoras de ESBL são superiores às de *E. coli*;
- (xi) Os antibióticos menos eficazes contra *E. coli* ESBL-positivas são as cefalosporinas (exceto cefepime), ampicilina, ciprofloxacina, levofloxacina e amoxicilina/ácido clavulânico. Pelo contrário, as maiores taxas de eficácia nestes isolados verificam-se para a tigeciclina, ticarcilina, ticarcilina/ácido clavulânico, rifampicina, piperacilina, minociclina, colistina, cefepime, aztreonam, pefloxacina e ainda os carbapenemos;
- (xii) Os antibióticos às quais as estirpes de *K. pneumoniae* ESBL-positivas apresentam maior resistência são as cefalosporinas (exceto cefepime), levofloxacina, amoxicilina/ácido clavulânico, nitrofurantoína e tobramicina. Em oposição, os antibióticos mais eficazes contra estes isolados são amicacina, aztreonam, cefepime, colistina, minociclina, pefloxacina, piperacilina, rifampicina, ticarcilina, ticarcilina/ácido clavulânico, tigeciclina e carbapenemos.

De futuro, novos estudos deverão continuar a ser feitos, de forma a ser possível manter um mapa epidemiológico atual da região abrangida pelo CHBV, para que seja possível controlar e diminuir as taxas de resistência verificadas no presente que, sendo altas, demonstram a forte disseminação de estirpes de *E. coli* e *K. pneumoniae* multirresistentes na comunidade, principalmente em lares de idosos e centros de dia, onde diariamente convivem centenas de pessoas que se estão a tornar reservatório destes microorganismos.

Como perspetiva futura pretende-se também aplicar a espetrometria de massa MALDI-TOF à identificação de uropatógenos, como uma alternativa mais rápida ao atual método de identificação, para que, com uma resposta mais rápida do laboratório,

seja possível a administração de uma terapia antimicrobiana dirigida e atempada, assim como medidas de controlo de infeção, evitando a disseminação descontrolada de estirpes multirresistentes no hospital e na comunidade. Este objetivo começou a ser desenhado no decorrer deste trabalho, no entanto ainda não existem resultados passíveis de ser apresentados nesta dissertação.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Levit K, Stranges E, Ryan K, Elixhauser A. HCUP Facts and Figures, 2006: Statistics on Hospital-based Care in United States - Agency for Healthcare Research and Quality. 2008.
2. Foltz-Gray D. Most Common Causes of Hospital Admissions for Older Adults [Internet]. AARP Bulletin. 2012 [cited 2013 Nov 28]. Available from: <http://www.aarp.org/health/doctors-hospitals/info-03-2012/hospital-admissions-older-adults.html>
3. Elixhauser A, Owens P. Reasons for Being Admitted to the Hospital through the Emergency Department, 2003 - Healthcare Cost and Utilization Project. 2003.
4. Mazzulli T. Resistance Trends in Urinary Tract Pathogens and Impact on Management. *J Urol*. 2002 Oct;168(4, Supplement):1720–2.
5. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol. Am Soc Microbiol*; 2010;48(4):1169–75.
6. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect. Wiley Online Library*; 2010;16(11):1614–9.
7. Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med*. 2002 Jul 8;113(1, Supplement 1):14–9.
8. Grabe M, Bishop MC, Bjerklund-Johansen TE, Botto H, Çek M, Lobel B, et al. Guidelines on urological infections. *Eur Assoc Urol*. 2010;110.
9. Llarrull LI, Testero SA, Fisher JF, Mobashery S. The future of the β -lactams. *Curr Opin Microbiol. Elsevier*; 2010;13(5):551–7.
10. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940;146(3713):837.
11. Drawz SM, Bonomo RA. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clin Microbiol Rev* . 2010 Jan 1;23 (1):160–201.
12. Rupp ME, Fey PD. Extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. *Drugs. Springer*; 2003;63(4):353–65.
13. Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 2011. p. 455–78.
14. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother. Am Soc Microbiol*; 2010;54(3):969–76.
15. Sheerin NS. Urinary tract infection. *Medicine (Baltimore)*. 2011 Jul;39(7):384–9.
16. Nicolle LE. Epidemiology of urinary tract infections. *Clin Microbiol Newsl*. 2002 Sep 15;24(18):135–40.
17. University of Maryland MC. Urinary tract infection in women [Internet]. 2012 [cited 2013 Oct 4]. Available from: <http://umm.edu/health/medical/altmed/condition/urinary-tract-infection-in-women>
18. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med*. 2002 Jul 8;113(1, Supplement 1):5–13.
19. Wagenlehner FME, Cek M, Naber K, Kiyota H, Bjerklund-Johansen T. Epidemiology, treatment and prevention of healthcare-associated urinary tract infections. *World J Urol. Springer-Verlag*; 2012;30(1):59–67.

20. Guggenbichler JP, Assadian O, Boeswald M, Kramer A. Incidence and clinical implication of nosocomial infections associated with implantable biomaterials—catheters, ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections. *GMS Krankenhhyg Interdiszip. German Medical Science*; 2011;6(1).
21. Nicolle LE. Urinary Tract Infection. *Crit Care Clin. Elsevier*; 2013;29(3):699–715.
22. Little P, Turner S, Rumsby K, Warner G, Moore M, Lowes JA, et al. Dipsticks and diagnostic algorithms in urinary tract infection: development and validation, randomised trial, economic analysis, observational cohort and qualitative study. *Prepress Projects*; 2009.
23. Srivastava RN, Vasudev AS. Urinary tract infections—current management. *Apollo Medicine*. 2011. p. 270–5.
24. Rajesh KR, Mathavi S, Priyadarsini RI. Prevalence of antimicrobial resistance in uropathogens and determining empirical therapy for urinary tract infections. *Int J*. 2010;1(5):260.
25. Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, Colgan R, Geerlings SE, Rice JC, et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis. Oxford University Press*; 2010;50(5):625–63.
26. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, et al. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: a 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Infect Dis. Oxford University Press*; 2011;52(5):e103–e120.
27. Bouza E, Cercenado E. Klebsiella and Enterobacter: Antibiotic resistance and treatment implications. *Semin Respir Infect. Saunders*; 17(3):215–30.
28. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology. Elsevier Health Sciences*; 2012.
29. Collee JG, Duguid JP, Fraser AG, Marmion BP. *Microbiologia Médica. Fundação C*. 1993.
30. Ryan K, Ray CG, Ahmad N, Drew WL, Plorde J. *Sherris Medical Microbiology, Fifth Edition. Mcgraw-hill*; 2010.
31. Paradis S, Boissinot M, Paquette N, Bélanger SD, Martel EA, Boudreau DK, et al. Phylogeny of the Enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase β -subunit. *Int J Syst Evol Microbiol* . 2005 Sep 1;55 (5):2013–25.
32. Paterson DL. Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Med*. 2006 Jun;119(6, Supplement 1):S20–S28.
33. Costa AC, Noriega E, Fonseca LF, Silva MG. Inquérito Nacional de Prevalência de Infecção. 2009 p. 18.
34. European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *EARSS Anual Report*. 2008 p. 180.
35. Wagenlehner FME, Niemetz AH, Weidner W, Naber KG. Spectrum and antibiotic resistance of uropathogens from hospitalised patients with urinary tract infections: 1994–2005. *Int J Antimicrob Agents. Elsevier*; 2008;31:25–34.
36. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination Therapy for Treatment of Infections with Gram-Negative Bacteria. *Clin Microbiol Rev* . 2012 Jul 1;25 (3):450–70.

37. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol*. Blackwell Publishing; 1929;10(3):226.
38. Schaechter M. *Desk Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier Science; 2004.
39. Saint F, Gueguen G, Biserte J, Fontaine C, Mazeman E. Rupture du ligament patellaire un mois après traitement par fluoroquinolone. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*. Masson; 2000;86(5):495–7.
40. Saint F, Salomon L, Cicco A, de la Taille A, Chopin D, Abbou CC. Les tendinopathies liées aux fluoroquinolones: les sujets à risque, les mécanismes physiopathologiques incriminés, la prise en charge thérapeutique. *Progrès en Urol*. 2001;11:1331–4.
41. Cabassu JP, Ivanoff S, Haroutunian G, BESSE J. Rupture bilatérale des ligaments patellaires chez un chien pendant un traitement à l'enrofloxacin. *Traitement*. *Rev Méd Vét*. 2001;152(7):523–30.
42. Cabassu JP, Ivanoff S, Haroutunian G, Besse J. Bilateral patellar ligament rupture in a dog during enrofloxacin treatment. *Rev Med Vet (Toulouse)*. 2001;152.
43. Zwillich T. FDA Warning: Cipro may rupture Tendons [Internet]. WebMD. 2008 [cited 2013 Nov 5]. p. 1. Available from: <http://www.webmd.com/osteoarthritis/news/20080708/fda-warning-cipro-may-rupture-tendons>
44. Mingeot-Leclercq M-P, Tulkens PM. Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 May 1;43 (5):1003–12.
45. Suárez C, Gudiol F. Beta-lactam antibiotics. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Ediciones Doyma SL; 2009;27(2):116–29.
46. Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*. Blackwell Publishing Ltd; 2008 Mar 1;32(2):149–67.
47. Vollmer W, Bertsche U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes*. Elsevier; 2008;1778(9):1714–34.
48. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*. Elsevier; 2006;119(6):S3–S10.
49. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat*. Elsevier; 2006;9(3):142–56.
50. El Salabi A, Walsh TR, Chouchani C. Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol*. Informa Healthcare; 2012 Jun 6;39(2):113–22.
51. Weldhagen GF. Integrons and β -lactamases—a novel perspective on resistance. *Int J Antimicrob Agents*. Elsevier; 2004;23(6):556–62.
52. Zhao W-H, Hu Z-Q. β -Lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36(3):245–58.
53. Ambler RP. The Structure of beta-Lactamases. *Philos Trans R Soc London B, Biol Sci*. 1980 May 16;289(1036):321–31.
54. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. American Society for Microbiology (ASM); 1995;39(6):1211.

55. Grover N, Sahni AK, Bhattacharya S. Therapeutic challenges of ESBLs and AmpC beta-lactamase producers in a tertiary care center. *Med J Armed Forces India*. Elsevier; 2012;
56. Lynch JP, Clark NM, Zhanel GG. Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum β -lactamases and carbapenemases). *Expert Opin Pharmacother*. Expert Opinion; 2013 Jan 15;14(2):199–210.
57. Overdeest I, Willemsen I, Elberts S, Verhulst C, Kluytmans J. Laboratory detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: evaluation of two screening agar plates and two confirmation techniques. *J Clin Microbiol*. Am Soc Microbiol; 2011;49(2):519–22.
58. Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, et al. Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother*. Br Soc Antimicrob Chemo; 2009;63(1):1–4.
59. Bush K, Jacoby GA, Amicosante G, Bonomo RA, Bradford P, Cornaglia G, et al. Comment on: Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother*. Br Soc Antimicrob Chemo; 2009;64(1):212–3.
60. Corvec S, Beyrouthy R, Crémet L, Aubin GG, Robin F, Bonnet R, et al. TEM-187, a New Extended-Spectrum β -Lactamase with Weak Activity in a *Proteus mirabilis* Clinical Strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 May 1;57 (5):2410–2.
61. Robin F, Hennequin C, Gniadkowski M, Beyrouthy R, Empel J, Gibold L, et al. Virulence Factors and TEM-Type β -Lactamases Produced by Two Isolates of an Epidemic *Klebsiella pneumoniae* Strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Feb 1;56 (2):1101–4.
62. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Oct 1;18 (4):657–86.
63. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. Am Soc Microbiol; 2001;14(4):933–51.
64. Gupta V. An update on newer beta-lactamases. *Indian J Med Res*. Indian Council of medical research; 2007;126(5):417.
65. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, et al. Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Nov 1;47(11):3554–60.
66. Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol*. Elsevier; 2007;7(5):459–69.
67. Tsui K, Wong S-S, Lin L-C, Tsai C-R, Chen L-C, Huang C-H. Laboratory identification, risk factors, and clinical outcomes of patients with bacteremia due to *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum and AmpC type β -Lactamases. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. Scientific Communications International Limited on behalf of the Chinese Society of Microbiology, the Chinese Society of Immunology, the Infectious Diseases Society of Taiwan, and the Taiwan Society of Parasitology; 2012. p. 193–9.

68. Grover SS, Sharma M, Chattopadhy D, Kapoor H, Pasha ST, Singh G. Phenotypic and genotypic detection of ESBL mediated cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: Emergence of high resistance against cefepime, the fourth generation cephalosporin. *J Infect. Elsevier*; 2006;53(4):279–88.
69. Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis. Elsevier*; 2008;8(3):159–66.
70. Junior MA de S, Ferreira E dos S, Conceição GC da. Betalactamases de espectro ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. *Rev News Lab*. 2004;63.
71. Machado E, Coque TM, Cantón R, Novais Â, Sousa JC, Baquero F, et al. High diversity of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Dec 1;60 (6):1370–4.
72. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol. Am Soc Microbiol*; 2004;42(3):1089–94.
73. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect. Blackwell Publishing Ltd*; 2008 Jan 1;14:144–53.
74. Pitout JDD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother. Br Soc Antimicrob Chemo*; 2005;56(1):52–9.
75. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill Bull Eur sur les Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2008;13(47).
76. European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Antimicrobial Resistance surveillance in Europe. 2012 p. 9–32.
77. BioMérieux. BioMérieux [Internet]. [cited 2014 Feb 6]. Available from: <http://www.biomerieux.co.uk/>
78. Biodisk A. Etest ESBL [Internet]. 2007 [cited 2014 Feb 12]. Available from: http://www.eurl-ar.eu/data/images/faq/ab_biodisk_conf_of_esbl.pdf
79. Ambler RP, Coulson AF, Frère J-M, Ghuysen J-M, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J. Portland Press Ltd*; 1991;276(Pt 1):269.
80. Nicolle LE, Committee ACG. Complicated urinary tract infection in adults. *Can J Infect Dis Med Microbiol. Pulsus Group*; 2005;16(6):349.
81. Numa H, Kazuya T. Clinical study of bacterial pathogens which cause urinary tract infections in the elderly. *Nishinohon J Urol*. 2012;74(6):334–9.
82. Marques LPJ, Flores JT, Barros Junior O de O, Rodrigues GB, Mourão C de M, Moreira RMP. Epidemiological and clinical aspects of urinary tract infection in community-dwelling elderly women. *Brazilian J Infect Dis. Elsevier*; 2012;16(5):436–41.

83. Nicolle LE, Bradley S, Colgan R, Rice JC, Schaeffer A, Hooton TM. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Infect Dis*. JSTOR; 2005;643–54.
84. Gavazzi G, Delerce E, Cambau E, Francois P, Corroyer B, de Wazières B, et al. Diagnostic criteria for urinary tract infection in hospitalized elderly patients over 75 years of age: A multicenter cross-sectional study. *Médecine Mal Infect*. Elsevier; 2013;43(5):189–94.
85. Gonen I, Umul M, Kaya O, Temel EN, Kose SALI, Unal O, et al. Clinical and laboratory evaluation of urinary tract infections in elderly population. *Acta Medica Cordoba*. 2013;29:853.
86. Correia C, Costa E, Peres A, Alves M, Pombo G, Estevinho L. Etiologia das infecções do tracto urinário e sua susceptibilidade aos antimicrobianos. *Acta Med Port*. 2007;20(6):543–50.
87. Coppo E, Barbieri R, Bottaro LC, Illiberi O, Piazzai P, Debbia EA, et al. Local surveillance study on etiology of community- and hospital-acquired urinary tract infections (UTI) and antimicrobial susceptibility of uropathogens. *Microbiol Medica*. 2012;27(1).
88. Linhares I, Raposo T, Rodrigues A, Almeida A. Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten-year surveillance study (2000-2009). *BMC Infect Dis*. 2013;13(1):19.
89. Al Benwan K, Al Sweih N, Rotimi VO. Etiology and Antibiotic Susceptibility Patterns of Community- and Hospital-Acquired Urinary Tract Infections in a General Hospital in Kuwait. *Med Princ Pract*. 2010;19(6):440–6.
90. Akoachere J-FTK, Yvonne S, Akum NH, Seraphine EN. Etiologic profile and antimicrobial susceptibility of community-acquired urinary tract infection in two Cameroonian towns. *BMC Res Notes*. BioMed Central Ltd; 2012;5(1):219.
91. Magliano E, Grazioli V, Deflorio L, Leuci AI, Mattina R, Romano P, et al. Gender and age-dependent etiology of community-acquired urinary tract infections. *Sci World J*. Hindawi Publishing Corporation; 2012;2012.
92. Bahadin J, Teo SSH, Mathew S. Aetiology of community-acquired urinary tract infection and antimicrobial susceptibility patterns of uropathogens isolated. *Singapore Med J*. 2011;52(6):415–20.
93. Akram M, Shahid M, Khan AU. Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in J N M C Hospital Aligarh, India. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2007;6:4.
94. Daza R, Gutiérrez J, Piédrola G. Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from patients with community-acquired urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents*. Elsevier; 2001;18(3):211–5.
95. Briongos-Figuero LS, Gómez-Traveso T, Bachiller-Luque P, Domínguez-Gil González M, Gómez-Nieto A, Palacios-Martín T, et al. Epidemiology, risk factors and comorbidity for urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteria. *Int J Clin Pract*. Wiley Online Library; 2012;66(9):891–6.
96. Ena J, Arjona F, Martínez-Peinado C, del mar López-Perezagua M, Amador C. Epidemiology of urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Urology*. Elsevier; 2006;68(6):1169–74.

97. Lago A, Fuentefria SR, Fuentefria DB. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop. SciELO Brasil*; 2010;43(4):430–4.
98. Khanfar HS, Bindayna KM, Senok AC, Botta GA. Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: trends in the hospital and community settings. *J Infect Dev Ctries*. 2009;3(4).
99. Riaz S, Faisal M, Hasnain S. Prevalence and comparison of Beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from clinical and environmental sources in Lahore, Pakistan. *African J Microbiol Res*. 2012;6(2):465–70.
100. Ejaz H, Zafa A, Mahmood S, Javed MM. Urinary tract infections caused by extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *African J Biotechnol. Academic Journals (Kenya)*; 2013;10(73):16661–6.
101. Khan SA, Feroz F, Noor R. Study of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria from urinary tract infections in Bangladesh. *Tzu Chi Med J. Elsevier*; 2013;25(1):39–42.
102. Doi Y, Park YS, Rivera JI, Adams-Haduch JM, Hingwe A, Sordillo EM, et al. Community-associated extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in the United States. *Clin Infect Dis. Oxford University Press*; 2013;56(5):641–8.
103. Mendonça N, Leitão J, Manageiro V, Ferreira E, Caniça M. Spread of extended-spectrum β -lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother. Am Soc Microbiol*; 2007;51(6):1946–55.
104. Ferreira S, Paradela A, Diaz R, Rocha S, Ramalheira E. Detection of ESBL-producing Enterobacteriaceae during 2008-2010 in Aveiro, Portugal. *Clin Microbiol Infect. Blackwell Publishing Ltd*; 2011 May 1;17(s4):S108–S668.
105. Ferreira S, Diaz R, Rocha S, Paradela A, Ramalheira E. Prevalence of ESBL-producers causing urinary tract infections in Aveiro, Portugal. *Clin Microbiol Infect. Blackwell Publishing Ltd*; 2012 Apr 1;18(s3):114–715.
106. Magalhães S, Brandão C, Soares S, Ramalheira E, Ferreira S. Surveillance of ESBL-producing isolates in urine in elderly during a period of 3 years (2011-2013) in Aveiro, Portugal. *Publicação online no European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014.
107. Dias VC, Silva VL da, Firmo E de O, Bastos LQ de A, Bastos AN, Bastos RV, et al. Distribution of ESBL-producing enterobacteria associated to community-acquired monomicrobial urinary tract infections and antimicrobial susceptibility trends over a 9-year period. *J Chemother. Maney Publishing Suite 1C, Joseph's Well, Hanover Walk, Leeds LS3 1AB, UK*; 2012;24(3):178–81.
108. Grabe M, Bjerklund-Johansen TE, Botto H, Wullt B, Cek M, Naber KG, et al. Guidelines on Urological Infections - 2011. *Eur Assoc Urol*. 2011;112.
109. Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet. Elsevier*; 2005;365(9459):579–87.
110. Van de Sande-Bruinsma N, Grundmann H, Verloo D, Tiemersma E, Monen J, Goossens H, et al. Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerg Infect Dis. Centers for Disease Control*; 2008;14(11):1722.

111. Flanagan AD. Adverse effects of sodium colistimethate. *Ann Intern Med. Am Coll Physicians*; 1971;74(1):143–4.
112. Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother. SAGE Publications*; 1999;33(9):960–7.
113. Raz R, Chazan B, Kennes Y, Colodner R, Rottensterich E, Dan M, et al. Empiric use of trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) in the treatment of women with uncomplicated urinary tract infections, in a geographical area with a high prevalence of TMP-SMX-resistant uropathogens. *Clin Infect Dis. Oxford University Press*; 2002;34(9):1165–9.
114. Gupta K, Scholes D, Stamm WE. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. *Jama. American Medical Association*; 1999;281(8):736–8.
115. Weber G, Riesenberk K, Schlaeffer F, Peled N, Borer A, Yagupsky P. Changing trends in frequency and antimicrobial resistance of urinary pathogens in outpatient clinics and a hospital in Southern Israel, 1991–1995. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Springer*; 1997;16(11):834–8.
116. Ferreira S, Toleman M, Ramalheira E, Da Silva GJ, Walsh T, Mendo S. First description of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates carrying both *qnrA* and *qnrB* genes in Portugal. *Int J Antimicrob Agents. 2010*;35(6):584–6.
117. Bermejo J, Bencomo B, Arnesi N, Lesnaberes P, Borda N, Notario R. Alta correlación entre el consumo de ciprofloxacina y la prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido. *Rev Chil infectología. SciELO Chile*; 2006;23(4):316–20.
118. Tasbakan MI, Pullukcu H, Sipahi OR, Yamazhan T, Ulusoy S. Nitrofurantoin in the treatment of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*-related lower urinary tract infection. *Int J Antimicrob Agents. Elsevier*; 2012;40(6):554–6.
119. Cunha BA, Schoch PE, Hage JR. Nitrofurantoin: preferred empiric therapy for community-acquired lower urinary tract infections. *Mayo Clinic Proceedings. Mayo Foundation*; 2011. p. 1243.
120. Haldorsen BC, Simonsen GS, Sundsfjord A, Samuelsen Ø. Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6')-Ib. *Diagn Microbiol Infect Dis. 2014 Jan*;78(1):66–9.
121. Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Legnani D, Lombardi A, Gismondo MR. In vitro synergy and selection of resistance by fluoroquinolones plus amikacin or β -lactams against extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *In Vitro. 2013*;17(1).
122. Sharma S, Gupta A, Arora A. Cefepime Tazobactam: A new β lactam/ β lactamase inhibitor combination against ESBL producing gram negative bacilli. *Int J Pharm Biomed Sci. 2012*;2:35–8.
123. Spagnolo AM, Orlando P, Panatto D, Perdelli F, Cristina ML. An overview of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and control measures. *Rev Med Microbiol. 2014*;25(1).
124. Eser OK, Altun UH, Ergin A, Boral B, Sener B, Hascelik G. [Carbapenem resistance in ESBL positive Enterobacteriaceae isolates causing invasive infections]. *Mikrobiyol Bul. 2014*;48(1):59–69.

125. Adler M, Anjum M, Andersson DI, Sandegren L. Influence of acquired β -lactamases on the evolution of spontaneous carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* . 2013 Jan 1;68 (1):51–9.
126. Mudshingkar SS, Dedwal AK, Palewar MS, Dohe VB, Kagal AS, Bhardwaj RS. Cefepime/tazobactam-a promising BL-BLI combination against multidrug resistant Gram negative bacteria. *Int J Healthc Biomed Res*. 2014;2(3):127–8.
127. Ghafur A, Tayade A, Kannaian P. Clinical profile of patients treated with cefepime/tazobactam: A new β -lactam/ β -lactamase inhibitor combination. *J Microbiol Infect Dis*. 2012;2:79–86.

IX. ANEXOS

ANEXO I

Nº Processo	Nº Episódio	Preenchimento por laboratório				Preenchimento por CCI		Dias de Internamento
		Nome	Sexo	Data Nascimento	Serviço Requisitante	Serviço Internamento	Data internamento	
			Masculino	07-11-1932	CIRURGIA M	CIRURGIA M	08-04-2014	
			Feminino	18-01-1947	CIRURGIA M	CIRURGIA M	10-04-2014	
			Feminino	18-01-1947	CIRURGIA M	CIRURGIA M	10-04-2014	
			Feminino	18-01-1947	CIRURGIA M	CIRURGIA M	10-04-2014	
			Feminino	18-01-1947	CIRURGIA M	CIRURGIA M	10-04-2014	
			Masculino	27-03-1925	URGÊNCIA MÉDICA	MEDICINA 1	18-04-2014	
			Feminino	21-11-1940	INTERNA	UN. ESTARREJA - MEDICINA INTERNA	08-04-2014	
			Feminino	17-10-1934	CIRURGIA M	CIRURGIA M	23-04-2014	
			Masculino	30-05-1951	URGÊNCIA MÉDICA	MEDICINA 2	15-04-2014	
			Feminino	22-01-1980	OBSTETRICIA 1	OBSTETRICIA 1	21-04-2014	
			Feminino	13-03-1946	URGÊNCIA MÉDICA	MEDICINA 2	21-04-2014	
			Feminino	13-03-1946	URGÊNCIA MÉDICA	MEDICINA 2	21-04-2014	
			Masculino	04-02-1951	URGÊNCIA MÉDICA	UN. ESTARREJA - MEDICINA INTERNA	22-04-2014	
			Masculino	03-04-1937	CONSULTA EXTERNA	NÃO ESTEVE INTERNADO		
			Feminino	22-08-1937	INTERNA	UN. ESTARREJA - MEDICINA INTERNA	16-04-2014	
			Feminino	15-03-1972	CONSULTA EXTERNA	NÃO ESTEVE INTERNADO		
			Feminino	18-01-1947	CIRURGIA M	CIRURGIA M	10-04-2014	
			Feminino	18-01-1947	CIRURGIA M	CIRURGIA M	10-04-2014	
			Feminino	18-01-1947	CIRURGIA M	CIRURGIA M	10-04-2014	
			Feminino	18-01-1947	CIRURGIA M	CIRURGIA M	10-04-2014	
			Feminino	18-01-1947	CIRURGIA M	CIRURGIA M	10-04-2014	
			Masculino	22-06-1940	URGÊNCIA MÉDICA	MEDICINA 2	16-04-2014	
			Feminino	09-06-1933	MEDICINA 1	MEDICINA 1	21-04-2014	
			Feminino	09-06-1933	MEDICINA 1	MEDICINA 1	21-04-2014	
			Feminino	09-06-1933	MEDICINA 1	MEDICINA 1	21-04-2014	
			Feminino	09-06-1933	MEDICINA 1	MEDICINA 1	21-04-2014	
			Masculino	28-04-2013	URGÊNCIA PEDIÁTRICA	NÃO ESTEVE INTERNADO		

Figura A1: Base de dados de vigilância epidemiológica do CHBV (parte 1: dados demográficos)

Tipo de amostra	Preenchimento por Laboratório						Preenchimento por Laboratório	Preenchimento por Laboratório		
	Nº Hemoculturas pedidas no mesmo dia	Microorganismo	Toxina Clostridium	NºAmostra	Nº Exame (Vigi@ct)	Data do pedido	Duplicado	Resistências	BMR	Provável Contaminação
Pus		<i>Staphylococcus epidermidis</i>		530829	299699	18-04-2014				
Pus		<i>Citrobacter freundii</i>		530996	299961	21-04-2014				
Pus		<i>Enterobacter aerogenes</i>		530996	299961	21-04-2014				
Pus		<i>Enterobacter cloacae</i>		530996	299961	21-04-2014				
Pus		<i>Enterococcus faecium</i>		530996	299961	21-04-2014				
Hemocultura	2 (uma negativa)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		176229	299691	18-04-2014				PC
Hemocultura	2	<i>Micrococcus species</i>		530662	299545	17-04-2014				PC
Hemocultura	2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		530953	299847	20-04-2014				PC
Hemocultura	2 (uma negativa)	<i>Streptococcus intermedius</i>		175692	299299	15-04-2014				PC
Hemocultura	2	<i>Escherichia coli</i>		531126	300037	21-04-2014				
Hemocultura	2	<i>Escherichia coli</i>		177020	300039	21-04-2014				
Urina		<i>Escherichia coli</i>		177020	300041	21-04-2014				
Urina		<i>Escherichia coli</i>		177141	300155	22-04-2014				
Urina		<i>Escherichia coli</i>		327559	299899	21-04-2014				
Urina		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		530959	299924	21-04-2014		ESBL	sim	
Urina		<i>Enterococcus faecalis</i>		340992	299972	21-04-2014				
Pus		<i>Citrobacter braakii</i>		530924	299807	19-04-2014				
Pus		<i>Enterobacter aerogenes</i>		530924	299807	19-04-2014				
Pus		<i>Acinetobacter baumannii</i>		530924	299807	19-04-2014				
Pus		<i>Citrobacter braakii</i>		530923	299806	19-04-2014	duplicado			
Pus		<i>Enterobacter aerogenes</i>		530923	299806	19-04-2014	duplicado			
Pus		<i>Acinetobacter baumannii</i>		530923	299806	19-04-2014	duplicado			
Expectoração		<i>Staphylococcus aureus</i>		175954	299525	17-06-1940			sim	
Pus		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		531190	300149	22-04-2014				
Pus		<i>Morganella morganii</i>		531190	300149	22-04-2014		ESBL	sim	
Pus		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		531193	300151	22-04-2014	duplicado			
Pus		<i>Morganella morganii</i>		531193	300151	22-04-2014	duplicado	ESBL	sim	
Urina		<i>Escherichia coli</i>		177330	300249	23-04-2014				

Figura A2: Base de dados de vigilância epidemiológica do CHBV (parte 2: dados microbiológicos)

ANEXO II

Técnica de coloração diferencial pelo método de Gram

1. Preparação do isolado microbiano
 - 1.1. Colocar na lâmina uma gota de uma suspensão bacteriana e realizar um esfregaço;
 - 1.2. Fixar através do calor, passando a lâmina pela chama 2 a 3 vezes;
 - 1.3. Arrefecer a lâmina à temperatura ambiente antes de realizar a coloração;
2. Coloração do esfregaço
 - 2.1. Cobrir a lâmina com Violeta de Cristal, deixando o corante atuar por 1 minuto;
 - 2.2. Remover o corante primário, lavando gentilmente com água fria corrente;
 - 2.3. Cobrir a lâmina com o mordente (Iugol) e deixar atuar por 1 minuto;
 - 2.4. Remover o mordente, lavando suavemente com água corrente;
 - 2.5. Aplicar o descolorante (isopropanol-acetona) até que não saia mais corante do esfregaço;
 - 2.6. Lavar novamente de forma suave com água fria corrente;
 - 2.7. Cobrir a lâmina com o corante secundário (safranina) e deixar atuar durante 30 a 60 segundos;
 - 2.8. Lavar a lâmina com água corrente;
 - 2.9. Secar suavemente com papel absorvente ou, em alternativa, deixar secar ao ar;
 - 2.10. Observar ao microscópio na objetiva de imersão.

Interpretação:

- a) As bactérias Gram-negativas aparecem coradas de violeta;
- b) As bactérias Gram-positivas aparecem coradas de vermelho.

Nota: Durante o passo de fixação do esfregaço não sobreaquecer a lâmina, sob risco do aquecimento excessivo causar coloração atípica nas bactérias.

Fonte: Bula *BD Gram Stain Kits and Reagents*, Becton, Dickinson and Company, USA
Coloração proposta por Christian Gram, em 1884: Gram C. *The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations*. *Fortschr Med.* 1884; 2:185–9.

ANEXO III

Tabela A: Substratos utilizados na carta VITEK2 GNI, para identificação de bactérias Gram-negativas.

SUBSTRATO E QUANTIDADE (mg)		SUBSTRATO E QUANTIDADE (mg)	
Ala-Fe-Pro-Arilamidase	0.0384	Sacarose/Sucrose	0.3000
Adonitol	0.1875	D-Tagatose	0.3000
L-Pirrolidonil-Arilamidase	0.0180	D-Trealose	0.3000
L-Arabitól	0.3000	Citrato (Sódio)	0.0540
D-Celobiose	0.3000	Malonato	0.1500
Beta-Galactosidase	0.0360	5-ceto-D-Gluconato	0.3000
Produção de H ₂ S	0.0024	Alcalinização do L-Lactato	0.1500
Beta-N-Acetil-Glucosaminidase	0.0408	Alfa-Glucosidase	0.0360
Glutamil Arilamidase pNA	0.0324	Alcalinização do succinato	0.1500
D-Glucose	0.3000	Beta-N-Acetil-Galactosaminidase	0.0306
Gama-Glutamil-Transferase	0.0228	Alfa-Galactosidase	0.0360
Fermentação da Glucose	0.4500	Fosfatase	0.0504
Beta-Glucosidase	0.0360	Assimilação da Glicina Arilamidase	0.0120
D-Maltose	0.3000	Ornitina Descarboxilase	0.3000
D-Manitol	0.1875	Lisina Descarboxilase	0.1500
D-Manose	0.3000	Base Descarboxilase	NA
Beta-Xilosidase	0.0324	Assimilação da L-Histidina	0.0870
Beta-Alanina Arilamidase pNA	0.0174	Cumarato	0.1260
L-Prolina Arilamidase	0.0234	Beta-Glucoronidase	0.0378
Lipase	0.0192	Resistência O/129	0.0105
Palatinose	0.3000	Glu-Gli-Arg-Arilamidase	0.0576
Tirosina Arilamidase	0.0276	Assimilação de L-Malato	0.0420
Urease	0.1500	Reagente de Ellman's	0.0300
D-Sorbitol	0.1875	Assimilação do L-Lactato	0.1860

NA: Não aplicável

Fonte: Bula da carta GNI, BioMérieux

ANEXO IV

Tabela B: Carta VITEK2 AST-N192 para antibiograma de microorganismos Gram-negativos. Esta carta destina-se a ser utilizada com os sistemas VITEK2, como teste *in vitro* para determinação da sensibilidade de bacilos Gram-negativos aeróbios a agentes antimicrobianos.

Antibiótico	Concentração µg/mL	Intervalo da CMI	
		≤	≥
Amicacina	8, 16, 64	2	64
Amoxicilina / Ác. 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
Teste 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
Tripetoprim / Sulfametoxazole	1/19, 4/76, 16/304	1/19	16/304

FEP: Cefepima; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; CA: Ácido clavulânico; NEG: Negativo; POS: Positivo;

Notas: Concentrações equivalentes ao método padrão em eficácia.

Um resultado positivo no teste ESBL deve ser interpretado como de resistência a todas as penicilinas, aztreonam e cefalosporinas. Um resultado negativo não exclui a presença de uma ESBL, que pode estar mascarada por uma β-lactamase AmpC.

Confirmar resultados com método complementar para as seguintes combinações de antibiótico/microorganismo: Amicacina - *A. baumannii*

Amoxicilina/Ác. Clavulânico - *Providencia* spp.

Ampicilina - *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Pantoea* spp., *Serratia* spp. e *Cronobacter sakazakii*

Piperacilina/Tazobactam: *S. marcescens*

Fonte: Bula AST-N192, BioMérieux

ANEXO V

Tabela C: Carta VITEK2 AST-N222 para antibiograma de microorganismos Gram-negativos. Esta carta destina-se a ser utilizada com os sistemas VITEK2, como teste *in vitro* para determinação da sensibilidade de bacilos Gram-negativos aeróbios a agentes antimicrobianos.

Antibiótico	Concentração µg/mL	Intervalo da CMI	
		≤	≥
Amicacina	8, 16, 64	2	64
Aztreonam	2, 8, 32	1	64
Cefepima	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 / Ác. Clavulânico	8/2, 32/2, 64/2	8/2	128/2
Tobramicina	8, 16, 64	1	16
Tripetoprim / Sulfametoxazole	1/19, 4/76, 16/304	1/19	16/304

Notas: Concentrações equivalentes ao método padrão em eficácia.

Fonte: Bula AST-N222, BioMérieux