

Agradecimentos

Professora Doutora Helena Neto Ferreira

Obrigada por ter aceitado orientar este meu percurso e pela generosidade com que partilhou comigo os seus conhecimentos.

Doutora Fernanda Teixeira

À minha amiga incondicional muito obrigada pela disponibilidade permanente para me ajudar.

Família

Obrigada à minha querida família, meu suporte físico e emocional, pai Ben, mãe Né, irmão Pedro, filhos Zézé e Jãojão, destacando-se a ajuda indispensável e constante do meu marido Jonas.

Resumo

As *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamase de espectro alargado têm sido consideradas importantes agentes patogénicos hospitalares durante as últimas décadas. Hoje em dia a disseminação da resistência na comunidade é uma verdadeira ameaça, nomeadamente em nichos específicos, como os lares para idosos. A colonização fecal de pessoas saudáveis, principalmente com enzimas do tipo CTX-M, é uma realidade que pode comprometer o controlo de infecção nos cuidados de saúde hospitalares e na prestação de cuidados continuados. Assim, o rastreamento de portadores de *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases de espectro alargado na admissão hospitalar é de grande importância na detecção de surtos nas enfermarias, particularmente, nas de maior risco. Outros genes de resistência são também disseminados horizontalmente sendo a multiresistência uma realidade nesses isolados. A contribuição de animais, domésticos e selvagens, para a disseminação é outra ligação que já foi a bordada na transmissão entre espécies de estirpes multiresistentes de humano para animal e vice-versa. Outra contribuição para a dispersão pode ser os produtos alimentares.

A colonização fecal de crianças com *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamase de espectro alargado é uma realidade já relatada em Portugal que pode comprometer a admissão pediátrica hospitalar e o tratamento das infecções por estas estirpes.

Esta realidade deve ser tomada em conta na prática clínica na comunidade, com consequências nos tratamentos empíricos adequados, nomeadamente nas infecções do tracto urinário, por estas estirpes, devido à limitação terapêutica. Também na admissão hospitalar de grupos específicos da população deve-se ter em conta a probabilidade de colonização fecal por *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamase de espectro alargado. Isto é um novo desafio da saúde pública para os médicos, laboratórios de microbiologia, hospitais e serviços de saúde em geral.

Palavras-chave: Resistência aos antibióticos, beta-lactamases de espectro alargado, disseminação.

Abstract

Extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* have been considered important nosocomial pathogens during the last decades. Nowadays community dissemination of this resistance threat is a reality namely in particular niches, as old people care settings. Fecal colonization of healthy people, mostly with CT XM-type enzymes, is a reality that might compromise effective infection control in acute care hospitals and long term care facilities and in that way, extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* carriers screening on hospital admission, might be of importance in detection of outbreak installation in particular wards. Other resistance genes are also dispersed most of the times horizontally and multi-resistance is a reality in these isolates. Contribution of animals, domestic and wild, for dissemination is another link that has already been addressed showing inter-species transmission of these multiresistant strains from human to animal and vice versa. Another contribution for dispersion might be food products.

Fecal colonization of children with Extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* is a reality already reported in Portugal that might compromise paediatric hospital admission and treatment of infection by these strains.

This reality should be addressed in community clinical practice with consequences in terms of adequate empirical treatment namely in urinary tract infections, by these strains, because of restriction of active antibiotics. Also hospital admission of particular population settings should consider the probability of Extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* fecal colonization. This is a new Public health challenge for clinicians, microbiology laboratories, hospitals and in general the health care setting.

Keywords: Antibiotic resistance, extended-spectrum beta-lactamases, dissemination.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice	iv
Lista de Abreviaturas e Símbolos	v
Introdução	1
Contribuição do Laboratório de Microbiologia para a detecção de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de beta-lactamases de espectro alargado	2
Contributos para a disseminação de resistência	6
Contributo dos alimentos e da produção animal para a disseminação de estirpes produtoras de ESBLs	15
Contributo dos animais selvagens para a disseminação de estirpes produtoras de ESBLs	25
Contributo dos animais de estimação para a disseminação de estirpes produtoras de ESBLs	30
Contributo de diversos ambientes para a disseminação de estirpes produtoras de ESBLs	31
Disseminação de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBL na comunidade	35
Unidades prestadoras de cuidados de saúde e hospitais, a maior origem de ESBLs	46
Rastreio na admissão Hospitalar	51
Disseminação de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBL nas crianças	56
Tratamento	63
Conclusão	78
Referências Bibliográficas	79

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ACF	Cuidados intensivos
AmpC	Beta-lactamase do tipo AmpC
ATCC	American Type Culture Collection
<i>bla</i>	Genes de beta-lactamase
CB	Bacteremia da comunidade
CFU	Unidades formadoras de colónias
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CM	Amostras de carcaças de galinha não cozinhadas
CMY	Beta-lactamase do tipo CMY
CRATAS	Centro de Recepção, Acolhimento e Tratamento de Animais Selvagens
CSF	Líquido cefalorraquidiano
CTX	Cefotaxima
CTX-M	Beta-lactamase do tipo CTX-M
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i> -MDR	<i>Escherichia coli</i> produtoras de ESBLs resistentes a fluoroquinolonas
EGNR	Bacilos entéricos de gram negativo
ERIC-PCR	Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase
ESBL	Extended-spectrum beta-lactamase
ESBLEC	<i>Escherichia coli</i> produtoras de beta-lactamase de espectro alargado
ESBL-KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de ESBLs
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and Drug Administration
HB	Bacteremia hospitalar
HCF	Amostras de fezes de galinhas saudáveis
HSF	Amostras de fezes de suínos saudáveis
ICBAS	Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
ICs	Casos índice
ICU	Unidade de cuidados intensivos
IFs	Formulas Infantis
<i>intl1</i>	Integron Integrase <i>intl1</i>
<i>intl2</i>	Integron Integrase <i>intl2</i>
LTCF	Instituições de cuidados de saúde por tempo prolongado
LTCF-B	Bacteremia de instituições prestadoras de cuidados de saúde por tempo prolongado
MBLs	Metalo-beta-lactâmicos
MDR	<i>Enterobacteriaceae</i> resistentes a multidrogas
MIC	Concentração mínima inibitória
MIC ₅₀	Concentração mínima inibitória para 50% dos isolados
MIC ₉₀	Concentração mínima inibitória para 90% dos isolados
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistente
NAG	N-acetilglucosamina

NAL	Ácido nalidíxico
NAM	Ácido N-acetilmurâmico
NICU	Unidade de cuidados intensivos neonatais
NIs	Infecções nosocomiais
OXA	Beta-lactamase do tipo OXA
PBPs	Penicillin-binding proteins
PCR	Polymerase chain reaction
PCR-RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
QSNICH	Queen Sirikit National Institute of Child Health
RAPD	Random amplified polymorphic DNA analysis
RAPD	Análise aleatória amplificada de DNA polimórfico
SHV	Beta-lactamase do tipo SHV
ST	Tipo de sequência
TEM	Beta-lactamase do tipo TEM
TMP-SXZ	Trimetoprim-sulfametoxazol
UTI	Infecção do tracto urinário
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µg	Micrograma

Introdução

A resistência bacteriana aos antibióticos é uma realidade preocupante nos últimos tempos, particularmente em relação a determinados agentes patogénicos como são as *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases de espectro alargado. A realidade da disseminação desta ameaça de Saúde Pública tem vindo a merecer a atenção da comunidade científica internacional de forma a conhecer a realidade da sua dispersão. Neste sentido, foi objectivo deste trabalho a recolha da informação internacional publicada recentemente que possa contribuir para a explicitação das várias contribuições para a disseminação comunitária deste tipo de isolados, quer provocando infecção quer colonizando a população.

Contribuição do Laboratório de Microbiologia para a detecção de *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases de espectro alargado

No Laboratório de Microbiologia são processados vários produtos, biológicos, alimentares e de outras origens, para identificar e determinar o perfil de susceptibilidade aos antibióticos do(s) agente(s) patogénico(s) isolados. Dos estudos microbiológicos pretende-se que os resultados obtidos *in vitro* sejam o mais próximo possível do que se passa *in vivo*, não esquecendo que falta a interacção do microrganismo com o hospedeiro que é muito complexa e está longe de ser completamente compreendida e não é possível ser simulada laboratorialmente. O que se sabe é que a interacção entre estas duas entidades vivas desempenha um importante papel na prática do diagnóstico microbiológico e no controlo de doenças infecciosas. O Laboratório de Microbiologia fornece dados sobre resistências as quais às vezes não são as esperadas. Os resultados obtidos permitem aos clínicos a selecção da terapêutica mais adequada ao tratamento, substituindo os agentes de largo espectro e de alto custo, por vezes seleccionados empiricamente, que têm consequências indesejáveis quando usados por períodos de tempo prolongados. A relação das bactérias com o hospedeiro não é de agressão, mas sim de sobrevivência e reprodução e alguns conceitos deverão ser clarificados. Um microrganismo comensal é o que vive no/ou com outro organismo no qual tem benefício sem causar dano. A colonização é a presença contínua de bactérias durante um período de tempo, sem agressão nem invasão dos tecidos; "infecção controlada", hospedeiro e microrganismo desenvolvem uma relação de comensalismo. A infecção é provocada por qualquer microrganismo que causa doença; a maioria dos agentes deriva da própria flora comensal e/ou colonizante, havendo multiplicação, invasão e persistência dos microrganismos no hospedeiro podendo conduzir a situação de doença do hospedeiro (Murray *et al.*, 2003).

Os bacilos entéricos de gram negativo compreendem um grande número e género de bactérias muito semelhantes quanto ao seu "habitat", estrutura e biologia mas que diferem substancialmente quanto à sua virulência, quadros de doença que causam e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. A necessidade de uma identificação correcta das estirpes isoladas é pois fundamental para avaliar o prognóstico da doença e orientar a terapêutica. As semelhanças entre os diversos bacilos entéricos têm como consequência a quase inexistência de caracteres exclusivos de grupo (marcadores) obrigando portanto à necessidade de recorrer ao estudo de um grande número de caracteres bioquímicos e outros para a sua caracterização. Os bacilos de gram negativo

entéricos partilham um grande número de características: são bacilos de gram negativo não esporulados, cujo “habitat” é o intestino, pouco exigentes nutricionalmente, isto é, crescem em meios simples. Dentro dos bacilos entéricos a família Enterobacteriaceae compreende importantes bactérias patogénicas, patogénicas oportunistas e comensais distingue-se dos outros grupos por algumas características fundamentais:

- metabolismo energético fermentativo;
- a maior parte são anaeróbios facultativos crescendo em aerobiose e anaerobiose e fermentam a glicose com ou sem a produção de gás;
- possibilidade de utilização dos nitratos como aceptadores finais de electrões na cadeia respiratória reduzindo-os a nitritos ou azoto molecular;
- ausência de citocromo oxidase (reacção de pesquisa das oxidases negativa);
- quando são móveis possuem flagelos peritricos (Texto de Apoio às Aulas Teóricas de Microbiologia Médica do ICBAS, 1993/ 1994).

O tratamento das infecções bacterianas é cada vez mais complicado porque as bactérias desenvolvem resistência aos antimicrobianos. Estes são frequentemente classificados de acordo com o seu mecanismo de acção principal. Os principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos são:

- interferência com a síntese da parede celular (betalactâmicos e glicopeptídeos);
- inibição da síntese proteica (macrólidos e tetraciclina);
- interferência com a síntese dos ácidos nucleicos (fluoroquinolonas e rifampicina);
- inibição de uma via metabólica (trimetoprim-sulfametoxazol);
- desorganização da estrutura da membrana citoplasmática (polimixinas e daptomicina) (Tenover *et al.*, 2006).

Os antibióticos beta-lactâmicos têm uma utilização terapêutica generalizada dada a sua fraca toxicidade, características farmacocinéticas e actividade antimicrobiana. Sendo dos agentes antimicrobianos mais usados em todo o mundo, não é de estranhar que, nas últimas décadas após a introdução de antibióticos de largo espectro antibacteriano, se tenha observado resistência a cefalosporinas de terceira e quarta geração, monobactams e carbapenems, o que constitui actualmente, e para futuro, um enorme problema. As cefalosporinas podem dividir-se em gerações de acordo com o seu desenvolvimento no tempo e de espectro de acção, fruto da necessidade de ultrapassar a resistência que foi surgindo ao longo do tempo devido à evolução das beta-lactamases. Assim, à medida que se alarga o espectro de acção contra bacilos gram negativo, perde-se actividade contra bactérias gram positivo. Alguns exemplos de cefalosporinas:

- 1ª geração: cefadroxil, cefalexina, cefatrizina, cefradina
- 2ª geração: cefaclor, cefeprozil, cefonicida, cefoxitina (cefamicina), cefuroxima
- 3ª geração: cefixima, cefodizima, cefotaxima, ceftazidima, ceftibuteno, ceftriaxona
- 4ª geração: cefepime, cefpiroma

Os antibióticos beta-lactâmicos englobam quatro grandes grupos: as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactams e os carbapenems. Todos têm em comum o anel beta-lactâmico. Os radicais alteram o espectro de acção, a resistência ao suco gástrico (via oral ou parenteral) e a farmacocinética. Os antibióticos beta-lactâmicos têm como alvo de acção a parede celular bacteriana. A parede bacteriana envolve a célula, dando corpo ao microrganismo, e localiza-se externamente à membrana citoplasmática. Nas bactérias de gram positivo esta parede é constituída por uma camada grossa de peptidoglicano. Nas bactérias de gram negativo esta camada é mais fina e com uma membrana externa. Esta membrana apresenta canais formados por proteínas, que se denominam porinas, e por onde entram os compostos hidrofílicos, como os antibióticos beta-lactâmicos. No caso de bactérias de gram positivo a “barreira” da membrana externa lipofílica não se coloca. O peptidoglicano é uma molécula que só existe nas células bacterianas. É constituído por unidades repetidas de N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM), a que está ligada uma cadeia de aminoácidos. Um aminoácido liga-se com o outro da cadeia adjacente, formando uma rede que envolve a bactéria. As enzimas que catalisam este “cross-linking” são denominadas “penicillin-binding proteins” (PBPs), e são elas o alvo específico dos beta-lactâmicos. A inactivação das PBPs leva à

inibição da síntese do peptidoglicano, induzindo a lise celular, por isso os beta-lactâmicos são considerados bacteriolítico (<http://www.farbeira.pt/Portals/farbeira/documentos/Artigo%20Plural%20GJ%20Silva%20Resist%C3%Aancia.pdf>).

Contributos para a disseminação de resistência

Os genes de resistência adquirida podem tornar a bactéria capaz de produzir enzimas que destroem o fármaco antibacteriano, capaz de expressar sistemas de efluxo que evitam que o fármaco alcance o alvo, capaz de modificar o alvo de acção do fármaco ou produzir um caminho metabólico alternativo que contorna a sua acção. A resistência bacteriana a antibióticos beta-lactâmicos pode dever-se a três mecanismos principais: impermeabilidade, produção de beta-lactamases e alteração do local de acção. A resistência a os antibióticos beta-lactâmicos nos bacilos de gram negativo é maioritariamente mediada por beta-lactamases. Estas inactivam os agentes antimicrobianos por hidrólise do anel beta-lactâmico. As carboxipeptidases são enzimas elaboradas por um grande número de microrganismos, particularmente bactérias, e têm como missão romper, de forma transitória, a própria parede bacteriana para permitir intercalar blocos de mureína necessários para o crescimento e multiplicação. Por outro lado existem grandes analogias entre as beta-lactamases e as proteínas fixadoras de penicilinas (PBPs) o que sugere a existência de uma origem comum. Foram descritas, até à data, centenas de beta-lactamases diferentes. As mais importantes são as cefalosporinases plasmídicas e as ESBLs - extended-spectrum beta-lactamases (Forbes *et al.*, 2007).

As beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs) são classificadas geralmente de acordo com dois esquemas: a classificação molecular (estrutural) de Ambler e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros. O esquema de Ambler divide as ESBLs em quatro classes, de A a D. Esta classificação baseia-se na homologia proteica e não nas características fenotípicas. Na classificação de Ambler, as beta-lactamases da classe A, C, e D são beta-lactamases de serina. As beta-lactamases de classe B são metalo-enzimas. A classificação de Bush-Jacoby-Medeiros é de acordo com a semelhança funcional (substrato e perfil inibidor); este esquema é de maior relevância para os médicos ou microbiologistas no diagnóstico laboratorial porque são considerados relevantes clinicamente os inibidores de beta-lactamases e os substratos beta-lactâmicos. Não há consenso na definição das ESBLs. A comumente usada é que as ESBLs são beta-lactamases capazes de conferir resistência às penicilinas e às cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, e ao aztreonam (mas não às cefamicinas ou aos carbapenemos) por hidrólise destes antibióticos, e são inibidas pelo ácido clavulânico, isto é, degradam os oximiino-beta-lactâmicos e são inibidas pelo ácido clavulânico. Esta propriedade diferencia as ESBLs das beta-lactamases tipo AmpC

(grupo 1) produzidas por organismos tais como *Enterobacter cloacae* em que as cefalosporinas de terceira geração são o seu substrato mas não são inibidas pelo ácido clavulânico. As cefalosporinas de quarta geração, por exemplo o cefepime, são usadas no tratamento contra organismos produtores de beta-lactamases AmpC, mas são menos usadas no tratamento de organismos produtores de ESBLs pois podem ser degradadas pelas ESBLs. Existem vários tipos de ESBLs: SHV, TEM, CTX-M, OXA e outras. As ESBLs do tipo SHV (variável sulfidril), hidrolisam melhor a cefotaxima do que a ceftazidima. As primeiras beta-lactamases tipo TEM (doente grego chamado Temoniera) não são ESBLs, como por exemplo as TEM-1, TEM-2, e TEM-13, mas uma mutante, a TEM-3, é uma ESBL porque tem actividade sobre a cefotaxima. As ESBLs tipo CTX-M têm uma potente actividade hidrolítica sobre a cefotaxima e alta eficiência hidrolítica sobre o cefepime sendo actualmente as mais espalhadas mundialmente. O tazobactamo tem uma actividade inibidora sobre estas enzimas dez vezes maior do que o ácido clavulânico. As ESBLs tipo OXA hidrolisam a oxacilina; as primeiras não eram ESBLs mas apareceram mutantes como as OXA-11, -14, -16 em que elas têm uma forte resistência à cefotaxima e, às vezes, à ceftazidima e ao aztreonam (Paterson and Bonomo, 2005).

A actual versão da classificação das beta-lactamases atingiu um alto nível de complexidade, tornando-se menos acessível aos médicos, profissionais do controlo de infecção e da gestão hospitalar. Do ponto de vista clínico, uma revisão do esquema de nomenclatura torna-se necessária. A designação beta-lactamases de espectro alargado atingiu um público mais amplo ao longo do tempo, mas actualmente está restrita à classe 2be funcional /classe A molecular, enzimas inibidas pelo ácido clavulânico com actividade contra as cefalosporinas de espectro alargado. Uma nova classificação proposta amplia a definição de ESBL para outras beta-lactamases importantes adquiridas clinicamente com actividade contra cefalosporinas de espectro alargado e/ou carbapenemos. A classe A clássica de ESBLs foi designada nesta classificação por ESBLA, enquanto as ESBLs OXA e Amp C mediadas por plasmídeos são classificadas como ESBLs “miscelânea” (ESBL_M). Por último, as carbapenemases foram designadas por ESBL_{CARBA}, as ESBLs com actividade hidrolítica contra os carbapenemos. Esta classificação simplificada pode incentivar novos grupos de profissionais de saúde a participarem no esforço para impedir a propagação de beta-lactamases adquiridas. O número crescente de beta-lactamases altamente eficientes desafia todos os profissionais de saúde de várias maneiras. Os problemas decorrentes da complexidade da actual terminologia científica poderia ter uma

solução relativamente simples através do estabelecimento de uma terminologia de beta-lactamases simplificada para uso clínico e controlo de infecção. Na verdade, esta foi recentemente sugerida por Livermore, que lançou uma ampla definição de ESBL, em que se deve mencionar sempre a família da enzima, por exemplo TEM-ESBL ou OXA-ESBL. Embora esta seja uma estratégia adequada para as publicações científicas, esta abordagem ainda exige que os grupos de diversos profissionais de saúde necessitem de se relacionar com os nomes de um grande número de famílias de enzimas. Deve ser considerado que a resposta do controlo de infecção será semelhante, independentemente do tipo de beta-lactamase. Assim, poderia argumentar-se que, mesmo com termos mais simplificados é necessária uma definição mais alargada de ESBL. Parece ser prudente preservar a designação ESBL uma vez que já é muito utilizada. Um certo nível de discriminação seria necessário na nova classificação de beta-lactamases. Para a maioria das classes de ESBL, falta um consenso internacional sobre os testes fenotípicos e genotípicos apropriados e deve ser uma tarefa prioritária nacional e internacional que as comissões de metodologia trabalhem em criar orientações. As opções de tratamento de isolados que têm várias categorias de beta-lactamases com beta-lactâmicos, podem variar substancialmente entre as diferentes variantes de enzimas em cada um dos grupos. Geralmente, isolados que têm ESBL_A e ESBL_M são resistentes à maioria dos beta-lactâmicos, exceto aos carbapenemos, e quanto a isolados com ESBL_{CARBA} em muitos casos, são resistentes a todos os beta-lactâmicos. No entanto, há uma série de exceções a esta regra geral, e os autores acreditam que a selecção da terapia não deve ser determinada pela enzima ESBL detectada, mas sim pelo resultado dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Possivelmente, o agrupamento de beta-lactamases num esquema de classificação simplificada pode excluir diferenças importantes entre as várias categorias das enzimas dentro dos grupos. Contudo, esta proposta dum “esquema pragmático” não se destina a substituir a classificação actual, mas sim a complementá-la para o benefício dos profissionais de saúde que não estão directamente envolvidos na pesquisa das beta-lactamases. O esquema seria uma poderosa ferramenta para os profissionais do controlo de infecção e para os cientistas da saúde pública, visando determinar o impacto clínico e económico de transmissão das beta-lactamases. Para os clínicos de doenças infecciosas, a classificação poderia fornecer uma estrutura para melhorar a compreensão das inter-relações entre as beta-lactamases clinicamente importantes com o grande impacto das terapias empíricas e rotinas de tratamento, que não devem ser combatidas só pelo pessoal do controlo de

infecção. Acredita-se que a nova classificação incentivará novos grupos, a fim de tentar evitar maior disseminação destes determinantes de resistência (Giske *et al.*, 2009).

No final de 2009, o número de sequências proteicas exclusivas para beta-lactamases excedeu 890. Assim, é importante ser estabelecido um processo sistemático para monitorizar estas enzimas. A classificação das beta-lactamases tem sido tradicionalmente baseada tanto nas características funcionais das enzimas como na sua estrutura primária. A forma mais simples de classificação é por sequência proteica, em que as beta-lactamases são classificadas em quatro classes moleculares, A, B, C e D, com base na conservação e na distinção dos aminoácidos. As classes A, C e D incluem enzimas que hidrolisam os substratos, formando uma enzima ativa através da serina, enquanto as beta-lactamases da classe B são metalo-enzimas que utilizam pelo menos um íon de zinco para facilitar a hidrólise de beta-lactâmicos. Embora uma abordagem estrutural seja mais fácil e menos controversa de classificar esta diversidade de enzimas, uma classificação funcional permite relacionar esta variedade de enzimas no seu papel clínico, ou seja, proporcionando resistência selectiva para diferentes classes de antibióticos beta-lactâmicos. Os grupos funcionais, podem ser mais subjectivos do que as classes estruturais, mas auxiliam o médico e o microbiologista na relação das propriedades de uma enzima específica com o perfil de resistência observado num isolado clínico. Historicamente, a funcionalidade tem sido o elemento essencial na definição do papel de uma beta-lactamase em particular em ambientes clínicos. Assim, parece adequado continuar a agrupar estas diferentes enzimas de acordo com as suas propriedades hidrolíticas e de inibição. Idealmente, uma relação forte estrutura - função deve ser observada entre os diversos grupos de beta-lactamases. O resultado ideal seria um esquema de categorização que coloca todas as beta-lactamases numa grelha de classificação única e alinhada a estrutura e função. Este tipo de relacionamento está a começar a ser realizado com os metalo-beta-lactâmicos. No entanto, no momento actual, muitas beta-lactamases são descritas apenas com base numa sequência de proteínas, com pouco da descrição funcional. Portanto, um conjunto de critérios foi proposto para a descrição de uma nova beta-lactamase, incluindo as informações estruturais e funcionais. As razões para a diversidade das beta-lactamases são muitas. Pelo menos as variedades baseadas na serina são enzimas antigas, estimando-se que vêm evoluindo há mais de 2 bilhões de anos a partir do momento anterior à separação das bactérias em gram negativo e gram positivo. Elas são encontradas em bactérias que vivem numa grande variedade de ambientes e, portanto, estão sujeitas a diferentes pressões selectivas.

Estas enzimas estão bem estudadas uma vez que têm atraído a atenção de muitos investigadores desde que foram descritas há 70 anos. São enzimas adaptáveis que evoluíram para evitarem os compostos inibidores e destinam-se ao ataque dos antibióticos beta-lactâmicos concebidos para resistir à sua acção. Finalmente, os genes *bla* têm lucrado com os diversos mecanismos de transferência horizontal de genes entre as bactérias que se espalharam para novos hospedeiros e tornaram-se parte de plasmídeos multirresistentes hoje comuns em isolados clínicos resultantes da disseminação “promíscua”. Tendo em conta estes factores, é uma previsão segura que as beta-lactamases continuarão a evoluir, assim como os sistemas de classificação para a sua descrição (Bush and Jacoby, 2010).

Algumas bactérias são naturalmente resistentes a alguns antibióticos, mas a resistência bacteriana é normalmente associada à resistência adquirida pelas bactérias. Esta pode ser adquirida através de mutações que ocorrem numa baixa frequência. Contudo, se a mutação for favorável à sobrevivência da bactéria, aquela manter-se-á nas gerações seguintes. Este tipo de resistência adquirida ocorre, por exemplo, no bacilo da tuberculose. No entanto, a forma mais comum de adquirir resistência aos antibacterianos é através da aquisição de DNA exógeno, a que se chama transferência horizontal de genes referida por Bush and Jacoby. Os mecanismos são: i) a transformação, em que a bactéria adquire DNA do meio-ambiente; ii) a transdução, em que fagos (vírus que infectam bactérias) ao recombinar o seu material genético com o DNA bacteriano adquirem genes de resistência bacterianos, transportando-os no seu genoma e transferindo-os para outras bactérias quando as infectam; iii) a conjugação, transferência de plasmídeos entre estirpes ou espécies bacterianas diferentes. Estes são pequenas moléculas de DNA, não pertencentes ao cromossoma, com replicação autónoma, que podem conter vários genes de resistência aos antibióticos e de factores de virulência. Os plasmídeos são considerados elementos genéticos móveis, que por sua vez podem integrar outros elementos móveis como integrões e/ou transposões contendo genes de resistência. Estes podem existir também no cromossoma. Com estes elementos é possível que genes contidos em plasmídeos possam “saltar” para o cromossoma, e ser definitivamente integrados no DNA cromossómico bacteriano, e vice-versa, além de terem a capacidade de integrar novos genes de resistência. A mobilidade genética é um assunto complexo, mas deveras interessante para se compreender como é feita a selecção de diversos genes. Estes elementos genéticos móveis contêm normalmente genes que codificam a resistência a diversos grupos de antimicrobianos. Este facto pode

significar que a restrição do uso de um dado antimicrobiano nem sempre leva à erradicação da estirpe resistente, se no mesmo elemento móvel existirem outros genes de resistência a outras classes de antibióticos. Por exemplo, os integroões integram frequentemente genes de resistência a diversos grupos de beta-lactâmicos e de aminoglicosídeos. Os genes de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos encontram-se em todos estes elementos genéticos móveis, o que permite explicar o elevado aumento da resistência a estes antibióticos e disseminação por variadas espécies bacterianas ao longo dos anos. (<http://www.farbeira.pt/Portals/farbeira/documentos/Artigo%20Plural%20GJ%20Silva%20Resist%C3%Aancia.pdf>)

Os plasmídeos são elementos genéticos capazes de replicação autónoma, que podem codificar funções muito diferentes, localizados no citoplasma bacteriano, constituído por DNA, de tamanho muito variável. A maioria dos plasmídeos é transferida por conjugação (pelo contacto através do “pili sexual” ou ponte de união entre a bactéria dadora e a receptora). Com o objectivo da célula dadora não perder o plasmídeo, este duplica-se antes do fenómeno de conjugação, ficando as duas bactérias portadoras do plasmídeo. Algumas bactérias possuem pequenos plasmídeos capazes de serem transferidos por fagos (transdução). Geralmente codificam beta-lactamases indutíveis. Também está descrita a existência de plasmídeos de maior tamanho que codificam a síntese de beta-lactamases e a resistência a outros antibióticos. Uma bactéria pode ter mais de um plasmídeo sempre que estes pertencem a diferentes grupos de compatibilidade, visto que, ao competirem pela mesma função bioquímica um deles terá que ser segregado. Os transposões são também determinantes de resistência bacteriana aos antibióticos. O material genético (DNA) que codifica estas propriedades é capaz de “saltar” de um plasmídeo para outro plasmídeo, de um plasmídeo para o cromossoma ou do plasmídeo para um bacteriófago. A sua replicação não precisa de homologia entre a célula dadora e receptora. O transposo não só cria o seu próprio lugar de inserção como o seu “desprendimento” de um material genético e posterior “ligação” a outro que está seguramente catalisado por enzimas codificadas pelo próprio transposo. Ao contrário da resistência bacteriana a antibióticos adquirida por mutação, que é “pontual” e dificilmente transferível, a resistência adquirida por um plasmídeo ou transposo pode ser múltipla a vários antibióticos e é transferível, fundamentalmente por conjugação, a outras bactérias da mesma ou de diferente espécie. A resistência cromossómica, não transferível, só se expressará mediante pressão selectiva do antibiótico que, ao eliminar as células sensíveis, põe em evidência a população resistente. Genes de resistência a antibióticos,

antes associados a plasmídeos ou cromossomas, em forma não transferível, podem unir-se a um plasmídeo transferível. Igualmente, um determinante de resistência “transposável” pode ser unido a um genoma de bacteriófago e dispersar-se desta forma (Forbes *et al.*, 2007).

A *E. coli*, um membro da Família *Enterobacteriaceae*, é um habitante comum do intestino dos humanos e animais. É o mais comum dos bacilos de gram negativo causadores de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade. A difusão da resistência aos antibióticos tem sido reconhecida em isolados de *E. coli* de origem humana, animal e ambiental. Embora a taxa de prevalência de estirpes de *E. coli* resistentes seja significativamente distinta em várias populações e ambientes, o impacto da resistência aos antimicrobianos é uma realidade (von Baum and Marre, 2005).

O microrganismo resistente é o que adquire resistência a antibióticos aos quais era anteriormente sensível. A heterogeneidade da expressão da resistência causa problemas na detecção de estirpes resistentes e dificulta a execução da terapêutica adequada. Cada antibiótico é caracterizado por um espectro natural de actividade antibacteriana. Este espectro compreende as espécies bacterianas que, no estado natural, têm o seu crescimento inibido por concentrações de antibióticos susceptíveis de serem atingidas *in vivo* (naturalmente sensíveis). A resistência natural é um carácter constante de todas as estirpes de uma mesma espécie bacteriana que permite prever a inactividade e ajudar a identificação. A resistência adquirida é uma característica própria de certas estirpes, no seio de uma espécie bacteriana sensível, cujo património genético foi alterado pela mudança ou aquisição de um gene. Contrariamente às resistências naturais, são evolutivas e a sua frequência é, por vezes, dependente da utilização dos antibióticos. A concentração mínima inibitória (MIC) de um agente antimicrobiano é traduzida como a menor concentração do agente que inibe o crescimento do organismo (visual e/ou automático). O conhecimento da MIC do agente antimicrobiano, a via de administração e os níveis clinicamente atingíveis do agente antimicrobiano no local da infecção permitem a classificação do organismo como susceptível (S), intermediário (I) ou resistente (R) ao agente microbiano em questão (Brochura Técnica do Sistema ATB).

A aquisição de novo material genético pelas bactérias sensíveis aos antibióticos a partir das estirpes bacterianas resistentes, pode ocorrer por conjugação, transformação, ou transdução, com transposões ou plasmídeos que frequentemente facilitam a incorporação de genes de resistência múltipla no genoma. O uso de agentes

antimicrobianos cria pressão selectiva para o aparecimento de estirpes resistentes. Os níveis de resistência são normalmente altos para penicilinas de largo espectro e trimetoprim, e baixos para cefalosporinas de 3ª geração e nitrofurantoína. O aparecimento de resistência às fluoroquinolonas e a produção de beta-lactamases de espectro alargado (ESBL) por estirpes de *E. coli* multirresistentes tem levado ao aumento, na última década, de limitações de opções terapêuticas. Um dos factores de risco predominantes para a disseminação dos genes e bactérias resistentes é a pressão selectiva de antibióticos por uso (abuso) de antibióticos nos humanos, animais, alimentação e agricultura. A maioria dos antibióticos usados na clínica é consumida fora do hospital o que levou a um impacto substancial no desenvolvimento da resistência nos patogénicos bacterianos. A grande utilização de antimicrobianos na medicina veterinária e como promotores de crescimento animal (actualmente banida) originou o aparecimento de estirpes resistentes a antibióticos na microflora endógena dos animais. A população humana pode ter ficado colonizada e/ou infectada via contacto, exposição ocupacional ou pela cadeia alimentar, adquirindo os genes de resistência da flora bacteriana residente nos animais. A bactéria pode ser intrinsecamente resistente a uma ou mais classes de agentes antimicrobianos, ou pode adquirir resistência por nova mutação ou por aquisição de genes de resistência de outros organismos (Tenover, 2006).

A epidemiologia é a ciência que estuda, quantitativamente, a distribuição dos fenómenos saúde/doença e os factores condicionantes nas populações humanas. O conhecimento actualizado dos padrões epidemiológicos é fundamental, possibilitando ajustar as intervenções de prevenção/diagnóstico a subgrupos populacionais de maior risco.

A pressão selectiva refere-se a condições ambientais, incluindo não apenas o uso de antibióticos mas também a qualquer outro factor ambiental tal como, a forma como os pacientes estão relacionados por características epidemiológicas, outras drogas usadas, ou poluentes ambientais (Baquero *et al.*, 1998). É um conceito geral que se refere a muitos factores e que cria um panorama ambiental permitindo, a os organismos com mutações novas ou características recentemente adquiridas, sobreviverem e proliferarem. A pressão selectiva por antibióticos é o principal factor para explicar o aumento da resistência. A prevalência actual da resistência deve ser monitorizada continuamente cada ano. O impacto da resistência a um antibiótico e o seu mecanismo específico, incluindo a transmissão, deve ser estudado cuidadosamente. Tais

informações podem ajudar na orientação das estratégias a seguir para maximizar o sucesso terapêutico e minimizar o aparecimento de resistência (Siu, 2002).

A resistência embora classicamente atribuída a mutações cromossômicas, está mais associada a elementos extracromossômicos adquiridos de outra bactéria do ambiente. Estes incluem diferentes tipos de segmentos móveis de DNA, tais como os plasmídeos, os transposões e os integroes. Contudo os mecanismos intrínsecos normalmente não especificados por elementos móveis tais como as bombas de efluxo que expulsam vários tipos de antibióticos, são agora reconhecidos como dos principais contribuidores para a multiresistência bacteriana. Uma vez estabelecida, os organismos resistentes a multidrogas persistem e espalham-se pelo mundo, causando falhas clínicas no tratamento de infecções e crises de saúde pública (Aleksun and Levy, 2007).

A diferenciação entre enzimas mediadas por plasmídeos e cromossomas pode ser difícil devido à possibilidade de translocação de genes entre plasmídeos e cromossomas. A importância epidemiológica da resistência cromossômica e plasmídica é, sem dúvida, muito diferente sendo a plasmídica a que origina maior difusão das resistências bacterianas o que dá lugar a numerosos surtos epidêmicos por bactérias resistentes (Forbes *et al.*, 2007).

A transferência horizontal parece ser o mecanismo principal para a adquirir resistência aos antibióticos. Os antibióticos além de selectores da resistência bacteriana são também promotores da resistência. A aplicação de novas tecnologias levou ao desenvolvimento de novos antibióticos. Contudo a capacidade destas novas moléculas para originar resistência nos microrganismos tem sido largamente ignorada. Talvez seja tempo de incluir um novo passo no desenvolvimento e estudo das propriedades dos novos antibióticos: a sua capacidade de produzir resistência. Este estudo deve ser feito usando todo o conhecimento disponível sobre a fisiologia e genética bacterianas. Os novos antibióticos devem ser avaliados pela sua capacidade de seleccionar variantes mutantes, de aumentar as taxas de mutação, e de promover trocas genéticas. As moléculas devem ser estruturalmente modificadas para reduzir, se possível, estas capacidades sem diminuir as propriedades antimicrobianas. Finalmente, usando os conhecimentos mais actualizados sobre as bases genéticas da mutação e recombinação e do seu papel na aquisição da resistência aos antibióticos, pode-se então tirar partido das estratégias que as bactérias utilizam para ultrapassar a acção dos antibióticos, para melhorar os fármacos anti-infecciosos (Blázquez *et al.*, 2002).

Contributo dos alimentos e da produção animal para a disseminação de estirpes produtoras de ESBLs

A resistência aos antibióticos é um problema importante de saúde pública a qual acaba num surto causado por bactérias patogénicas que não se eliminam por antibióticos conhecidos. A maioria dos genes que confere resistência é adquirida horizontalmente das bactérias comensais ou das bactérias ambientais. A contaminação alimentar por bactérias resistentes pode ser uma fonte significativa de genes de resistência para as bactérias humanas mas não tem sido rigorosamente avaliada, nem é conhecido se há diferenças entre produtos biológicos e os de produção convencional. Num estudo em trezentos e noventa e nove produtos verificou-se que, independentemente do modo de produção, os vegetais e frutos crus estavam muito contaminados por bactérias de gram negativo resistentes a múltiplos antibióticos. A maior parte destas bactérias são originárias do solo e do ambiente. Este estudo focou-se em bactérias de gram negativo resistentes a cefalosporinas de terceira geração, que causam um grande impacto na saúde humana. Entre elas, existem raras espécies potencialmente patogénicas para hospedeiros imunocomprometidos. Dos produtos testados, treze por cento tinham bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro alargado, todas identificadas como *Rahnella spp* agrupadas em dois fílotipos e todas portadoras do gene *bla_(RAHN)*. Deste modo, vegetais e frutos de produção biológica ou convencional constituem uma fonte de bactérias resistentes e de genes de resistência (Ruimy *et al.*, 2009).

Os alimentos de produção animal são os principais reservatórios de patogénicos zoonóticos, e a detecção de produtores de ESBL em estirpes de *E. coli* e *Salmonella* tem aumentado nos últimos anos. As ESBLs são extensamente detectadas em várias instituições de saúde mas não são assim tão frequentes na população bacteriana dos animais, podendo indicar que estas enzimas são menos prevalentes nos animais que nos humanos, mas também não têm sido tão procuradas. O aumento da ocorrência de produtores de ESBLs nos animais tem-se destacado e discutido devido à circulação destes factores de resistência entre os patogénicos humanos (Carattoli, 2008).

Durante a monitorização de amostras de leite não pasteurizado de vacas saudáveis para a presença de bactérias resistentes aos antibióticos, um isolado de *Klebsiella pneumoniae* era resistente às oximino-cefalosporinas e aztreonamo. Descobriu-se uma beta-lactamase de espectro alargado, codificada cromossomicamente, que foi descrita

anteriormente, chamada SHV-60. É de esperar que esta estirpe se dissemine entre animais de produção alimentar e assim constitua um reservatório desta estirpe resistente e que o gene de resistência possa ser transferido causando problemas para o tratamento dos humanos. Este estudo confirma a hipótese de que alguns dos novos antibióticos a que as bactérias zoonóticas patogénicas são resistentes apareceram em animais destinados à alimentação e foram referenciados pela primeira vez no Japão. Colonização das tetas de vacas saudáveis com patogénicos zoonóticos resistentes a multi-drogas durante a lactação ou períodos de seca é um dos maiores perigos afectando não só a indústria leiteira mas também a saúde pública. Recentemente, populações de países em desenvolvimento foram mal informados através de sessões em muitos sites na internet que dizem que o leite em bruto é mais nutritivo e tem melhor sabor que o leite pasteurizado. Fez-se um estudo para monitorizar bactérias resistentes a multi-drogas no leite em bruto de vacas saudáveis da Califórnia tendo em conta que não receberam nenhum antibiótico na comida e que não foram tratadas com antibióticos pelo menos durante três meses. Às estirpes identificadas foram feitos testes de susceptibilidade aos antibióticos pelos métodos de difusão em disco e determinação da MIC, de acordo com as “guidelines” de 2005, do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). A estirpe identificada como *Klebsiella pneumoniae*, KPHUF-100, tem um fenótipo pouco comum, sugerindo a presença de uma beta-lactamase de espectro alargado que degrada as oximiino-cefalosporinas e aztreonam. A determinação da MIC na presença de uma concentração fixa de ácido clavulânico, 4µg/mL, confirma que este isolado é uma produtora de ESBL e excluiu a possibilidade da resistência ser devida à presença de uma beta-lactamase do tipo AmpC ou a efeitos de permeabilidade resultantes de alterações nas porinas da membrana externa. A *Klebsiella pneumoniae* está entre os bacilos de gram negativo mais encontrados pelos médicos em todo mundo e tem sido considerada patogénica pulmonar desde que foi descoberta há mais de 100 anos; contudo, a razão para a preponderância geográfica de manifestações severas de infecções por *Klebsiella pneumoniae*, incluindo bacteremias e meningites adquiridas na comunidade, na Ásia, são desconhecidas. No Japão, tem havido um aumento de infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* resistente a multi-drogas constituindo uma ameaça não só por se tornar mais difícil seleccionar os antibióticos eficazes para o tratamento dos pacientes, mas também por ser uma causa frequente de surtos nosocomiais nos hospitais. Contudo, a origem desta bactéria é desconhecida. Estes resultados sugerem que sob certas condições, as tetas de animais saudáveis podem ser colonizadas por bactérias resistentes a multi-drogas e suscita uma pergunta: Quais são os mecanismos envolvidos

na selecção de bactérias resistentes a multi-drogas nas tetas dos animais saudáveis? Assumiram que a selecção ocorre fora da teta, que a invasão é feita através do esfíncter da teta e que estas bactérias permanecem num estado latente. Além disso, as fezes e a urina dos animais contêm quer as bactérias resistentes quer os resíduos de antibióticos que ficam acumulados no solo habitado por estas vacas leiteiras. É possível que este ambiente de pressão com antibióticos selecione alguns grupos de bactérias para mutações pontuais. Este tipo de ambiente favorece a resistência, transferência de genes e amplificação de estirpes resistentes que podem colonizar, durante meses, o canal da teta e a cisterna, durante a lactação ou períodos de seca, sendo um reservatório daquelas bactérias no leite bruto, mesmo em animais saudáveis. Adicionalmente, microrganismos resistentes têm sido encontrados em quintas de produção convencional ou orgânica, o que demonstra que o fenómeno de disseminação de bactérias resistentes está nas quintas. É necessária vigilância para avaliar se isto é uma situação única, numa quinta, ou se a resistência devida a ESBL está presente entre outras populações animais, no Japão (Hammad *et al.*, 2008).

Poucos estudos têm demonstrado a presença de *Escherichia coli* resistentes, expressando ESBL em alimentos e animais de produção alimentar. Num estudo espanhol de 2003, a prevalência de resistência de *E. coli* que expressam ESBL foi de 2,8% nos isolados testados em animais doentes e os genes identificados foram do tipo CTX-M, SHV e TEM. Num estudo dinamarquês de 2000-2002 em isolados de *E. coli* e *Salmonella spp* não foram detectadas ESBLs. Num estudo na Holanda de 2001 a 2002 em isolados de aves, de produtos de aves e de pacientes (34 isolados de *Salmonella spp* produtores de ESBL) havia uma alta prevalência de *bla*_(TEM-52), e ESBLs do tipo CTX-M da classe C de Ambler entre os isolados testados de origem animal. Nove isolados não relacionados de origem animal, uma *Salmonella spp* e oito *E. coli* do Reino Unido eram produtores de ESBL. Todas as *E. coli* tinham mutações de AmpC e na *Salmonella spp* foi detectada uma enzima de classe C de Ambler, CMY-2. Como parte de vigilância contínua de resistência antimicrobiana nos animais de produção alimentar, nos alimentos e nos seres humanos foram obtidos isolados de *E. coli* a partir de carne vendida a retalho na Dinamarca num total de 732 amostras de aves, de carne bovina e de carne de porco, sendo identificado pela primeira vez em 2004 o primeiro isolado de *E. coli* produtor de ESBL. Esta *E. coli* resistente foi isolada de carne cortada importada da Alemanha e foi, também, resistente às quinolonas, às sulfonamidas, à tetraciclina e ao trimetoprim. Utilizando primers previamente concebidos para os genes do tipo TEM, foi obtido um

amplificação de *E. coli* e por sequenciação foi identificado como $bla_{(TEM-52)}$. Anteriormente, a $bla_{(TEM-52)}$ foi encontrada com alta prevalência em *E. coli* nos pacientes hospitalizados em hospitais canadenses. Recentemente, isolados bacterianos contendo $bla_{(TEM-52)}$ foram detectados em *Salmonella* enterica s. serovares Blockley, Thompson, London, Enteritidis, paratyphi B, Virchow e Typhimurium de aves de capoeira e em pacientes na Holanda e em pacientes na Escócia. Estes resultados mostram a importância da monitorização da prevalência da resistência antimicrobiana não só dos animais de produção alimentar, mas também em carne vendida a retalho. Programas nacionais para limitar a selecção da resistência terão de ser combinados com medidas internacionais e regulamentos para assegurar que os consumidores não estão expostos a riscos desnecessários de bactérias resistentes a antimicrobianos em alimentos comprados a retalho. Além disso, os genes de resistência, identificados neste estudo, estão localizados em elementos de DNA móveis e a resistência pode ser transferida entre as estirpes no intestino humano, originando a redução de opções de tratamento antimicrobiano e prolongamento da hospitalização (Jensen *et al.*, 2006).

As *Escherichia coli* produtoras da enzima CTX-M-15 espalharam-se rapidamente no Reino Unido por volta de 2003, mas outros tipos também apareceram, especialmente a CTX-M-14. Examinaram-se peitos de galinha criados no Reino Unido (n=62) e importadas (n=27), como potencial fonte de *E. coli* resistentes às quinolonas com genes $bla_{(CTX-M)}$. Foram examinadas mais quarenta amostras em que o país de criação não foi possível identificar. Durante 2006, 129 filetes de peito de galinhas frescos e congelados foram comprados em West Midlands. Foram cultivados em meio de CLED contendo 8mg/L de ciprofloxacina e com disco de 10 µg de cefepodoxima. Isolados resistentes foram identificados e tipados por RAPD (random amplified polymorphic DNA analysis); $bla_{(CTX-M)}$ foi identificada por PCR (polymerase chain reaction) e sequenciação. O país de criação foi identificado pela embalagem para 89 das 129 amostras compradas. Apenas uma das 62 amostras de galinhas criadas no Reino Unido era portadora de *E. coli* produtora da enzima CTX-M-1, enquanto 10 de 27 amostras criadas noutros países tinham *E. coli* com enzimas CTX-M, especificamente, 4/10 Brasileiras, 3/4 Brasileiras/Polacas/Francesas, e 2/2 Alemãs têm *E. coli* com enzimas CTX-M-2. Seis das 40 amostras em que o país de criação não é conhecido têm enzimas CTX-M e 5 são CTX-M-14. As *E. coli* resistentes às quinolonas com várias beta-lactamases CTX-M, as quais são comuns em infecções humanas em todo o mundo, foram encontradas em peitos de galinha importada, indicando uma possível fonte para colonização intestinal. O tipo dominante de CTX-M em

infecções humanas no Reino Unido não foi encontrado nos isolados de galinhas, sugerindo que galinhas criadas neste país não são um reservatório de CTX-M-15. Foi posta como hipótese que os produtos de galinha importados fossem a grande fonte de colonização intestinal por estirpes aviárias de *E. coli* portadoras de genes de ESBLs *bla*_(CTX-M). Cozinhar os alimentos não impede a colonização dos intestinos pelos microrganismos das galinhas cruas, quando manuseadas e cozinhadas em locais domésticos. A colonização intestinal, quando seguida de uma cateterização urinária ou problemas de higiene pessoal, pode explicar a epidemiologia actual dos produtores de ESBLs, os quais aparecem particularmente nos idosos, nos hospitais e na comunidade do Reino Unido. As estirpes aviárias podem transferir resistência ou factores de virulência para os humanos por *E. coli* patogénicas, embora isto não explique a disseminação clonal multifocal. A CTX-M-15 tem sido agora descrita na carne de frango vendida a retalho nos EUA em simultâneo com as primeiras descrições de casos na comunidade com este genótipo. Embora estirpes de *E. coli* com a enzima dominante CTX-M-15 não tenha sido encontrada em amostras de carne de galinha no Reino Unido, não se pode ignorar a possibilidade da sua origem ter como fontes os géneros alimentícios. Outra explicação é que estirpes com CTX-M-15 apareceram devido à emigração ou imigrantes da Índia, onde a enzima está extremamente disseminada. Contudo vários epicentros de *E. coli* clonal com CTX-M-15, por exemplo Ulster (Irlanda) e Shrewsbury (Inglaterra), e que não têm grande população migrante, contrariam o argumento de que a disseminação é mediada pelos viajantes. Devido à enorme presença de estirpes de *E. coli* com resistência a quinolonas e com genes CTX-M nos peitos de frango crus é necessário uma vigilância sustentada paralela, das fontes de comida crua importada e infecções nos humanos, para estabelecer se há uma relação, ou uma mudança gradual na prevalência de tipos de CTX-M e se genes de resistência e plasmídeos nos isolados de comida crua são os progenitores das mudanças na epidemiologia clonal nos isolados das enzimas CTX-M. Embora a epidemiologia molecular não tenha demonstrado que a carne crua de aves domésticas é uma fonte das infecções correntes no Reino Unido, esta carne pode ser uma fonte de colonização fecal com *E. coli* produtoras de ESBLs por infecções extra-intestinais (Warren *et al.*, 2008).

Em 2006 na Tunísia foi validada a ocorrência de beta-lactamases de espectro alargado em isolados de *Escherichia coli* em quarenta amostras de fezes animal e em trinta e oito amostras de alimentos, para caracterizar o tipo de ESBLs, os seus ambientes genéticos e os genes de resistência associados. Os isolados de *E. coli* produtores de

ESBLs foram detectados em dez e trinta e oito amostras de alimentos e não foi detectada nenhuma nas amostras de fezes animal. A diferença observada nos isolados de *E. coli* ESBL positivos em amostras de alimentos em relação às amostras de fezes de animais pode ter várias razões; as amostras de alimentos e as amostras de fezes foram obtidas de fontes diferentes e, por outro lado, a contaminação pode ocorrer no matadouro e durante os processos de transformação ou comercialização alimentar. Os genes encontrados nos isolados foram os seguintes: *bla*_(CTX-M-1) em cinco, *bla*_(CTX-M-1) mais *bla*_(TEM-1b) em um, *bla*_(CTX-M-14) mais *bla*_(TEM-1b) em dois, *bla*_(CTX-M-8) em um e *bla*_(SHV-5) em um. Todos os isolados com ESBLs mostraram padrões não relacionáveis por PFGE (pulsed-field gel electrophoresis). As ESBLs da classe CTX-M foram detectadas pela primeira vez em estirpes de *E. coli* de origem alimentar em África (Jouini *et al.*, 2007).

Recentemente, tem sido referida uma alta diversidade de ESBLs na *Escherichia coli* em fontes de aves domésticas na Bélgica sendo as enzimas CTX-M a família predominante. As estirpes de *Salmonella* entérica serovar Virchow e *Salmonella* entérica serovar Infantis produtora de TEM-52 têm sido também isoladas de aves domésticas na Bélgica. A presença de ESBLs nos animais de produção alimentar pode representar um perigo para a saúde humana uma vez que estas bactérias podem representar um reservatório de genes de resistência de patogénicos causando doença nos humanos e nos animais. Portanto para demonstrar o conjunto de genes comuns de ESBLs existentes entre os isolados dos diferentes hospedeiros, caracterizaram-se os plasmídeos, determinaram a localização e a possibilidade de transferência de ESBLs *bla*_(TEM-52), *bla*_(CTX-M-2) e *bla*_(CTX-M-15) presentes nos isolados das diferentes estirpes de *Enterobacteriaceae* de humanos, de frangos e de suínos. Catorze estirpes não relacionadas clonalmente, portadoras de *bla*_(TEM-52), *bla*_(CTX-M-2) ou *bla*_(CTX-M-15) foram usadas neste estudo. As estirpes de *E. coli* humana foram isoladas em pacientes do Hospital Universitário de Ghent. Todos os isolados de aves domésticas foram obtidos de fezes de frangos saudáveis mas os 2 isolados de *E. coli* eram de suínos com diarreia. A resistência plasmídica que codifica as ESBLs parece mover-se rapidamente entre os diferentes microrganismos e os diferentes ecossistemas. Os organismos portadores de TEM-52, de CTX-M-2 ou CTX-M-15 resistentes às cefalosporinas, podem ser transmitidos dos alimentos de produção animal para os humanos ou vice-versa, contudo, permanece pouco claro, principalmente devido ao desconhecimento da maleabilidade e velocidade de evolução dos plasmídeos que as transportam (Smet *et al.*, 2009).

As ESBLs, principalmente as da família CTX-M, têm sido associadas com estirpes de *Escherichia coli* de origem animal na Europa. Uma experiência foi realizada *in vivo* para estudar os efeitos de drogas beta-lactâmicas em veterinária na seleção e persistência de *E. coli* produtora de ESBL na flora intestinal de suínos. Vinte suínos foram aleatoriamente distribuídos em três grupos de tratamento e um grupo de controlo. Todos os suínos foram inoculados intragastricamente com 10^{10} CFU (unidades formadoras de colónias) de mutantes resistentes ao ácido nalidíxico derivados de estirpes de *E. coli* produtoras de CTX-M-1 de suínos. Os tratamentos com amoxicilina, a ceftiofur (cefalosporina de 3ª geração), ou a ceftioxima (cefalosporina de 4ª geração) foram iniciados imediatamente após inoculação bacteriana. As fezes foram colhidas antes da inoculação e nos dias 4, 8, 15, 22 e 25 após o início do tratamento. O total de coliformes resistentes foram contados em meio de MacConkey com e sem cefotaxima (CTX). Para além disso, MacConkey com CTX e ácido nalidíxico (NAL) foi usado para contar o número de CFU da estirpe inoculada. Foram observadas contagens significativamente mais altas de coliformes resistentes ao CTX nos três grupos de tratamento vinte e dois dias após a descontinuação do tratamento que no grupo de controlo. A ceftiofur e a ceftioxima exercem um maior efeito selectivo que a amoxicilina, e os efeitos persistem para além do tempo de tratamento recomendado para estas cefalosporinas. As estirpes inoculadas foram detectadas em apenas nove animais no dia 25. O aumento do número de coliformes resistentes ao CTX foi principalmente devido à proliferação de estirpes produtoras de CTX-M nativas e à possibilidade de outras estirpes adquirirem genes CTX-M por transferência horizontal. O tratamento com amoxicilina, ceftiofur, ou ceftioxima resulta numa seleção de *E. coli* produtora de CTX-M na flora intestinal dos suínos. Com a excepção da ceftioxima, observou-se um aumento na contagem de *E. coli* produtora de CTX-M que não foi devida à estirpe inoculada mas às estirpes de *E. coli* presentes na flora nativa dos suínos. A maioria dos suínos (19/20) era portadora de *E. coli* produtora de CTX-M antes da inoculação, incluindo as variantes CTX-M-1 e CTX-M-14. Embora não haja informação disponível acerca da contribuição de factores seleccionadores de patogénicos específicos oriundos de quintas, esta descoberta sugere que pode ser difícil controlar o risco da colonização animal com *E. coli* produtoras de ESBL. As estirpes produtoras de CTX-M nativas têm uma predominância ecológica sobre a estirpe inoculada observada na contagem das placas contendo NAL e por caracterização genética dos isolados obtidos no fim da experiência. Vários factores podem ter contribuído para este resultado, tais como factores do hospedeiro ou um possível enfraquecimento da estirpe inoculada devida à mutação que condiciona a resistência à

quinolona, a qual pode ter reduzido a capacidade da estirpe para colonizar os suínos. Foi observado, anteriormente, que um clone de *E. coli* predominante está normalmente associado com uma flora intestinal e a colonização com estirpes externas é dificultada devido à competição com a flora nativa adaptada. Em média, a diferença estimada entre a contagem de *E. coli* produtoras de CTX-M nas fezes de suínos tratados com cefalosporinas e das do grupo de controlo foi cerca de cem vezes mais alto no primeiro grupo e persistiu pelo menos durante vinte e dois dias após o fim do tratamento. Da mesma forma, os efeitos selectivos exercidos por ceftiofur e cefquinoma persistem para além do fim do tratamento (o tempo requerido para assegurar que os resíduos da droga estejam abaixo do limite do resíduo máximo disponível nos tecidos), que são nove e cinco dias respectivamente. O tratamento com amoxicilina induz um aumento significativo na contagem de coliformes resistentes a CTX, existindo uma diferença dez vezes inferior relativamente à contagem do grupo de controlo, sendo o tempo de eliminação desta droga de trinta dias e portanto o risco da contaminação da carne no matadouro parece ser menor para este medicamento. Este estudo *in vivo* indica claramente que as cefalosporinas de uso veterinário seleccionam as *E. coli* produtoras de ESBLs na flora intestinal dos suínos e isto produz um efeito selectivo que persiste por um período longo, maior que o tempo de tratamento necessário com estes antimicrobianos. O tratamento dos animais com cefalosporinas deve ser limitado e apenas quando os antimicrobianos de espectro mais estreito não se podem usar devido às resistências ou por falta de eficácia clínica por drogas antimicrobianas alternativas (Cavaco *et al.*, 2008).

Em vinte e nove isolados de *E. coli* de uma amostragem de oitenta quintas produtoras de suínos distribuídos em treze províncias espanholas demonstraram reduzida susceptibilidade ou resistência a cefalosporinas de espectro alargado. Foram encontradas as seguintes ESBLs: SHV-12 em 12 isolados, CTX-M-1 em três isolados, CTX-M-9 em três isolados e CTX-M-14 em três isolados; os restantes oito isolados não eram fenotipicamente ESBLs. Diferentes ESBLs e outros mecanismos associados à resistência a cefalosporinas de espectro alargado estão muito disseminados em *E. coli* de origem fecal de matadouros de suínos em Espanha (Escudero *et al.*, 2010).

Num estudo realizado em cinco quintas produtoras de frangos, em Itália, foram caracterizados sessenta e sete isolados de *Escherichia coli* com reduzida susceptibilidade à cefotaxima ou à ceftiofur. Foram identificados os genes das beta-lactamases *bla*_(CTX-M-1), *bla*_(CTX-M-32) e *bla*_(SHV-12). Detectou-se uma considerável diversidade genética entre os isolados produtores de ESBLs, e foram identificadas estirpes iguais em

diferentes quintas e plasmídeos iguais em estirpes geneticamente distintas. A detecção de plasmídeos com alta mobilidade sugere um potencial reservatório para genes de beta-lactamases (Bortolaia *et al.*, 2010).

Em Portugal, foi feito um estudo em setenta e seis amostras de fezes de frangos obtidas num matadouro. Foi determinada a susceptibilidade a dezasseis antibióticos e oitenta e cinco por cento dos isolados apresentavam um fenótipo multirresistente a pelo menos quatro famílias de antimicrobianos. As ESBLs dos grupos TEM e CTX-M foram detectadas em trinta e um isolados de *E. coli*. O resultado deste estudo demonstra que o tracto intestinal de aves domésticas saudáveis é um reservatório de isolados de *E. coli* com ESBLs (Costa *et al.*, 2009).

Para investigar a diversidade de integções e beta-lactamases de espectro alargado entre *Enterobacteriaceae* de galinhas e de suínos, em Portugal, e analisar a relação clonal entre os isolados produtores de ESBLs portugueses de origem animal e humano, analisaram-se amostras de fezes de suínos saudáveis (HSF, n=35) carcaças de galinha não cozinhadas (CM, n= 20) e fezes de galinhas saudáveis (HCF, n= 20). As *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs foram identificadas nas seguintes amostras: 60% de CM, 10% de HCF e 5, 7% de HSF, a maioria correspondente a *E. coli* dos filogrupos A, D e D1. As ESBLs TEM-52, SHV-2 e CTX-M-1 foram detectadas em amostras de galinha e SHV-12 em amostras de suínos. Foi observada alta diversidade clonal e a maioria das ESBLs foi transferida (67%). Nas amostras foram identificados integções de classe 1 e classe 2, 80% nas CM, 10% nas HCF e 63% nas HSF, sendo a classe 1 mais frequente que a classe 2. Este estudo é o primeiro de ESBLs e integções de galinhas e suínos em Portugal e destaca as bactérias resistentes aos antibióticos e/ou genes de resistência que os humanos podem adquirir através da cadeia alimentar. Os isolados com susceptibilidade diminuída a cefalosporinas de espectro alargado foram encontradas em todas as amostras de carne de galinha, em duas amostras de HCF e em três amostras HSF. Um total de cento e quarenta e nove isolados representativos de colónias com diferentes morfotipos foi determinada a susceptibilidade aos antibióticos nas HSF (n=48), nas HCF (n=33) e nas CM (n=68). A resistência a pelo menos um antibiótico foi observada em 113 isolados sendo resistentes à estreptomicina 65%, às sulfamidas 51% e ao trimetoprim 40%. A maioria dos isolados portadores de ESBLs tem resistência a estes antibióticos que são usados na produção animal intensiva. As taxas de resistência para as sulfamidas e para o trimetoprim foram semelhantes entre isolados de galinhas e suínos (50% versus 54% para sulfamidas e 43% versus 35% para

trimetoprim). As taxas de resistência para os antibióticos não beta-lactâmicos são mais frequentemente encontradas entre produtores de ESBLs do que entre isolados não produtores de ESBLs: estreptomicina (83% versus 63%), sulfamidas (67% versus 49%) e trimetoprim (61% versus 31%). As ESBLs frequentemente identificadas nos humanos, associadas com os hospitais ou a comunidade dos países europeus, têm sido cada vez mais encontradas entre os animais. A frequente detecção de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e/ou portadoras de integrações de classe 1 e/ou de classe 2 nas amostras de fezes de galinhas e suínos para produção alimentar, em bos de marcas comerciais diferentes, e galinhas criadas em diferentes quintas de Portugal, confirma o papel dos animais como possível reservatório para a disseminação de genes resistentes na comunidade. A presença de ESBLs entre amostras de galinha de marcas comerciais diferentes e de galinhas criadas em diferentes quintas pode ser a razão da contaminação de algumas linhas genéticas de grande número de reprodução que são vendidos pelo mesmo produtor. As ESBLs são mais frequentemente observadas entre *E. coli* principalmente pertencendo ao grupo filogenético A (58,3%), a qual é associada com estirpes comensais de *E. coli* animal ou humana, de acordo com outros estudos. Contudo também foi detectado *E. coli* produtora de ESBL do grupo filogenético D, o qual está associado a infecções humanas extra-intestinais. Todos os genes de ESBL identificados neste estudo já foram identificados nos hospitais portugueses, e as ESBLs mais comuns entre os animais, TEM-52 e SHV-12, são também os tipos mais frequentes entre os humanos. A *bla*_(TEM-52) também tem sido detectada entre produção alimentar e animais selvagens, animais domésticos e humanos saudáveis da Bélgica, da França, da Grécia, de Portugal ou de Espanha e é associada a um plasmídeo epidémico conjugativo entre amostras de animais em áreas com alta prevalência deste tipo de ESBLs. Os outros genes de ESBL encontrados, *bla*_(CTX-M-1), *bla*_(SHV-2) ou *bla*_(SHV-12), são largamente disseminados entre *Enterobacteriaceae* de diferentes continentes por disseminação plasmídica e clonal e têm sido recentemente detectados em Portugal. A diversidade clonal dos isolados portadores destes genes sugere que a transmissão horizontal pode ser a responsável pela recente e rápida disseminação destas variantes no país. Algumas das ESBLs e integrações que foram encontrados já tinham sido detectados entre *Enterobacteriaceae* de diferentes nichos ecológicos em Portugal e noutros países, sugerindo que as suas estruturas genéticas móveis estão disseminadas. É necessária uma política mais restrita do uso de antibióticos em veterinária (Cavaco *et al.*, 2008), para prevenir o aparecimento e a disseminação destas estirpes entre animais e humanos, limitando os futuros problemas de falha terapêutica (Machado *et al.*, 2008).

Contributo dos animais selvagens para a disseminação de estirpes produtoras de ESBLs

Num estudo, de 2006 a 2008, na República Checa e Eslováquia para determinar a presença de *E. coli* resistentes aos antibióticos nas fezes de populações de mamíferos selvagens, encontraram nas fezes de javalis cinco isolados de *E. coli* multirresistentes produtores de ESBLs : um isolado com $bla_{(CTX-M-1)}$ e $bla_{(TEM-1)}$, três com $bla_{(CTX-M-1)}$ e um com $bla_{(TEM-52b)}$. Este estudo demonstra o impacto dos mamíferos selvagens como reservatórios de estirpes produtoras de ESBLs (Literak *et al.*, 2009).

As *E. coli* produtoras de ESBLs foram isoladas em oito amostras de setenta e sete amostras de fezes de javalis em Portugal. Os tipos de ESBLs sequenciados e identificados por PCR foram $bla_{(CTX-M-1)}$ em 6 isolados e $bla_{(CTX-M-1)} + bla_{(TEM1-b)}$ em 2 isolados. Adicionalmente foram detectados genes de resistência à tetraciclina em 3 isolados, à estreptomicina em 3 isolados, ao cloranfenicol em 1 isolado e em todos os isolados foram detectados genes de resistência à sulfonamida. O gene *intl 1* que codifica a integrase da classe 1 foi detectado em todos isolados de *E. coli*. Este estudo evidencia que os javalis podem ser um reservatório de genes de resistência antimicrobiana (Poeta *et al.*, 2009).

As ESBLs têm sido largamente distribuídas nas bactérias de diferentes ecossistemas, em bora se já não é necessária mais informação, especialmente para ecossistemas selvagens. O estudo de Poeta e colaboradores tem como objectivo analisar os isolados de *E. coli* portadores de ESBLs em amostras de fezes de gaivotas das Ilhas Berlengas e também caracterizar o tipo de ESBLs e o grupo filogenético dos isolados. As Ilhas Berlengas são uma parte da reserva natural das Berlengas, localizada a 5,7 milhas da costa Portuguesa, e pertencem a uma rede nacional de áreas protegidas. No passado pescadores habitaram na ilha, que agora é desabitada, embora haja visitas turísticas e poucas pessoas permanecem nas férias. Diversas espécies de gaivotas fazem os seus ninhos nesta ilha; nestes últimos anos a população de gaivotas tem aumentado significativamente e é considerada uma verdadeira praga. As amostras fecais frescas de cinquenta e sete gaivotas foram obtidas em diferentes áreas das Ilhas Berlengas durante o mês de Setembro de 2007 e foram testadas para a presença de ESBLs em isolados de *E. coli*. Os genes de beta-lactamases detectados foram os seguintes: $bla_{(TEM-52)}$ em 8 isolados, $bla_{(CTX-M-1)}$ mais $bla_{(OXA-1)}$ em um isolado, $bla_{(CTX-M-14a)}$ em um isolado, e $bla_{(CTX-M-1)}$

³²⁾ em um isolado. É interessante que 73% dos isolados com ESBL têm o gene *bla*_(TEM-52) e 27% têm o gene *bla*_(CTX-M). A alta prevalência de TEM-52 tem sido recentemente observada em isolados de *E. coli* de animais selvagens para produção alimentar e produtos de carne de frango de Portugal. É importante realçar a alta prevalência e a diversidade moderada de ESBLs detectadas nas *E. coli* das fezes das gaivotas que habitam numa reserva natural. No caso das Ilhas Berlengas, que não são muito longe da costa portuguesa, não está excluída a possibilidade destes animais comerem os restos dos alimentos das pessoas. Este estudo dá uma nova evidência para a larga disseminação de ESBLs nos isolados de *E. coli* de animais selvagens, como é o caso das gaivotas (Poeta *et al.*, 2008).

Infecções com bacilos resistentes a multidrogas não ocorrem só nos hospitais mas também na comunidade. Estudos anteriores demonstraram resistência a multidrogas em aves selvagens. A costa do Porto em Portugal, incluindo a baixa do Porto, tem uma larga população de gaivotas (*Larus fuscus*, Gaivota-d'asa-escura, e *L. cachinnans*, gaivota de pernas amarelas). As gaivotas têm sido descritas como um provável reservatório de bactérias resistentes a multidrogas. Durante a década da passada, beta-lactamases de espectro alargado com importante crescimento epidemiológico, as enzimas cefotaximasas (CTX-M), foram relatadas mundialmente em *Enterobacteriaceae* de humanos; foram encontradas maioritariamente na *Escherichia coli*. As razões para o rápido aparecimento de enzimas de CTX-M em isolados de humanos permanecem desconhecidas. Adicionalmente *E. coli* CTX-M positivas foram identificadas em aves domésticas, em quinquas de outros animais, e animais selvagens (aves de rapina, raposas). As estirpes de *E. coli* podem ser classificadas em quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D). Os isolados extra-intestinais virulentos pertencem maioritariamente ao grupo B2, sendo o de menor extensão o do grupo D, enquanto a maioria das estirpes comensais pertencem aos grupos A e B1. O objectivo deste estudo é avaliar a disseminação e os tipos de *E. coli* produtoras de ESBLs nas fezes de aves selvagens nas praias do Porto. O tipo de beta-lactamases CTX-M é a ESBL em crescente predominância. Este estudo forneceu uma pista adicional de que as gaivotas selvagens são portadoras de *E. coli* produtoras de ESBLs, embora numa menor taxa do que a referida anteriormente. Os determinantes de ESBLs são TEM-52, CTX-M-1, CTX-M-14a e CTX-M-32. Outro estudo em aves domésticas referia que a principal CTX-M identificada era do grupo CTX-M-1 (CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-32) como foi encontrado pelos autores. A CTX-M-15 era o principal tipo de CTX-M identificada entre as aves residentes

na maioria das praias do Porto, o que está de acordo com o facto de a CTX-M-15 ser a mais prevalente nas *E. coli* nos pacientes hospitalizados no Porto. Esta observação é contrária ao estudo de Poeta *et al.*, 2008, em que a maioria dos animais selvagens era produtor de TEM-52 numa reserva perto do Porto onde o contacto com os humanos era menor. Estudos anteriores demonstraram a associação de isolados de *E. coli* do grupo B2 e D com infecções extra-intestinais. Os resultados mostram que 37% de todos os isolados com ESBLs pertencem ao filogruppo B2 ou D, com uma taxa superior à anteriormente encontrada (27% de todas ESBLs) e esta descoberta pode ser um assunto de interesse para a saúde humana. Contudo, foi demonstrado que o tipo ST131 conhecido como o mais frequentemente isolado nos humanos e frequentemente associado com produção de CTX-M-15 é muito raro (9%). Os resultados sugerem que as praias, desta forma, podem ter um papel fundamental na disseminação de determinantes de resistência e podem ser a fonte de CTX-M-15 relacionadas com as infecções adquiridas na comunidade. As aves migratórias, tais como as gaivotas que atravessam grandes extensões da costa europeia entre Portugal e a Escandinávia, podem ser os reservatórios do aparecimento destes determinantes de resistência (Simões *et al.*, 2010).

No nordeste da República Checa analisou-se a superfície da água de uma lagoa, à procura de *Escherichia coli* e *Salmonella* resistentes aos antibióticos, com gaivotas jovens (*Larus Ridibundus*) que aí nidificam. Um total de 16% (n=87) de amostras de água e 24% (n=216) de amostras de fezes de gaivotas revelaram *Salmonella*. As *Salmonella* resistentes aos antibióticos foram isoladas em 12% (n=14) na água e 28% (n=51) nas gaivotas. As *Escherichia coli* foram isoladas em 83 (95%) amostras de água da lagoa e 213 (99%) amostras de fezes de gaivotas. Os isolados de *E. coli* num total de 18% (n=83) da água e 28% (n=213) das gaivotas eram resistentes aos agentes antimicrobianos testados. Os isolados de *E. coli* resistentes aos antibióticos com integrones de classe 1 foram encontrados em 21% (n=14) na água e 15% (n=60) nas gaivotas. Nos isolados de *E. coli* das gaivotas com integrones de classe 2 e produtores de beta-lactamases de espectro alargado com *bla*_(CTX-M-1), *bla*_(CTX-M-15), *bla*_(SHV-2) e *bla*_(SHV-12) dos quais 13% eram resistentes aos antimicrobianos. Foram encontrados isolados de *E. coli* resistentes aos antibióticos com padrões idênticos (PFGE) nas gaivotas ou na água. As *Salmonella* do mesmo serótipo e perfil de PFGE foram encontradas nas gaivotas e na água. As gaivotas e a água da superfície da lagoa foram analisadas como importantes reservatórios de *E. coli* e *Salmonella* resistentes aos antibióticos, incluindo isolados produtores de beta-lactamases de espectro alargado (Dolejská *et al.*, 2009).

Existem apenas alguns estudos anteriores em que as ESBLs foram detectadas em estirpes de *E. coli* nas fezes de animais selvagens, mas não é do conhecimento que estirpes de *E. coli* tenham sido isoladas nas fezes de búbios (*Buteo buteo*). Trinta e três amostras de fezes de búbios de Portugal foram obtidas de Setembro de 2007 a Fevereiro de 2008 e foram estudadas quanto à presença de estirpes de *E. coli* produtoras de ESBLs. Todas as amostras de fezes foram obtidas com a colaboração do CRATAS (Centro de Recepção, Acolhimento e Tratamento de Animais Selvagens). Este centro está localizado na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro e recebe animais feridos. Nenhum dos búbios tinha sido previamente alimentado por seres humanos ou tratado com antibióticos. A maioria dos animais habitava no Parque Natural da Peneda Gerês ou noutras áreas rurais protegidas de Portugal. As amostras de fezes foram seleccionadas para a presença de ESBLs utilizando o meio de Levine agar suplementado com 2 mg / L cefotaxima (Levine-CTX). Duas colónias com morfologia típica de *E. coli* foram seleccionadas e identificadas por métodos bioquímicos clássicos (Gram, catalase, oxidase, indol, Metil Red-Voges-Proskauer, citrato e urease) e pelo sistema API 20E de cada amostra fecal. A susceptibilidade a 16 antibióticos (ampicilina, amoxicilina / ácido clavulânico, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, aztreonam, imipenem, gentamicina, amicacina, tobramicina, estreptomicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, tetraciclina e cloranfenicol) foi determinada pelo método de difusão em agar recomendado pelo CLSI para todas as estirpes de *E. coli*. A *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como uma estirpe de controlo de qualidade. Os isolados resistentes às cefalosporinas de terceira geração (cefotaxima ou ceftazidima) foram seleccionados para estudos posteriores (um por amostra de fezes, ou dois se apresentassem diferentes fenótipos de resistência aos antibióticos). O teste de difusão de duplo disco (cefotaxima, ceftazidima e aztreonam na presença ou ausência de amoxicilina / ácido clavulânico) foi realizado para detectar a produção de ESBL. A presença de genes que codificam beta-lactamases do tipo TEM, SHV, OXA e CTX-M foi estudado por PCR específicos, e amplificações positivas foram sequenciadas para determinar o gene específico do tipo de beta-lactamase. Foram estudados por PCR o ambiente genético dos genes *bla*_(CTX-M) e sequenciados em todos os isolados que tinham *bla*_(CTX-M), os genes de resistência a antibióticos, a presença dos genes *int1* e *int2* que codificam as integrasas de classe 1 e 2, e a detecção dos grupos filogenéticos de estirpes de *E. coli*. As colónias de *E. coli* foram isoladas em 5 das 33 (15,2%) amostras fecais no meio de Levine-CTX. Foram obtidos 2 isolados de *E. coli* de cada amostra quando mostraram diferentes perfis fenotípicos e genómicos. Os 10 isolados exibiram um

fenótipo de resistência para a cefotaxima e/ou ceftazidima, e o teste de produção de ESBL foram positivos. Os genes de beta-lactamase detectados nos isolados foram os seguintes: *bla*_(CTX-M-32) + *bla*_(TEM-1) (sete isolados) e *bla*_(CTX-M-1) + *bla*_(TEM-1) (três isolados). A alta prevalência de *bla*_(CTX-M-32) nos isolados de *E. coli* comensais dos bítios neste estudo é notável (15,2%), porque este gene não é frequentemente encontrado em isolados de animais, tendo sido referido em poucos estudos anteriores. Os isolados contendo CTX-M eram todos multirresistentes. Todos os isolados produtores de *bla*_(CTX-M-1) pertenciam ao filogruppo B1. Os isolados produtores de *bla*_(CTX-M-32) pertenciam aos filogruppos: B2 (quatro isolados), A (dois isolados) ou B1 (um isolado). O filogruppo B2 foi associado em estudos anteriores com isolados mais virulentos e também tem sido relacionado com alguns mecanismos específicos de resistência, como é o caso da beta-lactamase CTX-M-15. A possível associação em isolados *bla*_(CTX-M-32) do filogruppo B2 deve ser monitorizada no futuro. Esta é a primeira vez que isolados de *E. coli* produtores de CTX-M foram detectados nos bítios. Os bítios são pássaros carnívoros, e podem voar longas distâncias à procura de comida e território. É possível que estes hábitos alimentares possam expô-los ao material fecal de animais de quintas ou mesmo de humanos. Isto poderá explicar a aquisição e disseminação de bactérias com genes de resistência aos antibióticos na população de bítios, mesmo na ausência da pressão directa por antibióticos. Este estudo destaca que as ESBLs são encontradas em ecossistemas mesmo naqueles que não estão relacionados de perto com os seres humanos ou que contenham uma pressão selectiva por antibióticos. Mais estudos devem ser realizados, com diferentes tipos de animais selvagens para confirmar a disseminação de ESBLs em outros ecossistemas e populações animais (Radhouani *et al.*, 2010).

Contributo dos animais de estimação para a disseminação de estirpes produtoras de ESBLs

Existem alguns dados disponíveis de epidemiologia molecular de isolados de *Escherichia coli* produtoras de ESBLs de animais de estimação, na China. A detecção e caracterização dos genes de ESBLs *bla*_(CTX-M), *bla*_(SHV), e *bla*_(TEM) foram realizadas entre duzentos e quarenta isolados de *E. coli*, de animais domésticos, saudáveis e doentes, no sul da China, entre 2007 e 2008. O parentesco clonal das *E. coli* foi avaliado por PFGE. Os genes codificadores de ESBLs foram identificados em noventa e sete dos duzentos e quarenta isolados de *E. coli* e noventa e seis tinham CTX-M. O tipo mais comum de CTX-M foi CTX-M-14 e CTX-M-55 e em três isolados foi identificada a CTX-M-64. Os isolados produtores de CTX-M-27, 15, 65, 24, 3, e 9 foram também identificados. Dez isolados tinham dois ou três tipos de CTX-M, sendo a combinação mais frequente a de CTX-M-14 e CTX-M-55. A alta prevalência de ESBLs em *E. coli* em animais de companhia demonstra a importância da vigilância molecular na monitorização de estirpes de *E. coli* produtoras de CTX-M nestes animais (Sun *et al.*, 2009).

Contributo de diversos ambientes para a disseminação de estirpes produtoras de ESBLs

O trabalho de Machado e colaboradores descreve a ocorrência de ESBLs e integridades entre *Enterobacteriaceae* de ambientes aquáticos portugueses e analisa a relação clonal entre os isolados produtores de ESBL do ambiente, de origem humana e animal. Foram identificadas 16 *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL (11 de *Klebsiella pneumoniae*, 4 de *Escherichia coli* e 1 de *Enterobacter aerogenes*) em oito amostras ambientais obtidas em Portugal. As amostras foram: (i) de águas residuais urbanas directamente de linhas de esgoto a jusante de quatro hospitais localizados na área do Porto (n=5; 2001-02); (ii) de água do rio Sousa, no norte de Portugal (n=1; 2003) e (iii) de água do mar do Porto (n=2; 2003-04). As águas do rio e do mar foram colhidas de pontos de descarga clandestinos de fluxos de água contaminada por coliformes fecais. As amostras foram colhidas em frascos esterilizados e processadas no mesmo dia da colheita. As amostras do rio ou marinhas foram submetidas a um processo de filtração e os filtros foram colocados em placas de MacConkey agar suplementadas com ceftazidima (1 mg/L) ou cefotaxima (1 mg/L). As amostras de águas residuais foram directamente aplicadas nestas placas (0,1 mL). A caracterização de ESBL foi realizada pelo teste de sinergismo de duplo disco, amplificação e sequenciação de genes *bla*. A relação clonal foi estabelecida pela análise (randomly amplified polymorphic DNA fingerprints) RAPD-PCR e / ou PFGE. A relação clonal foi determinada entre as estirpes ambientais do estudo e estirpes produtoras de ESBL extremamente disseminadas no hospital (regiões do Norte e Centro, 2002-04) e na comunidade portuguesa (região Norte, 2003-05). Os grupos filogenéticos de *E. coli* foram identificados por PCR multiplex. Os integridades de classe 1, 2 e 3 foram caracterizados por (restriction fragment length polymorphism) PCR-RFLP e sequenciação. As características epidemiológicas dos isolados produtores das ESBL incluem resultados de tipagem e padrões de resistência aos antibióticos não beta-lactâmicos. A diversidade das ESBLs foi identificada a partir de cinco amostras de esgotos dos diferentes hospitais evidenciando a presença de TEM-116, de diferentes estirpes de *K. pneumoniae* colhidas em todos os cinco efluentes hospitalares, produtoras de SHV-12 ou TEM-10/SHV-27 e TEM-52 de *E. coli*. A partir do Rio Sousa, identificaram *E. aerogenes* produtor de TEM-24 e *E. coli* produtora de TEM-52. As estirpes produtoras, de CTX-M-14 e CTX-M-32, as quais são comumente recuperadas de ambientes da comunidade e hospitalares no Sul da Europa, também foram identificadas em duas amostras de águas marinhas costeiras. Nenhuma das

ESBLs, excepto TEM-116, detectada na Ria de Aveiro, tinha sido previamente recuperada a partir de amostras ambientais. A *K. pneumoniae* foi a produtora da ESBL mais encontrada (69%, 11/16). Não foram encontradas relações clonais entre *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL de origem animal e aquática. Dois isolados de *E. coli* pertencentes ao filogrupa D eram produtores de ESBL (um isolado produtor de CTX-M-14 e um de TEM-52). Os outros dois isolados pertenciam ao filogrupa A ou B1. Em 31% das estirpes (5 / 16) foram transferidos por conjugação os genes *bla*_(ESBL). Embora as *E. coli* produtoras de CTX-M-14 recuperadas das águas costeiras não tenham sido relacionadas clonalmente com outras estirpes produtoras de CTX-M-14 de hospitais portugueses ou de voluntários saudáveis, um plasmídeo de *bla*_(CTX-M-14) foi detectado em amostras a partir das três origens. A maioria das estirpes estudadas continha *int11* e/ou *int12* (n=14 / 16 isolados), embora regiões variáveis correspondentes a integrons de classe 1 ou 2 só tenham sido detectados em cinco isolados. A transferência conjugativa simultânea de integrons e dos genes das ESBL só foi detectada em estirpes de *K. pneumoniae* com *bla*_(TEM-10), *bla*_(SHV-27) e *bla*_(VIM-2). A ocorrência de estirpes em ambientes aquáticos e/ou elementos genéticos associados com ESBLs e MBs amplamente disseminados nos hospitais portugueses é motivo de preocupação e sugere contaminação ambiental por efluentes hospitalares, embora a origem comunitária não possa ser descartada. Os resultados sublinham a importância do ambiente aquático para a disseminação de patógenos multirresistentes (Machado *et al.*, 2009).

Para determinar a presença de beta-lactamases de espectro alargado produzidas pelas *Enterobacteriaceae* em diferentes ambientes, recolheram-se diversas amostras clínicas e amostras de fezes de animais de quintas, água de esgoto e fezes de humanos portadores e após infecção de origem alimentar. Fizeram-se subculturas em meios de MacConKey suplementados com cefotaxima para a detecção das ESBLs. A identificação, padrão de susceptibilidade e (enterobacterial repetitive intergenic consensus elements) ERIC-PCR foram utilizados para a delimitação do clone em cada amostra. O consumo de antibióticos pela comunidade também foi registado. Foi observada uma prevalência de 1,9% de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em infecções humanas. A vigilância transversal de humanos portadores fecais na comunidade revelou uma prevalência de 6,6% com uma distribuição sazonal. O elevado uso de antibióticos no inverno coincide com uma menor prevalência nos portadores. As *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs foram detectadas em 5 amostras de água de esgoto humano, em 8 de 10 amostras em quintas de suínos, 2 em 10 em quintas de coelhos, em todas as 10 quintas

de aves domésticas e em 3 de 7 38 amostras de comida estudadas. As *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs, pesquisadas nos portadores fecais, foram detectadas em 19 de 61 amostras de surtos de origem alimentar, todos devidos a enteropatogênicos, sendo a prevalência de 4,4% a 66,6%. Esta disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs sugere que a comunidade pode ser um reservatório e a comida pode ser um contribuinte para a propagação destas estirpes. Relatórios de infecção ou colonização com estirpes de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs incidiram principalmente em pacientes hospitalizados ou centros de cuidados de saúde. Contudo, as *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs, também têm sido descritas em animais e pacientes na comunidade, com e sem doenças crônicas. O pouco que se sabe acerca dos mecanismos de disseminação das ESBLs foi através de uma análise epidemiológica extensiva para determinar a presença de estirpes de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em diferentes ambientes: infecções humanas e portadores fecais, portadores fecais humanos num contexto de surto de origem alimentar, comida cozinhada e não cozinhada, quintas de animais para a produção de alimentos, e água de esgoto humano em Barcelona. As *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs são raramente relatadas em humanos em ambientes que não estejam relacionados com o quadro clínico. Este estudo permite avaliar a prevalência dessas estirpes em ambientes relacionados com os humanos dentro de uma única área geográfica. A prevalência de ESBLs nas estirpes com relevância clínica varia de ano para ano, de região para região e mesmo de hospital para hospital. Em relação aos portadores fecais humanos na comunidade existe uma distribuição sazonal de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs sendo a prevalência maior entre Julho e Novembro e a menor entre Fevereiro e Maio. A água de esgoto humano é usada como um rápido método de triagem para detectar estirpes resistentes que são representativas das existentes na comunidade. Na realidade, as 5 amostras analisadas continham *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs, constituindo um reservatório destas estirpes. Os animais, incluindo a produção animal para a alimentação e os animais domésticos, são cada vez mais reconhecidos como reservatórios de estirpes produtoras de ESBLs. Avaliou-se a presença de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em amostras de material fecal, do chão como representativo dum quinta na comunidade e os resultados demonstraram que estas estirpes estavam mais presentes nas quintas de criação de aves domésticas e suínos do que nas quintas de criação de coelhos. Os dados disponíveis sugerem que os alimentos podem contribuir para a disseminação de *Enterobacteriaceae* resistentes na comunidade. A incidência foi baixa neste estudo mas deve-se salientar que 79% dos alimentos deste

estudo eram cozinhados. Este é o primeiro relatório de uma estirpe de *K. pneumoniae* produtora de ESBL isolada de alimentos. Observou-se que um aumento do uso de antibióticos entre Outubro e Dezembro coincide com a diminuição da prevalência de ESBL, que pode ser devida à administração de amoxicilina/ácido clavulânico, um antibiótico que é ativo sobre algumas estirpes produtoras de ESBL. Contudo existem outras variáveis como por exemplo hábitos alimentares no verão, em que há um maior consumo de alimentos crus, que deve também ser tida em consideração. A prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs foi notável em todos os ambientes estudados, sugerindo uma expansão global destas enzimas (Mesa *et al.*, 2006).

Disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL na comunidade

A rápida e extensa disseminação de *E. coli* produtoras de ESBLs na comunidade é um fenómeno intrigante na epidemiologia contemporânea, em que os componentes principais (reservatórios e meios de transmissão) ainda não foram explicados. Enquanto várias descobertas indirectas sugerem que a aquisição de isolados com ESBLs pode ser mediada pelos alimentos, sabe-se pouco da dinâmica como estas enzimas se espalham entre os humanos, um problema que interessa para efeitos de controlo. A prevalência de portadores fecais de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em pacientes da comunidade (estudados na maioria dos casos em amostras fecais de pacientes com diarreia aguda) e em pessoas saudáveis, tem sido investigada em vários estudos. Nestes estudos, a *E. coli* foi a espécie mais encontrada nos isolados (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008_b).

Na Arábia Saudita, foram avaliados portadores fecais de organismos produtores de ESBLs em 272 pacientes internados, 162 pacientes do ambulatório e 426 indivíduos saudáveis assintomáticos. Das 860 culturas de fezes, 152 (17,7%) tinham organismos produtores de ESBLs. Dos isolados com ESBLs 71 (26,1%) eram de pacientes internados, 25 (15,4%) de pacientes do ambulatório e 56 (13,1%) de indivíduos saudáveis o que sugere que a comunidade pode ser um reservatório de organismos produtores de ESBLs (Kader *et al.*, 2007).

Os organismos produtores de beta-lactamases de espectro alargado são emergentes como uma causa de infecção nos pacientes da comunidade em muitas áreas do mundo. A maioria destes envolve infecções do tracto urinário causadas por *Escherichia coli* tendo ESBLs do tipo CTX-M. Os factores de risco para estas infecções incluem idade avançada e uso prévio de quinolonas e cefalosporinas. As alternativas para o tratamento oral para estas infecções estão limitadas. Estes organismos também podem causar algumas infecções graves adquiridas na comunidade que causam risco de vida, tais como bacteremia por infecção inicial do tracto urinário ou infecção intra-abdominal. Os pacientes com estas infecções têm a probabilidade de receber um tratamento empírico inadequado. São necessários mais estudos que abordem os factores de risco e as opções terapêuticas para estas infecções (Rodríguez-Baño and Navarro, 2008_c).

Os dados relativos a factores de risco, características clínicas e opções terapêuticas são escassos para as infecções por *Escherichia coli* produtoras de beta-

lactamases de espectro alargado adquiridas na comunidade. Um estudo de controlo foi feito para investigar os factores de risco para todos os tipos de infecções adquiridas na comunidade, causadas por *E. coli* produtoras de ESBL, em 11 hospitais de Espanha, de Fevereiro de 2002 a Maio de 2003. Os controlos eram escolhidos aleatoriamente entre os pacientes do ambulatório em que as amostras clínicas não tinham *E. coli* produtoras de ESBL. As características clínicas dessas infecções foram investigadas nos casos dos pacientes. Foi estudado um total de 122 casos. Foram seleccionados factores de risco que incluíram: idade superior a 60 anos; sexo feminino; diabetes mellitus; infecções do tracto urinário recorrentes; prévios procedimentos invasivos do tracto urinário; seguimento clínico dos pacientes no ambulatório; prévia utilização de aminopenicilinas, de cefalosporinas, e de fluoroquinolonas. Noventa e três por cento dos casos eram infecções do tracto urinário em que 6% dos pacientes tinham bacteremia e 10% precisavam de hospitalização. A taxa de cura dos pacientes com cistite foi 93% com terapêutica por fosfomicina (todos os isolados eram susceptíveis); e entre os pacientes tratados com amoxicilina/ácido clavulânico, a taxa de cura foi de 93% para os isolados susceptíveis ($MIC \leq 8 \mu\text{g/mL}$) e 56% para os isolados resistentes ou intermédio ($MIC \geq 16 \mu\text{g/mL}$). Nos pacientes com *E. coli* produtoras de ESBLs que são a grande causa de infecções adquiridas na comunidade, particularmente de infecções do tracto urinário (UTIs), a fosfomicina e a amoxicilina/ácido clavulânico foram efectivos no tratamento de cistites causadas por isolados susceptíveis. Os objectivos deste estudo multicêntrico foram: fornecer uma visão abrangente das características epidemiológicas, a relevância clínica das infecções adquiridas na comunidade causadas por *E. coli* produtoras de ESBLs e analisar a eficácia terapêutica do tratamento de UTIs causadas por estes organismos. Onze hospitais públicos espanhóis, localizados em 5 áreas distintas geograficamente, à mesma distância uns dos outros (Barcelona, Madrid, Maiorca, Sevilha e Valência) participaram neste estudo. Os laboratórios de microbiologia destes hospitais recebem amostras dos doentes hospitalizados, de serviços de urgência, de clínicas especializadas no ambulatório e de centros de cuidados primários. No total, foi atendida uma população superior a 4 milhões de pessoas. Cada laboratório analisa mais de 90% das amostras dos centros de saúde das respectivas áreas. Os factores de risco para as infecções causadas por *E. coli* produtoras de ESBLs em pacientes do ambulatório foram investigados num conjunto de pacientes estabelecido previamente para constituírem o “caso-controlo” em que se suspeitava terem uma infecção adquirida na comunidade. As amostras podiam ser obtidas em centros de cuidados primários em clínicas do ambulatório ou em serviços de urgência. Um caso índice foi definido como uma pessoa

em que a amostra clínica tinha *E. coli* produtora de ESBL. Para cada caso índice foram escolhidos 2 controlos aleatoriamente (por computador) daqueles pacientes do ambulatório em que a amostra clínica foi analisada durante a semana seguinte e que não tinham *E. coli* produtora de ESBL. As seguintes variáveis foram obtidas de todos os casos índice e dos controlos usando um questionário estruturado: dados demográficos, doenças de base, história de UTI recorrente, admissão prévia em qualquer centro de cuidados de saúde de longo termo (incluindo instituições de convalescença) ou unidade de cuidados intensivos, consultas especializadas no ambulatório, presença de dispositivos médicos (cateteres, urinário ou vascular), diálise, recurso a centro especializado em cuidados de saúde, terapia intravenosa no ambulatório, procedimentos invasivos, cirurgias, antimicrobianos usados nos últimos 3 meses. Foram consideradas infecções associadas aos cuidados de saúde se preenchessem qualquer um dos seguintes critérios: hospitalização nos cuidados intensivos mais de 48 horas durante o último ano; residência numa instituição de convalescença ou num centro de cuidados de longo prazo; tratamento de hemodiálise, quimioterapia antineoplásica, terapia intravenosa em casa ou num centro de cuidados especializados nos últimos 3 meses e cirurgia de ambulatório ou procedimento endoscópico realizados nos 3 meses anteriores. O significado clínico de *E. coli* produtora de ESBLs foi investigado no caso dos pacientes. O tipo de infecção foi classificada usando dados laboratoriais e clínicos. Os pacientes com culturas positivas de urina e sinais clínicos de UTI foram considerados como tendo UTI; a localização da UTI foi definida por critérios clínicos. A eficácia do tratamento antimicrobiano foi avaliada nos pacientes com cistites causadas por *E. coli* produtoras de ESBL usando os critérios descritos anteriormente; os pacientes foram seguidos durante 4 semanas depois de terminada a terapia. Os isolados produtores de beta-lactamases de espectro alargado foram estudados nos centros participantes de acordo com as recomendações do CLSI. Todos os isolados foram enviados para um laboratório de referência onde identificaram até à espécie e a produção de ESBLs foi confirmada por microdiluição em caldo; a susceptibilidade aos antibióticos foi avaliada por microdiluição de acordo com as "guidelines" do CLSI sendo a susceptibilidade da fosfomicina avaliada por E-test. As infecções adquiridas na comunidade causadas por estirpes produtoras de ESBLs têm sido reportadas mundialmente, incluindo os Estados Unidos, e continuam a aumentar, embora se verifiquem diferenças regionais nas taxas. Este é o primeiro estudo multicêntrico que inclui uma detalhada investigação clínica e epidemiológica e pode fornecer uma visão abrangente para os problemas colocados pelas *E. coli* produtoras de ESBLs como patógenos comunitários. Embora o parentesco clonal dos isolados não

tenha sido investigado neste estudo, estudos anteriores mostraram que a maioria das *E. coli* era produtora de ESBLs isoladas em pacientes da comunidade em Espanha e eram clonalmente não relacionadas durante aquele período. Estes dados confirmam alguns dos factores de risco encontrados em estudos prévios, tais como a idade avançada, diabetes mellitus, UTIs recorrentes, uso prévio de fluoroquinolonas ou cefalosporinas. Aqui, reportaram pela primeira vez, o conhecimento de que anteriores tratamentos com aminopenicilinas são também um factor de risco como referido por Cavaco *et al.*, 2008, num estudo *in vivo* no uso da amoxicilina em suínos. O incluir as aminopenicilinas nos factores de risco está relacionado com o facto de que todas as *E. coli* produtoras de ESBLs são, por definição, resistentes à ampicilina; em Espanha, a frequência de UTIs causadas por *E. coli* resistentes à ampicilina e amoxicilina/ácido clavulânico são aproximadamente 60% e 9% respectivamente. Assim, a aminopenicilina usada em pacientes previamente colonizados pode seleccionar não só estirpes resistentes à aminopenicilina mas também produtores de ESBLs. O perfil de susceptibilidade dos isolados confirma que as alternativas orais para tais infecções estão consideravelmente limitadas; além das cefalosporinas, para as quais estes isolados são inerentemente resistentes, a resistência à ciprofloxacina e ao trimetoprim-sulfametoxazol ocorre em 64% e 57% respectivamente. Apenas a fosfomicina mostrou actividade consistente *in vitro*. Estes resultados e dos estudos anteriores sugerem que a fosfomicina pode ser a terapia preferida. De acordo com os dados *in vitro*, a nitrofurantoína pode ser uma opção porque aproximadamente 70% dos isolados são susceptíveis, embora o fármaco não seja bem tolerado por alguns pacientes e não deva ser usado em doentes com insuficiência renal. Outra opção pode ser a amoxicilina/ácido clavulânico; neste estudo, apenas 29% dos isolados foram resistentes *in vitro*. Contudo, a eficácia clínica das combinações beta-lactâmico/inibidor de beta-lactamase tem sido questionada. Os dados obtidos sugerem que pode ser útil para cistites causadas por isolados com valores de MIC ≤ 8 µg/mL. Infelizmente, a resistência à amoxicilina/ácido clavulânico entre *E. coli* produtoras de ESBLs é frequente em algumas áreas. Este estudo confirma que, os pacientes predispostos a infecções adquiridas na comunidade, a principal causa é a *E. coli* produtora de ESBL. Caso este mecanismo de resistência se propague na *E. coli*, a ESBL da comunidade pode tornar-se uma preocupação para a saúde pública nos próximos anos (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008_a).

O objectivo do estudo de Arpin e colaboradores é avaliar na comunidade a prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em França, durante 2006. Os

isolados de todas as *Enterobacteriaceae* de amostras de urina de pacientes com uma diminuição de susceptibilidade para as cefalosporinas de largo espectro, foram analisadas para a presença de beta-lactamases (testes de sinergismo, isoelectrofocagem, transferência por conjugação, amplificação por PCR, e/ou experiências de clonagem e sequenciação). Adicionalmente, co-resistências foram investigadas por PCR, sequenciação e/ou clonagem. A relação epidemiológica foi estudada por PFGE para todas as espécies e, adicionalmente, para a *Escherichia coli* determinou-se o grupo filogenético, o tipo de sequência multilocus (ST) e o antígeno O25b. As características dos portadores de *E. coli* produtora de CTX-M foram comparadas com outros portadores de ESBLs. Setenta e duas *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs foram obtidas de 71 pacientes. A maioria expressa uma enzima CTX-M (n=42 compreendendo 40 *E. coli*), com uma predominância de CTX-M-15 (n=24); 10 *E. coli* produtoras de CTX-M-15 pertencem ao mesmo clone (filogrupo B2, ST131, serótipo O25b). As restantes 30 estirpes possuem um tipo ESBL TEM ou SHV. Os factores de risco para a aquisição de ESBL eram menos frequentes quando a ESBL foi do tipo CTX-M, excepto quando houve terapia prévia antimicrobiana. Dezoito por cento dos pacientes tinham uma verdadeira ESBL adquirida na comunidade, sendo a maioria das *E. coli* produtora de CTX-M. Este primeiro estudo francês relata uma prevalência de ESBL de 1,1% na comunidade francesa durante 2006, principalmente relacionado com a presença de estirpes de *E. coli* produtoras de CTX-M (Arpin *et al.*, 2009).

O estudo de Cekanová e colaboradores tem como objectivo de terminar a prevalência de enterobactérias com ESBLs positivas no tracto gastrointestinal de pessoas da comunidade da República Checa. As zaragoas rectais foram analisadas e as enterobactérias foram identificadas por sistema automático. Os resultados foram confirmados por PCR e sequenciados os amplicões positivos de CTX-M. Um total de 579 zaragoas rectais foram analisadas e a produção de ESBLs foi fenotipicamente e genotipicamente confirmada em 7 isolados. A prevalência de ESBLs positiva foi de 1,2%. Todos os casos foram de estirpes de *E. coli* produtoras de ESBLs do tipo CTX-M. A enzima CTX-M-15 foi o tipo mais prevalente neste grupo de isolados. Os resultados estão de acordo com outros estudos e sugerem que o perfil epidemiológico de enterobactérias com ESBLs positiva, na República Checa, é idêntico a outros países europeus (Cekanová *et al.*, 2009).

No estudo de Vinué e colaboradores, no ano de 2007, em duas cidades espanholas, foram detectadas 7 *Escherichia coli* produtoras de ESBLs em 105 isolados

de amostras fecais de pessoas saudáveis. Os isolados com ESBLs tinham CTX-M-14 (n=2), CTX-M-1 (n=2), CTX-M-32 (n=1), CTX-M-8 (n=1) e TEM-52 (n=1). Neste estudo foram identificadas as variantes *bla*_(CTX-M-14a) e *bla*_(CTX-M-14b). Esta foi a primeira vez que o gene *bla*_(CTX-M-8) e as ESBLs do grupo CTX-M-8 foram encontradas na Europa e em Espanha respectivamente. As *E. coli* fecais nas pessoas saudáveis constituem um reservatório de genes *bla*_(CTX-M) com diferentes elementos genéticos circundantes (Vinué *et al.*, 2009).

No estudo de Rodríguez-Baño *et al.*, 2009, foram comparadas as características epidemiológicas das *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamase de espectro alargado (ESBLEC) produtoras de CTX-M e SHV ca usadoras de infecções adquiridas na comunidade. Foi realizado um estudo multicêntrico incluindo todas as infecções adquiridas na comunidade por ESBLEC em quatro áreas geográficas de Espanha. A caracterização das ESBL foi feita por focagem isoelectrica, PCR e sequenciação. Todos os pacientes foram investigados relativamente à demografia, cuidados médicos anteriores, comorbilidade, uso de antibióticos, procedimentos invasivos e tipo de infecção. Foram estudados cento e vinte e dois casos e 95% eram infecções do tracto urinário. As ESBLs isoladas nos 112 casos foram caracterizadas: 77 isolados eram produtores de enzimas CTX-M, 36 isolados eram produtores de enzimas SHV e 7 isolados eram produtores de enzimas TEM (8 isolados eram produtores de mais do que uma ESBL). Foram comparados os pacientes com isolados produtores só de enzimas CTX-M (grupo CTX-M, n=70) com pacientes com isolados produtores só de enzimas SHV (grupo SHV, n=31). Não houve diferenças quanto à doença de base, a prévios cuidados médicos, a procedimentos invasivos, ao uso de antibióticos ou ao tipo de infecção mas as comorbilidades estavam associadas a isolados com SHV enquanto a idade superior a 60 anos estava associada a isolados com CTX-M. As ESBLEC produtoras de SHV são uma causa significativa de infecções adquiridas na comunidade, em Espanha; a epidemiologia clínica destes isolados parece ser muito semelhante à das ESBLEC produtoras de CTX-M (Rodríguez-Baño *et al.*, 2009).

Em três áreas diferentes de Espanha estudaram a prevalência de portadores fecais que aumentou significativamente nos últimos anos, atingindo taxas entre 5,5% e 8,1% durante 2002 e 2004. A prevalência de portadores fecais foi de 1,4% em York (Reino Unido) em 2003, 2,4% no Líbano e 7,0% na Índia. Uma taxa elevada de 15,4%, foi encontrada na Arábia Saudita. Ben-Ami *et al.*, 2006, detectaram que 10,8% dos pacientes estudados na admissão no hospital em Israel eram portadores fecais. Um aumento

significativo na prevalência de portadores fecais (0,1% em 2001 para 1,7% em 2005) também foi observado em crianças saudáveis na Bolívia e Peru. A prevalência de portadores fecais entre pacientes atendidos e em unidades de urgência neste estudo (7,4%) foi semelhante à dos outros estudos espanhóis. O interessante, é que a prevalência de portadores fecais é significativamente maior nos parentes dos pacientes diagnosticados com UTI adquirida na comunidade causada por *E. coli* produtora de ESBLs (23,8%) e ser parente desses pacientes não foi associado ao aumento do risco para ser um portador. O risco era maior nos membros do agregado familiar do que nos outros parentes indicando a aquisição de uma fonte comum ou transmissão pessoa-a-pessoa dentro das famílias. Foi feito um estudo para determinar os portadores fecais de *E. coli* produtora de ESBLs em 53 pacientes da comunidade com UTI devida ao mesmo organismo, 73 membros de agregados familiares, 32 pacientes sem agregado familiar e 54 pacientes independentes. A relação clonal dos isolados foi investigada usando PCR e PFGE, e as ESBLs foram caracterizadas por PCR e sequenciação. A prevalência de portadores fecais foi de 67,8% nos pacientes com UTI, 27,4% nos membros do agregado familiar, 15,6% nos pacientes sem agregado familiar e 7,4% nos pacientes sem relação. Entre os parentes, os que comeram a refeição principal fora de casa durante um período superior a 15 dias no mês anterior tinham menos probabilidade de serem portadores fecais. Os isolados fecais dos pacientes com UTI eram produtores de CTX-M em 66,6% e produtores de SHV em 33,3% dos casos, enquanto as percentagens dos outros grupos de população estudada foram 40,0% a 55,5% e 50,0% a 75,0%, respectivamente. Dezanove famílias tinham mais que um membro portador, 8 famílias tinham 2 membros com isolados relacionados clonalmente, 8 famílias tinham 2 membros portadores de diferentes clones produtores das mesmas enzimas e em 3 famílias todos os membros tinham uma enzima diferente. Este estudo tem várias limitações. Primeiro, não tem um estudo de relação molecular dos plasmídeos das ESBLs que podia ajudar na compreensão da dinâmica da disseminação das ESBLs. Segundo, o extenso contacto de pessoa-a-pessoa entre parentes não foi investigado aprofundadamente e logo não foi possível avaliar se diferentes tipos de contacto estão associados com diferentes riscos de transmissão; também não foram recolhidos certos dados acerca do agregado familiar como partilhar casas de banho e hábitos de higiene, o que pode ser determinante para a condição de portador fecal. Terceiro, o estudo pode não ter poder estatístico suficiente para detectar alguns factores de risco devido ao número baixo de pessoas colonizadas em alguns subgrupos e nem todos os parentes foram estudados. Os dados sugerem que as UTI adquiridas na comunidade por *E. coli* produtora de ESBLs são uma infecção

endógena em cerca de metade dos pacientes; a prevalência de portadores fecais com *E. coli* produtora de ESBLs é mais frequente nos parentes dos pacientes com UTI que nas pessoas sem parentesco; a transmissão pessoa-a-pessoa e a aquisição pela mesma fonte, estão provavelmente relacionadas com os alimentos ou hábitos alimentares, que pode contribuir para a disseminação das ESBLs no agregado familiar (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008_b).

De Abril de 2004 a Junho de 2005, recorreram ao Hospital Universitário Ramón e Cajal em Madrid 299 pacientes com uma infecção ou colonização evidenciada um organismo produtor de ESBLs. Cinquenta e seis por cento eram pacientes da comunidade, dos quais 95% tinham uma UTI. Foram estudadas 40 amostras clínicas de 40 pacientes (casos índice-ICs) com infecções adquiridas na comunidade (37 infecções do tracto urinário, 2 casos de bacteremia e uma infecção de tecido mole) de vido a estirpes de *E. coli* (n=39) ou *Klebsiella pneumoniae* (n=1) produtoras de ESBLs e também foram estudadas amostras de fezes (uma amostra de fezes por IC). Trinta e quatro dos 40 pacientes eram do sexo feminino, dos 2 a os 96 anos de idade. Adicionalmente, 54 amostras fecais de 54 contactos domiciliários de 29 pacientes foram também estudadas; o número dos contactos domiciliários por cada paciente variou de um a sete. Setenta e dois por cento (21 de 29) dos pacientes tinham uma estirpe clínica de *E. coli* com o mesmo tipo de PFGE como as das suas amostras fecais. Além disso, análises de PFGE revelaram padrões indistintos entre os isolados de *E. coli* produtores de ESBLs dos pacientes (amostra clínica ou amostra fecal) e seus correspondentes contactos domiciliários para 66% (6 em 9) dos isolados. A caracterização das ESBLs revelou um predomínio de CTX-M-14 (57%) e SHV-12 (18,6%), o aparecimento de ESBLs pertencentes ao grupo CTX-M-1 (7,1%) e uma pequena representação das enzimas TEM (5,7%). Esta distribuição está de acordo com a situação e epidemiológica das estirpes produtoras de ESBLs na comunidade, no momento deste estudo. É de notar que 2 pacientes e 2 contactos domiciliários estavam colonizados com 2 estirpes diferentes produtoras de ESBLs. Este estudo demonstra uma alta taxa (70%) de colonização intestinal de pacientes com infecções adquiridas na comunidade devido a organismos produtores de ESBLs. A presença destes patógenos nos intestinos é considerada um factor de risco para infecções com estas bactérias. Além disso, isto pode explicar a alta taxa de isolamento destes organismos em certos locais anatómicos (infecções abdominais e do tracto urinário) em comparação com as taxas observadas noutros locais onde não há uma indicação clara da presença da microbiota endógena. É de notar que

este resultado de 70% é semelhante ao observado nos pacientes hospitalizados sob alta pressãõ selectiva antimicrobiana. Cerca de 50% dos pacientes recebeu tratamento antimicrobiano (18 pacientes) ou assistência médica fora do hospital (22 pacientes) pelo menos 2 meses antes de terem infecções por organismos produtores de ESBLs; essas condições têm sido definidas como factores de risco para a colonização com estes patogéneos. Uma importante descoberta foi a alta taxa de colonização intestinal (16,7%) nos membros do agregado familiar dos pacientes com infecções adquiridas na comunidade com organismos produtores de ESBLs. Este valor é maior que o encontrado anteriormente na mesma área geográfica e noutros países para indivíduos saudáveis e é ainda maior (42,1%) nos subgrupos dos contactos domiciliares dos pacientes portadores fecais. Estes resultados revelam a importância da colonização fecal como um reservatório para a transmissão de bactérias resistentes e o seu potente papel como disseminador de genes de resistência aos antibióticos. Este assunto tem sido estudado em ambientes nosocomiais, nos quais é sabido que para cada paciente com uma infecção clinicamente grave devido a um organismo produtor de ESBL, pelo menos outro paciente com colonização intestinal por um produtor de ESBL está na mesma unidade. Em resumo, foram observadas taxas altas de colonização intestinal com organismos produtores de ESBLs em pacientes da comunidade infectados com estas estirpes. Os contactos do agregado familiar destes pacientes têm taxas altas de colonização intestinal com organismos produtores de ESBLs, como referiu Rodríguez-Baño *et al.*, 2008_b), e que é maior que a dos pacientes da comunidade e da população em geral. Esses resultados destacam o facto dos pacientes da comunidade e os contactos do seu agregado familiar representarem um reservatório para estes organismos e genes correspondentes *bla*_(ESBL). Este facto aumenta o risco de disseminação destes organismos para as pessoas saudáveis e facilita a aquisição de mecanismos de resistência por bactérias susceptíveis (Valverde *et al.*, 2008).

Não existem dados abrangentes disponíveis sobre a prevalência dos factores de risco e dos genótipos produtores de ESBLs dos residentes na comunidade da China. Amostras rectais de 270 pessoas de idade foram colhidas em 4 comunidades. A prevalência de portadores rectais de *E. coli* produtores de ESBL foi de 7%. Dezanove isolados produziram ESBLs do tipo CTX-M incluindo CTX-M-14 (11 estirpes), CTX-M-22 (3 estirpes), CTX-M-79 (3 estirpes), CTX-M-24 (1 estirpe) e CTX-M-24 + CTX-M-79 (1 estirpe). A ESBL CTX-M-79 foi pela primeira vez detectada no mundo. As estirpes produtoras de ESBL eram clonalmente independentes. O aparecimento de produtores de

ESBL está fortemente associado com o uso de antibióticos nos últimos 3 meses na comunidade chinesa (Tian *et al.*, 2008).

Na Turquia investigaram os factores de risco para infecções do tracto urinário adquiridas na comunidade devido a *Escherichia coli* ou *Klebsiella pneumoniae* produtoras de beta-lactamases de espectro alargado em 62 pacientes que foram seguidos de Agosto de 2003 a Setembro de 2006. Foi usado um grupo de controlo de 60 pacientes reunindo as mesmas características mas cujas estirpes não eram produtoras de ESBLs. Foram investigados como factores de risco: a idade, o sexo, o cancro da bexiga, a hipertrofia benigna da próstata, o cancro da próstata, a urolitíase, o cateter urétral, a cirurgia urológica anterior, a diabetes mellitus, o uso de antibióticos e a hospitalização durante os últimos 3 meses. O conhecimento dos factores de risco para infecções do tracto urinário adquiridas na comunidade causadas por *E. coli* ou *K. pneumoniae* é de grande importância na antibioterapia empírica (Yilmaz *et al.*, 2008).

O objectivo do estudo a seguir referido foi determinar os factores de risco para infecções do tracto urinário adquiridas na comunidade causadas por *Escherichia coli* produtoras de ESBLs e a distribuição do tipo de ESBL. Foram preenchidos inquéritos para fazer o diagnóstico dos pacientes com UTI adquirida na comunidade em 4 locais geográficos diferentes da Turquia. Os isolados foram enviados para um laboratório central, a susceptibilidade aos antibióticos foi determinada de acordo com os critérios do CLSI. Foram usados PCR e sequenciação de DNA para caracterizar os genes *bla*_(TEM), *bla*_(CTX-M) e *bla*_(SHV). Um total de 510 pacientes com UTI causadas por bactérias de gram negativo foi incluído neste estudo. Foram detectadas ESBLs em 17 de 269 (6,3%) isolados de *E. coli* de UTIs não complicadas e 34 de 195 (17,4%) de isolados de *E. coli* de UTIs complicadas. Mais de 3 infecções do tracto urinário no ano anterior, o uso de antibióticos beta-lactâmicos nos últimos 3 meses e doença prostática foram associados com a presença de ESBL. As percentagens de isolados com resistência simultânea ao trimetoprim-sulfametoxazol, à ciprofloxacina e à gentamicina foram encontradas em 4,6% num grupo de ESBL negativo e 39,2% no grupo de ESBL positivo. Quarenta e seis de cinquenta e um isolados com ESBL positivo (90,2%) tinham CTX-M-15. As alternativas terapêuticas para as UTI, particularmente na comunidade, estão limitadas (Azap *et al.*, 2010).

As infecções causadas por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs são cada vez mais frequentes e estão associadas com altas taxas de mortalidade. A circulação de

ESBLs do tipo CTX-M na comunidade é um particular preocupação porque pode confundir as medidas “standard” do controlo da infecção. Foram analisados os resultados de estudos epidemiológicos de infecções causadas por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em pacientes não hospitalizados de 6 centros na Europa, Ásia e América do Norte. Um total de 983 isolados de pacientes específicos foi revisto: 890 (90,5%) eram *E. coli*, 68 (6,9%) eram *Klebsiella spp* e 25 (2,5%) eram *Proteus mirabilis*; 339 (34,5%) dos isolados produziram ESBLs. O tipo mais frequente de ESBL foi CTX-M (65%). As taxas de co-resistência para a ciprofloxacina entre os isolados produtores de ESBL foi alta, superior a 70%, mas foi observada uma variação significativa nas taxas, entre os centros, para a resistência à gentamicina, à amoxicilina/ácido clavulânico e ao trimetoprim-sulfametoxazol. Os factores de risco eram semelhantes para as infecções com organismos produtores de ESBL nos diferentes centros participantes. Os factores de risco mais importantes foram o recente uso de antibióticos, a permanência em instituições de cuidados de saúde de tempo prolongado, a recente hospitalização, a idade igual ou superior a 65 anos e o sexo masculino. Contudo, 34% dos isolados produtores de ESBL (115 de 336 isolados) foram obtidos de pacientes que não tiveram nenhum tratamento recente. Novas abordagens são necessárias para responder a questões como o tratamento empírico de infecções graves adquiridas na comunidade e para o controlo da infecção (Ben-Ami *et al.*, 2009).

Unidades prestadoras de cuidados de saúde e hospitais, a maior origem de ESBLs

Para avaliar a prevalência e os factores de risco de portadores fecais de *Escherichia coli* produtoras de ESBLs resistentes a fluoroquinolonas (*E. coli*-MDR) entre os residentes de Lares para Idosos no norte da Irlanda, fez-se um estudo entre Janeiro de 2004 e Maio de 2006, em que se levantaram dados sobre os internamentos hospitalares, os tratamentos com antimicrobianos e as comorbilidades. Fizeram-se culturas das amostras fecais para *E. coli*-MDR e os isolados e os genes das ESBLs foram tipados por um laboratório de referência. Dos 294 pacientes incluídos no estudo, 119 das amostras fecais (40,5%) eram *E. coli*-MDR. A variação de portadores nos diferentes lares foi de 0% a 75%. A estirpe epidémica A, pertencente ao ST131 e ao serótipo O25:H4 com a enzima CTX-M-15, foi encontrada em 58 (49%) isolados; houve uma variação de 0% a 100% entre os lares. Cinquenta e um por cento dos portadores não tinham história de internamento hospitalar recente e apenas 13,5% tinham infecção ou colonização por *Escherichia coli* produtoras de ESBLs. Os dias de uso de fluoroquinolonas e os dados sobre infecções urinárias foram as variáveis associadas com o risco de portadores de *E. coli*-MDR. O alto nível de portadores fecais com *E. coli*-MDR nos residentes de Lares para Idosos demonstra a sua importância como uma população reservatório. Medidas de saúde pública deverão atender às necessidades para combater a disseminação desses organismos neste grupo (Rooney *et al.*, 2009).

Para determinar a eficácia da higiene das mãos em locais de prestação de cuidados de saúde, com a finalidade de reduzir as infecções nosocomiais (NIs), os autores fizeram um estudo prospectivo medindo as taxas de NIs numa enfermaria de urologia em Ho Chi Minh City, Vietname, antes e depois da implementação do programa de higiene das mãos com um descontaminante de base alcoólica. As taxas de adesão da higiene das mãos da equipa médica e de cuidadores foram registadas em folhas de observação normalizada. A incidência das NIs diminuiu 84%, de 13,1% para 2,1%, após a implementação do programa de higiene das mãos. A produção de beta-lactamase de espectro alargado foi detectada em 38,2% a 50% das *Enterobacteriaceae* isoladas de amostras clínicas. Após a implementação do programa de higiene das mãos foram reduzidos o tempo de internamento do paciente e o uso dos antibióticos. O programa de higiene das mãos foi eficaz na redução da incidência de NIs, diminuindo o tempo de internamento hospitalar e reduzindo o custo dos tratamentos. Estes programas com resultados quantificáveis podem ser implementados a um custo mínimo no

desenvolvimento dos cuidados de saúde e devem ser promovidos em todos os ambientes de saúde (Nguyen *et al.*, 2008).

Nos anos 90, publicações de ESBLs relatavam variantes *bla*_(SHV) ou *bla*_(TEM), as quais eram especialmente detectadas em isolados de *Klebsiella pneumoniae* nas unidades de cuidados intensivos. A situação tem-se alterado nos últimos anos com o aparecimento dum mecanismo de resistência das beta-lactamases CTX-M, principalmente entre isolados de *E. coli* (Cantón *et al.*, 2008; Rossolini *et al.*, 2008). Mais de 65 beta-lactamases diferentes pertencentes a 6 grupos diferentes foram notificadas até à data (Rossolini *et al.*, 2008). Os diferentes ambientes genéticos podem estar envolvidos na mobilização dos genes *bla*_(CTX-M). O objectivo deste trabalho foi realizar a caracterização das beta-lactamases de todos os isolados de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de espectro alargado durante um ano (Abril de 2003 a Março de 2004) num hospital espanhol, para determinar o ambiente genético dos genes *bla*_(CTX-M) e a sua possível inclusão nos integrões. Os resultados deste estudo foram comparados com os dados obtidos anteriormente para os isolados de *E. coli* no mesmo hospital em 2002 (Briñas *et al.*, 2005), com a finalidade de acompanhar a evolução das ESBLs e outros mecanismos de resistência a cefalosporinas de espectro alargado. A origem e o número dos isolados foram os seguintes: urina (37), ferida cirúrgica e exsudato (10), sangue (4), aspirado traqueobrônquico (5), pús (3), biliar (1) e líquido cefalorraquidiano (1). Os resultados mostraram um importante aumento na prevalência de ESBLs nos isolados de *E. coli* relativamente ao estudo anterior, sendo as ESBLs mais prevalentes as da classe CTX-M, especialmente as do grupo CTX-M-9 e, em pequena quantidade, também foram detectadas CTX-M-15 e CTX-M-32. Adicionalmente, as ESBLs do tipo SHV têm aumentado de importância representando 25% do total das ESBLs, estando a ocorrer uma diversidade das variantes SHV, como a identificação de uma nova variante SHV-102. Mais estudos devem ser realizados no futuro para acompanhar a evolução das ESBLs nos isolados de diferentes ambientes, países e continentes (Vinué *et al.*, 2008).

Foram estudadas as variáveis clínicas associadas com o isolamento de *Klebsiella pneumoniae* expressando diferentes beta-lactamases de espectro alargado. Os relatórios clínicos de pacientes com isolados de *K. pneumoniae* com ESBL positiva, entre os anos de 1989 e de 2003 (n=80), foram revistos retrospectivamente. Pacientes com ESBLs do tipo SHV e TEM foram identificadas mais frequentemente na unidade de cuidados intensivos (ICU) (67% e 78%, respectivamente), enquanto CTX-M foram encontradas em enfermarias (52,2%) ou em pacientes na comunidade (17,4%). A ausência de cateteres

urinários ou centrais está associada com CTX-M-10. As infecções relacionadas com cateter central e bacteremia secundária foram associadas mais frequentemente com ESBLs dos tipos SHV e TEM, enquanto infecções do tracto urinário foram associadas com CTX-M-10. O uso prévio de aminoglicosídeos foi associado particularmente com ESBLs do tipo SHV, enquanto o de amoxicilina/ácido clavulânico e de cefalosporinas orais foi associado com CTX-M-10. A frequência do tratamento empírico adequado foi baixa (22%) e 61% dos pacientes foram tratados de acordo com os resultados dos testes de susceptibilidade aos antibióticos. Neste estudo constatou-se que as características epidemiológicas dos pacientes diferiam de acordo com o tipo de ESBL, ou seja, ESBLs do tipo TEM foram encontradas principalmente em pacientes jovens na ICU, enquanto ESBLs do tipo CTX-M-10 foram isoladas de pacientes adultos do ambulatório ou que haviam sido internados em enfermarias. Os resultados clínicos e a taxa de mortalidade foram semelhantes aos relatados anteriormente e não foram observadas diferenças entre os tipos de ESBLs. A evolução contínua dos diferentes tipos de ESBL pode afectar a epidemiologia futura e as variáveis clínicas associadas às ESBLs da *K. pneumoniae* (Garcia San Miguel *et al.*, 2007).

Khanfar e colaboradores fizeram o primeiro estudo da Região do Golfo Árabe descrevendo a detecção de ESBLs em *Enterobacteriaceae* isoladas em todo o tipo de amostras, de diferentes pacientes com infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade. Dentro da Região do Golfo Árabe, existe uma alta prevalência de ESBLs (31,7%) no Kuwait e (41%) nos Emirados Árabes Unidos que foram isoladas em pacientes hospitalizados. Na Arábia Saudita, as taxas de ESBLs variam de 8,5% a 38,5%. Assim, em comparação com os dados regionais, os isolados produtores de ESBLs (6%) encontrados neste estudo está no extremo inferior do espectro. Esta conclusão é semelhante aos dados obtidos dos inquéritos em alguns países da Europa e da Ásia. Para avaliar a prevalência de estirpes de *Escherichia coli* e *Klebsiella spp* produtoras de ESBLs em infecções adquiridas na comunidade e nosocomiais foi realizado um estudo num laboratório de microbiologia centralizado numa província oriental da Arábia Saudita. Os relatórios laboratoriais foram avaliados de Janeiro de 2004 a Dezembro de 2005 e foi determinada a resistência associada ao perfil de antibióticos. Um total de 6750 organismos de gram negativo foi avaliado para o fenótipo-ESBL e as ESBLs foram detectadas em 6% dos isolados, em que a maioria foi *E. coli* (83%). Verificou-se que idade superior a 60 anos era um factor de risco para ter um patógeno produtor de ESBL. Os produtores de ESBLs foram significativamente mais elevados nos

isolados dos pacientes hospitalizados (15,4%) do que nos pacientes da comunidade (4,5%). A urina foi a principal fonte de isolados de ESBLs nos pacientes hospitalizados (46,1%) e nos pacientes da comunidade (74,4%). O número de isolados na urina produtores de ESBLs foi mais alto nos pacientes hospitalizados (10,4%) do que nos pacientes da comunidade (4,4%). Entre os pacientes hospitalizados, 60% de infecções associadas a ESBLs eram nosocomiais, sendo todos os isolados sensíveis ao imipenem mas apresentando altos níveis de resistência à gentamicina, à ampicacina, à amoxicilina/ácido clavulânico e à ciprofloxacina. Este é o primeiro relatório com dados da distinção entre infecções nosocomial e adquirida na comunidade por ESBLs, baseados em critérios definidos internacionalmente, na Arábia Saudita. Os autores defendem o aumento da vigilância bem como os estudos globais multicêntricos/multinacionais para resolver este problema emergente de infecções associadas a ESBLs (Khanfar *et al.*, 2009).

O objectivo do estudo de Mumtaz e colaboradores foi determinar a prevalência dos bacilos gram negativo produtores de ESBLs nos isolados clínicos. Este estudo decorreu num hospital do Paquistão durante um período de dois anos (de Março de 2004 a Abril de 2006). Os isolados de 609 bacilos entéricos gram negativo de várias amostras foram testadas quanto à produção de ESBLs pelo teste de sinergismo de duplo disco. Foram analisados 176 isolados produtores de ESBLs em amostras de pacientes hospitalizados e pacientes do ambulatório. Em 165 isolados produtores de ESBLs foram analisados o género dos pacientes e a idade dos três meses aos oitenta e nove anos. Os isolados produtores de ESBLs foram mais isolados nos pacientes hospitalizados (88,1%) do que nos pacientes da comunidade (11,9%). A *Escherichia coli* foi o organismo mais frequente nos pacientes hospitalizados enquanto a *Klebsiella pneumoniae* foi a mais prevalente nos pacientes da comunidade. As ESBLs foram mais frequentes nos pacientes do sexo feminino (64,3%), das quais 45,1% eram infecções do tracto urinário, do que nos pacientes do sexo masculino (35,7%) nos quais foram mais frequentes nas amostras de pus (54,2%). Os bacilos entéricos gram negativo (EGNR) produtores de ESBLs são mais isolados em pacientes com idade mais avançada por volta dos 61-70 anos (27,9%) seguida dos 41-50 anos (20%). Outro pico (13,3%) foi também observado no grupo etário mais jovem entre 11-20 anos. A menor prevalência de 5,5% foi observada em dois grupos etários (0-10 e 31-40 anos). No caso dos pacientes femininos, EGNR produtoras de ESBLs foram mais frequentemente isoladas (29,2%) num grupo etário de

meia-idade (41-50 anos) se guido por grupos com mais idade (51-60 e 61-70 anos), (15,1% e 25,5%) (Mumtaz *et al.*, 2007).

Rastreo na admissão Hospitalar

Para determinar as taxas dos factores de risco dos portadores e a aquisição de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs durante a hospitalização, fez-se um estudo num hospital de ensino em Jerusalém, com 550 camas, durante um período de 5 meses, de 1 de Fevereiro a 30 de Junho de 2004. Dos 1985 pacientes admitidos para medicina geral, naquele período, 167 (8%) foram incluídos neste estudo, dos quais foram obtidas amostras por zangano rectal na admissão e de 2 em 2 dias ou de 3 em 3 dias até à alta hospitalar ou morte. Os isolados de *Enterobacteriaceae* foram testados para ESBLs positivas, tendo-se identificado 13 (8%) portadores de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs na admissão. Os factores de risco para os portadores incluíram o sexo feminino, ser residente em lares e tratamento recente com antibióticos. Durante a hospitalização, 35 (21%) dos 167 pacientes ficaram portadores de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs. Dos 12 pacientes que ainda estavam no hospital 2 semanas após a admissão, 4 (33%) também ficaram portadores de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs. Os factores de risco para a aquisição de estirpes produtoras de ESBLs incluíram a idade superior a 65 anos, ser residente em lares, as alterações cognitivas, o tratamento recente com antibióticos, a respiração assistida e a hospitalização prolongada (Friedmann *et al.*, 2009).

As *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases de espectro alargado (E-ESBL) estão a aumentar em todo o mundo, mas existem poucos dados acerca da transmissão paciente-a-paciente e da prevalência entre grupos de risco, na Suíça.

Um estudo prospectivo dum coorte foi realizado com os seguintes objectivos:

1-avaliar a prevalência de E-ESBL, na admissão, entre grupos de risco;

2-avaliar as transmissões nosocomiais cruzadas nos cuidados intensivos

(ACF) versus unidades de cuidados continuados (LTCF);

3-avaliar a prevalência de mutações nos genes das beta-lactamases detectadas.

Foram predefinidos grupos de risco rastreados na admissão ou após estarem em contacto com pacientes diagnosticados com E-ESBL.

Distinguiram-se três categorias de pacientes:

Categoria I - pacientes já identificados como portadores de E-ESBL

Categoria II - pacientes vindos de países com alta prevalência de E-ESBL e, portanto, prováveis portadores de E-ESBL

Categoria III - companheiros de quarto dos pacientes índice

Foi identificado um total de 93 pacientes com E-ESBL: 62% (31/50) dos pacientes da categoria I; 18%(22/124) dos pacientes da categoria II; 8 de 177 (4,5%) dos pacientes da categoria III 5 tinham estirpes idênticas de E-ESBL ou partilhavam o mesmo gene de beta-lactamase do seu caso índice. A densidade de incidência da transmissão foi de 0,9/1000 dias de exposição na ACF que é superior à da LTCF (0,4/1000). A CTX-M-15 foi a beta-lactamase predominante (60%) entre os pacientes índice. O estudo mostra que E-ESBL são mais encontradas em grupos predefinidos de alto risco para ser portador de E-ESBL. A maioria dos pacientes (62%) conhecidos como portadores de E-ESBL foi ainda positiva na readmissão. O tempo médio de intervalo da confirmação de E-ESBL foi quase de 5 meses, embora houvesse considerável variação do tempo entre o primeiro e o último isolamento de E-ESBL. Assim, justifica-se colocar os portadores de E-ESBL em isolamento na admissão. A maioria das estirpes de E-ESBL tem o gene da beta-lactamase CTX-M-15 que se tornou o tipo mais comum na parte ocidental da Suíça. Em estudos na Alemanha dos últimos três anos, os autores obtiveram resultados semelhantes aos deste estudo para a taxa de incidência de E-ESBL. Enquanto a alta taxa de pacientes colonizados permanece positiva na readmissão, confirmando as conclusões de Kola *et al.*, 2007, (70%), taxas mais baixas de colonização foram encontradas nos EUA. Os factores de risco para os portadores de E-ESBL foram amplamente descritos na literatura. Os critérios predefinidos de rastreio, baseados em resultados anteriores, estabelecidos para a admissão dos pacientes confirmaram que certos grupos de pacientes têm maior risco de serem portadores de E-ESBL. Esta observação é consistente com outros resultados descritos de taxas elevadas de E-ESBL em pacientes repatriados de países com elevada prevalência de E-ESBL. Foram documentadas 5 transmissões cruzadas entre 31 casos índice e os seus 177 companheiros de quarto. Enquanto o número parece alto (5/31; 16%), a densidade de incidência de transmissão é baixa (0,9/1000 dias de exposição) se o tempo de exposição for tido em conta. A probabilidade de transmissão nosocomial cruzada é muito debatida na literatura. Foi

confirmada por PFGE que transmissões de E-ESBL na ICU são raras, especialmente por *E. coli* produtora de ESBL. Por isto, alguns autores especulam que o aumento de *E. coli* produtora de ESBL não está relacionado com a transmissão cruzada, uma vez que a transmissão horizontal de *E. coli* produtora de ESBL é rara fora de uma situação de surto. Contudo, a transmissão paciente-a-paciente foi considerada importante para a aquisição de *K. pneumoniae*. A transmissão de genes de beta-lactamases de espectro alargado por elementos genéticos móveis de resistência pode ocorrer mesmo se os padrões PFGE aparecem policlonais. Deste modo, análises por PFGE podem subestimar a verdadeira taxa de transmissão de ESBL que pode ser muito mais importante para a *E. coli* do que para outras *Enterobacteriaceae*. A densidade de incidência de transmissão cruzada neste estudo foi mais alta na ACF do que na LTCF embora o tempo de exposição seja maior na LTCF. Isto é um tanto inesperado e não é facilmente explicável. Uma possível explicação pode ser a frequente partilha das casas de banho, uma vez que a maioria das casas de banho são partilhadas por muitos pacientes da instituição. Portanto, na ACF há maior risco de transmissão directa paciente-a-paciente do que na LTCF, onde os pacientes estão mais acamados e têm casa de banho privada. Mas os pacientes na ACF estão expostos a mais intervenções, o que exige várias lavagens e desinfecções das mãos dos cuidadores, correndo mais riscos de transmissão das ESBLs. Novos estudos terão de confirmar esta hipótese e o ideal seria incluir amostras ambientais. O controlo nosocomial de E-ESBL é ainda um assunto de debate. Certos autores defendem o rastreio na admissão, o isolamento dos pacientes positivos e a introdução de boa administração de antibióticos. Porém, outros têm levantado preocupações sobre a eficácia dessas medidas à luz de um reservatório de importância comunitária. De momento, não há dados suficientes para justificar o completo abandono das medidas do controlo de infecção no hospital, dado que as E-ESBL podem causar infecções graves e efeitos adversos. Não foi feita a triagem universal das E-ESBL na admissão mas puseram em isolamento todos os casos novos e foi implementado isolamento preventivo entre os pacientes da categoria I. Ao fazê-lo foram estabelecidas precauções de contacto em quase 100% dos casos. Para reduzir a necessidade de precauções de contacto entre pacientes nas LTCFs, podem ser realizadas culturas de vigilância ao longo do tempo. Uma questão em debate é se o rastreio deve ser realizado ou não quando os pacientes estão a ser tratados com antibióticos, uma vez que vários agentes podem seleccionar E-ESBL (penicilinas, cefalosporinas) aumentando assim a sensibilidade da triagem ou ter como resultado falsos negativos (carbapenemos). Além disso, não há evidências de qual é o intervalo de tempo ideal entre os testes de despistagem (Fankhauser *et al.*, 2009).

A melhor estratégia para combater a propagação de ESBL positivos é desconhecida mas o rastreio de pacientes de risco pode ser benéfico. Embora um método ideal de rastreio ainda não tenha sido encontrado, o rastreio tem sido limitado aos organismos produtores de ESBL. Em 2006, o Centro Médico da Universidade de Friburgo enfrentou um aumento dramático no número de pacientes com infecções devidas a *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL. Portanto, introduziu-se o rastreio na admissão em 4 unidades de cuidados intensivos (Intensive Care Units-ICUs) para determinar a prevalência de pacientes com ESBL positivo nestas unidades de alto risco. O Centro Médico da Universidade de Friburgo é um hospital universitário de 1600 camas com todas as especialidades clínicas. Aproximadamente 60.000 pacientes são internados por ano, representando um total de 440.000 pacientes por dia. Acrescentando às precauções “standard”, as precauções de contacto geralmente são recomendadas apenas para pacientes infectados com bactérias ESBL positivo. Estas precauções de contacto incluem a estadia do paciente num quarto individual ou fazendo um coorte com outros pacientes infectados ou colonizados, a utilização de luvas e batas por trabalhadores de saúde e o rastreio rectal de produtores de ESBL nos companheiros de quarto. Durante o período de estudo (Agosto a Dezembro de 2007), as 4 ICUs cirúrgicas (referidas como ICUs A, B, C e D) foram orientadas para rastrear os pacientes portadores de *Enterobacteriaceae* ESBL positiva através de culturas de amostras rectais. Os pacientes que foram submetidos a um transplante de órgão são internados na ICU A, aqueles que se submeteram a cirurgia cardiovascular são admitidos na ICU B, aqueles que tenham sido submetidos a cirurgia ortopédica ou visceral são internados na ICU C e os pacientes traumatizados são admitidos na ICU D. As culturas foram realizadas num meio cromogénico para rastrear *Enterobacteriaceae* ESBL positiva para todas as amostras de z aragatoa r ectal. A s colónias que er am produtoras de E SBL foram confirmadas pelo método de disco que continha cefotaxima, ceftazidima e cefpodoxima com ou sem ácido clavulânico e pela utilização de um teste de sinergismo de duplo disco que continha ceftriaxona e amoxicilina-ácido clavulânico. A s amostras dos vá rios produtos biológicos foram cultivadas e os testes de resistência aos antibióticos foram realizados de acordo com os procedimentos laboratoriais “standard”. De acordo com os critérios do C LSI se foi detectada r eduzida s usceptibilidade às ce falosporinas nas *Enterobacteriaceae* foram pesquisadas as ESBLs nos isolados. O rastreio na admissão foi realizado em 755 (45%) dos 1.674 pacientes recém-admitidos nas 4 ICUs durante o período do estudo. A maioria dos pacientes que não foram rastreados esperava-se que permanecessem na ICU por poucas horas. A taxa de de portadores de ESBL detectada

na admissão foi entre 3,0% a 9,0% dos pacientes por ICU. Globalmente, 35 (5%) dos 755 pacientes examinados apresentaram colonização intestinal, mas apenas 6 (17%) dos 35 pacientes já eram conhecidos como portadores de organismos de ESBL positivos. Cinquenta e dois (7%) dos 755 pacientes rastreados estavam infectados ou colonizados com patógenos produtores de ESBL e 9 (25,7%) de 35 pacientes com colonização rectal desenvolveram uma infecção (5 infecção urinária, 2 infecção de ferida cirúrgica, 1 pneumonia e 1 empiema pleural). As directrizes para o tratamento de doentes infectados com bactérias produtoras de ESBL variam e não incluem necessariamente o rastreio para organismos produtores de ESBL. Analisaram a situação em 4 ICU num hospital terciário Alemão e encontraram uma taxa média de 5% de portadores de ESBL durante o rastreio de admissão, que é uma taxa semelhante à relatada recentemente nos Estados Unidos. Nesse estudo, o segundo maior dos Estados Unidos por Reddy *et al.*, 2007, envolvendo cerca de 17.000 pacientes de 4 ICUs, um aumento progressivo na incidência da colonização por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL foi relatado durante um período de estudo de 6 anos. Dados de Israel e da Arábia Saudita indicam taxas de colonização superiores a 10%, até 26%. A colonização intestinal é um conhecido factor de risco para infecções por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL. Reddy *et al.*, 2007, relataram que 35 (8,5%) dos 413 pacientes colonizados com *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL desenvolveram uma bacteriemia. Devido à alta colonização, o risco de desenvolver uma infecção é considerável e defenderam a introdução do rastreio na admissão de pacientes com doença grave subjacente por exemplo, para pacientes que tiveram graves traumas, que se submeteram a cirurgia de grande porte ou a um transplante e/ou que tenham sido admitidos numa unidade de hematologia, porque são os pacientes que frequentemente desenvolvem infecções nosocomiais e nos quais um tratamento antibiótico empírico é vital (Meyer *et al.*, 2009).

Disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL nas crianças

Um total de 90 amostras alimentares à base de leite (Fórmulas Infantis-IFs) foi obtido de uma cozinha de leites de um hospital universitário, durante um período de 4 meses, em 1999. As condições sanitárias das IFs foram analisadas e foi feita a caracterização fisiológica e os testes de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de bacilos de gram negativo. As contagens de colônias foram consideradas inaceitáveis para a maioria das amostras e as taxas de contaminação foram relacionadas com o manuseamento inadequado das IFs. Foram detectados coliformes (crescimento a 35°C e 45°C) na maioria das IFs testadas. *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Cedacea davisae*, *Klebsiella planticola* e *Enterobacter cloacae* foram os isolados mais frequentes. Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos demonstraram taxas de resistência significativa, particularmente à amoxicilina/ácido clavulânico, à cefoxitina, à cefalotina ou à ampicilina. Também foi isolada uma estirpe de *K. pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro alargado (Carneiro *et al.*, 2003).

Em duas cidades distantes do Brasil, entre 2003 e 2004, em dez isolados de amostras clínicas e de aves domésticas foram identificadas *Salmonella* entérica serovar Typhimurium produtora de ESBLs CTX-M-2. Dois isolados são de pacientes pediátricos e oito de aves domésticas ou do seu ambiente. Todos os isolados eram resistentes a antibióticos não beta-lactâmicos incluindo a tetraciclina e o trimetoprim-sulfametoxazol. O gene CTX-M-2 está localizado num plasmídeo transferível que também transporta outros determinantes de resistência em alguns isolados. Por PFGE, a semelhança genética dos isolados das amostras clínicas e as das aves de ca poeira variou de 89% a 100% (Fernandes *et al.*, 2009_b).

Foi investigada a taxa de resistência *in vitro* para vários antibióticos em 179 isolados de *Salmonella spp* dos serogrupos D (109), B (52), C1 (10) e C2 (8) isoladas em crianças. A produção de ESBLs foi estudada em isolados resistentes à ampicilina. As taxas de resistência para a ampicilina e a amoxicilina/ácido clavulânico foram de 26,3% e 10,6% respectivamente. A resistência para a ceftriaxona e a ceftazidima foi 3,3%. As taxas de resistência para o cloranfenicol, o trimetoprim-sulfametoxazol e a ciprofloxacina foram 40,7%, 31,3%, e 2,2%, respectivamente. A produção de beta-lactamases foi detectada em 42 isolados e 2 isolados de *S. paratyphi B* produziam ESBLs. Um isolado com ESBLs SHV-2 e TEM-1 e o outro com ESBLs SHV-2a, SHV-5a (SHV-9) e TEM-1.

Este é o primeiro relatório de SHV-2a e SHV-5a (SHV-9) em *S. paratyphi* B na Turquia (Budak *et al.*, 2009).

Um inquérito realizado em 2005 a crianças saudáveis na Bolívia e Peru revelou um aumento significativo das portadoras fecais de estirpes de *Escherichia coli* resistentes a cefalosporinas de espectro alargado comparado com um estudo de 2002 (1,7% em 2005 e 0,1% em 2002). Este trabalho demonstra que este aumento está relacionado, principalmente, com a disseminação de determinantes de ESBL do tipo CTX-M entre as estirpes comensais de *E. coli*. Dos 50 isolados produtores de ESBL em 2005, 44 têm CTX-M e 6 têm SHV (SHV-2 ou SHV-12). Foi detectada uma nova variante de CTX-M-2 denominada CTX-M-56. A caracterização molecular dos isolados produtores de CTX-M e experiências de genes transferidos sugeriram que diferentes mecanismos podem estar envolvidos na disseminação de diferentes determinantes do grupo CTX-M e revelaram que determinantes adicionais de resistência para antibióticos não beta-lactâmicos foram preferencialmente transportados por plasmídeos codificadores de certas variantes CTX-M (CTX-M-15 e variantes do grupo CTX-M-2). Três isolados peruanos com plasmídeos codificadores conjugativos de CTX-M-15 eram portadores de novos genes de resistência às fluoroquinolonas. Os resultados deste estudo mostraram que os determinantes de ESBL em geral e em particular os CTX-M se disseminaram rapidamente entre estirpes de *E. coli* comensais em pessoas saudáveis em ambientes de poucos recursos. Na área do estudo, incluindo ambientes urbanos na Bolívia e Peru, a prevalência de crianças saudáveis portadoras de estirpes de *E. coli* ESBL-positiva na sua microbiota comensal sofreu um aumento dramático (17 vezes) ao longo de um período de 3 anos e os que mais contribuíram foram determinantes do tipo CTX-M. Este fenómeno é um assunto de preocupação, uma vez que os comensais podem ser um reservatório de genes de resistência, enquanto a colonização intestinal por isolados produtores de ESBL pode ser uma fonte de entrada de determinantes de ESBL em ambiente hospitalar e representa um factor de risco para a instalação de infecções causadas por estirpes produtoras de ESBL em pacientes hospitalizados. Embora os dados de consumo de antibióticos não estejam disponíveis, é natural assumir que os portadores de ESBL comensais, crianças saudáveis de idade pré-escolar, reflectem na maioria dos casos a exposição à contaminação no ambiente familiar em vez de um aumento da exposição directa às cefalosporinas de espectro alargado ou outros agentes conhecidos como seleccionadores de produtores de ESBL. Para esclarecer melhor este assunto era interessante avaliar a população adulta nestas mesmas áreas geográficas. O aumento da

prevalência de isolados produtores de ESBL foi também associado a um aumento da diversidade de determinantes circulantes de ESBL, embora o uso de ceftriaxona como o único agente de rastreio de ESBL é limitado para a detecção de ESBLs com actividade específica de ceftazidimase. Em comparação com o levantamento inicial realizado em 2002, membros do grupo CTX-M-1 (CTX-M-15) também apareceram na Bolívia, enquanto membros do grupo de CTX-M-9 (CTX-M-14 e CTX-M-24) apareceram no Peru. Além do mais as ESBLs produtoras do tipo SHV apareceram nos 2 países. É a primeira detecção de um gene em 3 isolados peruanos com CTX-M-15 resistentes às fluoroquinolonas em bactérias comensais de humanos saudáveis e também o primeiro relatório da presença deste determinante de resistência na América Latina (Pallecchi *et al.*, 2007).

A ocorrência e a diversidade de enzimas ESBLs foram investigadas em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos antibióticos em fezes humanas. Todos os isolados ESBL positivos foram caracterizados a nível molecular por PCR, sequenciação e PFGE. Oito isolados de 46 de *E. coli* resistentes aos antibióticos (6 de crianças e 2 de adultos) e 4 isolados de 8 *K. pneumoniae* (todos de adultos) tinham ESBL positiva pelo teste de sinergismo de duplo disco. Dos 7 isolados que tinham CTX-M-14, 2 tinham CTX-M-24 e CTX-M-28, e 1 tinha CTX-M-9. Adicionalmente, 8 isolados eram portadores de TEM-1b ou TEM-1c. Nenhuma enzima do tipo SHV foi encontrada entre estirpes de *E. coli*. Em 9 estirpes, os determinantes do plasmídeo *bla*_(CTX-M) eram transferíveis para a *E. coli*, por conjugação. Análises por PFGE demonstraram evidente disseminação clonal e não clonal. O estudo mostra a existência de portadores fecais de organismos produtores de determinantes de *bla*_(CTX-M) e evidencia o papel dos comensais como um reservatório para a sua disseminação. Também documenta a ocorrência de determinantes de CTX-M entre comensais resistentes aos antibióticos transportados por crianças e adultos não hospitalizados. Relativamente às crianças jovens, as análises das amostras de fezes mostraram ser portadoras de *E. coli* resistentes às fluoroquinolonas (44/189, 23,3%) e uma proporção significativa destes isolados (6/44, 13,6%) eram produtores de ESBL. Este último valor está de acordo com os dados de resistência entre os isolados clínicos. Em Hong Kong, os dados do laboratório do hospital mostram que 10-20% dos isolados de *E. coli* resistentes às fluoroquinolonas eram ESBL positivas. Entre os isolados de *E. coli* produtores de ESBL nas amostras clínicas, aproximadamente 2/3 foram resistentes às fluoroquinolonas. Uma vez que as fluoroquinolonas não são usadas em crianças jovens a fonte de resistência às fluoroquinolonas e isolados positivos de

CTX-M não é clara. A aquisição pela cadeia alimentar e os portadores adultos são alguns meios possíveis de transmissão. Os resultados realçam a endemicidade dos alelos do grupo CTX-M-9 nesta região. Em estudos anteriores, alelos do mesmo grupo foram predominantes entre isolados de portadores nas amostras clínicas e em animais de produção alimentar. Este estudo demonstrou que a maioria dos determinantes de CTX-M estavam localizados em plasmídeos transferíveis e algumas estirpes eram também portadoras de outros elementos móveis de resistência, incluindo a sequência de inserção, a transposase e o integrão. Como sugerido previamente, estes elementos tiveram um papel importante na translocação e disseminação das CTX-M. Apesar do número limitado de isolados comensais testados, é interessante que o alelo mais frequente foi o CTX-M-14, o qual foi semelhante à situação dos isolados clínicos com ESBL positivo. Uma vez que os voluntários adultos eram amigos e conhecidos, a possibilidade de transmissão pessoa-a-pessoa de bactérias comensais ou de determinantes de resistência não deve ser excluída. São necessários estudos epidemiológicos detalhados para abordar a transmissão de CTX-M em diferentes ambientes escolares e sociais (Ho *et al.*, 2008).

Em dois hospitais de Taipé reviram dados retrospectivamente dum período de 5 anos de crianças com refluxo vesicoureteral. O objectivo do estudo de Cheng e colaboradores foi analisar a resistência antimicrobiana das infecções do tracto urinário nas crianças a receber profilaxia antibiótica por causa de refluxo vesicoureteral primário. Os pacientes receberam tratamento profilático com o cotrimoxazol, a cefalexina, o cefaclor ou uma profilaxia com uma sequência de diferentes antibióticos (monoterapia alternativa). Foram registados os dados demográficos, o grau do refluxo vesicoureteral, a antibioterapia profilática, os resultados da sensibilidade aos antibióticos da primeira infecção urinária e o aparecimento das UTIs seguintes. Trezentos e vinte e quatro pacientes foram submetidos a profilaxia antibiótica (109 com cotrimoxazol, 100 com cefalexina, 44 com cefaclor e 71 com monoterapia alternativa) num hospital e 96 crianças foram submetidas à profilaxia com cotrimoxazol noutra hospital. A infecção por *Escherichia coli* foi muito menos frequente nas crianças que fizeram antibiótico profilático, comparado com os seus episódios iniciais de infecção do tracto urinário, nos dois hospitais. A susceptibilidade antimicrobiana para a maioria dos antibióticos diminuiu com a profilaxia com cefalosporinas em infecções urinárias recorrentes. A diminuição da susceptibilidade também foi grande para a profilaxia com uma sequência de diferentes antibióticos. Contudo, a susceptibilidade antimicrobiana diminuiu muito pouco nos grupos que fizeram profilaxia com cotrimoxazol. Este estudo põe em evidência que o

cotrimoxazol é a apropriado para a profilaxia enquanto as cefalosporinas não o são. As crianças que receberam cefalosporinas de 1ª ou 2ª geração como antibioterapia profilática têm uma maior tendência para ficarem infectadas com organismos produtores de ESBL ou com um uropatógeno resistente, que não a *E. coli*. Embora a prevalência da resistência endêmica esteja aumentada entre a flora de gram negativo, o cotrimoxazol é ainda o agente preferido para a profilaxia para refluxos vesicoureterais (Cheng *et al.*, 2008).

As infecções pediátricas com bactérias produtoras de ESBLs têm sido pouco descritas. Procurou-se determinar a proporção de isolados produtores de ESBLs e a incidência de infecção ou colonização com estes organismos no hospital pediátrico terciário, em Salt Lake City, durante 5 anos e adicionalmente avaliou-se as características das crianças infectadas. Identificaram-se todas as *Escherichia coli* ou *Klebsiella spp* de crianças mais novas do que 18 anos entre Janeiro de 2003 e Dezembro de 2007. Foram revistos os relatórios médicos das crianças infectadas; das culturas de 2967 *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, 26 isolados produtores de ESBLs eram de 16 crianças. As taxas de produção de ESBL entre os isolados aumentaram significativamente de 0,53% na primeira metade para 1,4% na segunda metade do estudo. A incidência de uma infecção primária com ESBL também aumentou significativamente de 0,14/10000 pacientes para 0,31/10000. A maioria das crianças infectadas ou colonizadas por organismos produtores de ESBL eram doentes crónicos, frequentemente hospitalizados, ou com uma história de infecção recorrente. Contudo, 4 crianças infectadas tinham menos de 5 meses de idade e foram avaliadas num ambiente de ambulatório. Enquanto a maioria dos pacientes pertenciam a grupos de risco para infecções resistentes aos antibióticos, também foram afectados lactentes em ambiente de ambulatório. Os lactentes não tinham sido considerados, anteriormente, como uma população de risco (Blaschke *et al.*, 2009).

Nas enfermarias pediátricas num hospital em Istambul foi detectada uma alta taxa (48,6%) de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBLs (ESBL-KP) dos isolados clínicos. Implementaram medidas reforçadas do controlo de infecção e instituíram um programa prospectivo de vigilância com um estudo de caso-controlo para determinar os factores de risco de colonização intestinal por ESBL-KP. Fizeram culturas durante um período de 1 ano de zangatoas rectais dos pacientes, de amostras do ambiente e das mãos dos trabalhadores de saúde. Os isolados de ESBL-KP foram tipados por PFGE. As características clínicas dos pacientes que foram colonizados com ESBL-KP durante a

permanência no hospital foram comparadas com as dos pacientes que não tinham ESBL-KP. Quarenta (18,5%) de 216 pacientes ficaram colonizados com ESBL-KP. Os factores de risco mais frequentes para a colonização foram a ventilação mecânica e uma hospitalização superior a 14 dias. A genotipagem dos isolados indicava provavelmente transmissão paciente-a-paciente; contudo, não se pôde determinar a rota desta propagação. Durante o período do estudo, a taxa de 1,6% de infecções clínicas por ESBL-KP por 500 pacientes admitidos teve uma diminuição em comparação com a taxa de 7% do ano anterior. As medidas reforçadas do controlo de infecção, a administração antimicrobiana e o rastreamento de portadores rectais foram associados com a diminuição substancial de colonização por ESBL-KP nas unidades pediátricas (Demir *et al.*, 2008).

Na África Ocidental investigaram a disseminação de produtores de ESBLs nos indivíduos que vivem em locais remotos que, até agora, parecem ter sido poupados. No Senegal, procurou-se a aldeia mais remota e isolada para avaliar os portadores fecais de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs, nas crianças em que a probabilidade de terem tomado antibióticos fosse nula. Kagnoube, uma aldeia no Senegal Oriental, foi o local escolhido pelos investigadores porque era a mais inacessível durante as chuvas. Tinha 60 habitantes vivendo nas suas cabanas tradicionais e partilhando a água do poço por não haver nenhum rio perto. O centro de saúde mais próximo estava a 100 km de distância. Os habitantes tomavam, ocasionalmente, apenas drogas alopáticas. Neste estudo incluíram-se 20 crianças saudáveis, 11 raparigas e 9 rapazes com idades de 1 a 11 anos. Foram obtidas amostras de fezes que foram imediatamente inoculadas em meios de conservação e enviadas para França. Duas das 20 crianças eram portadoras fecais de um clone de *E. coli* multirresistente produtora de CTX-M-15, demonstrando a disseminação de beta-lactamases de espectro alargado, mesmo nas comunidades isoladas (Ruppé *et al.*, 2009).

Num hospital do Egipto onde a *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL era uma importante causa de infecções nosocomiais na unidade de cuidados intensivos neonatais (NICU), efectuaram um estudo com o objectivo de determinar a incidência da *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL na NICU. A frequência da aquisição de genes SHV-1 e SHV-2 nos isolados, os factores de risco associados e os resultados clínicos dos bebés infectados, foi realizado por um estudo prospectivo de vigilância durante o período de um ano. Em todos os recém-nascidos admitidos na NICU obtiveram-se amostras de sangue, de urina, de líquido cefalorraquidiano, de zaragatoas de feridas e da garganta e amostras de aspirados de tubos endotraqueais de recém-nascidos em que nunca houve suspeita de

sepsis. Os isolados bacterianos foram identificados morfológicamente, por coloração de Gram e testes bioquímicos “standard”. A susceptibilidade antimicrobiana foi determinada por métodos de difusão em agar com disco e a confirmação fenotípica de produção de ESBL foi feita por teste de sinergismo de duplo disco e E-test. A detecção genética dos genes SHV-1 e SHV-2 nos isolados de *Klebsiella pneumoniae* foi feita por PCR e sequenciação. Um total de 980 culturas foi obtido de 380 recém-nascidos e 372 amostras colhidas do ambiente. Em vinte e sete culturas (7%) isolaram-se *Klebsiella pneumoniae*, sendo 18 (67%) produtoras de ESBL. Os 18 isolados (100%) tinham SHV-2 e apenas 8 isolados (44%) tinham o gene SHV-1. Os factores de risco para a *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL foram a ventilação mecânica, o peso inferior a 1500g, a hospitalização superior a 15 dias, a nutrição parenteral total e o uso prévio de oximiino-beta-lactâmicos. As culturas ambientais (n=372) tinham *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL em 9 isolados: 4 de tubos de sucção, 2 de incubadoras e 3 das mãos dos prestadores de cuidados de saúde. A *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL estava associada ao aumento da mortalidade e à hospitalização prolongada nos recém-nascidos que sobreviveram (Abdel-Hady *et al.*, 2008).

Foi realizado um estudo para determinar a prevalência de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL nos cuidados intensivos neonatais (NICU) na Índia e para identificar os factores de risco associados com aquisição destes organismos. Foi avaliado o estado dos 253 recém-nascidos admitidos, tendo 238 ficado num sistema de vigilância activa. A *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL foi responsável por 7 infecções e 51 colonizações, e quanto a *Escherichia coli* produtora de ESBL foi responsável por 9 infecções e 88 colonizações. Os isolamentos dos dois organismos verificaram-se em trinta recém-nascidos. O prolongamento da estadia na NICU foi um factor de risco importante. O imipenemo e a ampicacina podem ser sugeridos como os fármacos de escolha para o tratamento (Shakil *et al.*, 2009).

Tratamento

As taxas de resistência estão a aumentar entre os vários patogéneos de gram negativo problemáticos que frequentemente são responsáveis por graves infecções nosocomiais, incluindo *Acinetobacter spp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL. A presença de estirpes multirresistentes destes organismos tem sido associada com o internamento hospitalar prolongado, o aumento de custos dos cuidados de saúde e o aumento da mortalidade especialmente quando a terapia antimicrobiana inicial não o actuou sobre o patogéneo causador da infecção. Inversamente, com altas taxas de terapias antimicrobianas iniciais apropriadas, as infecções causadas por patogéneos de gram negativo multirresistentes não influenciam negativamente os resultados dos tratamentos dos pacientes ou os custos. Estas observações, demonstram a importância de uma rápida e eficaz abordagem para tratar as infecções graves nosocomiais, particularmente quando se suspeita de patogéneos multirresistentes. Elas também apontam para a necessidade de um esforço multidisciplinar para combater a resistência, que deve incluir o melhoramento da administração antimicrobiana, o aumento dos recursos para o controlo de infecção e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos com actividade contra os patogéneos de gram negativo multirresistentes. Os estudos clínicos põem em evidência que os pacientes infectados por estirpes resistentes de patogéneos de gram negativo têm aumentado a mortalidade, o tempo de internamento hospitalar e os custos hospitalares. Esta evidência ressalta a necessidade para que os hospitais comecem a reagir de forma pró-activa para combater as crescentes taxas de resistência. Embora a resistência seja um factor importante, é necessário reconhecer que outros problemas também contribuem para resultados ineficazes e custos altos. Primeiro e mais importante, é a selecção da terapia antimicrobiana inicial antes dos resultados dos testes de susceptibilidade. Os pacientes que não recebem terapia inicial adequada têm piores resultados clínicos, os internamentos são mais prolongados e os custos são mais elevados. Em segundo lugar, os laboratórios clínicos esforçam-se para dar os testes de sensibilidade o mais rapidamente possível. Finalmente, os esforços dos administradores hospitalares para diminuir os custos podem levar à dispensa de pessoal chave envolvido na supervisão do controlo de infecção diário. É necessária a cooperação entre os médicos, os administradores hospitalares, os patrocinadores, os legisladores e as empresas farmacêuticas para encontrar formas de evitar novos aumentos de resistência aos antibióticos e limitar os custos associados (Slama, 2008).

Os organismos produtores de ESBL têm fascinado os cientistas e frustrado os médicos e os microbiologistas há mais de 20 anos. Em muitos casos de ESBLs, a sua estrutura tem sido deduzida e foi adquirido um grande conhecimento na relação entre a estrutura e a função destas enzimas. No entanto, do ponto de vista clínico ainda se pode ver surtos de infecção nos hospitais ou noutras unidades de cuidados de saúde. É amplamente relatado, que também há importantes problemas em relação aos organismos produtores de ESBL na comunidade. Este é um problema extremamente importante a partir de uma perspectiva global que ameaça o uso de muitos antibióticos pelos pacientes da comunidade. Diestra *et al.*, 2008, foram reconhecidos pela sua avaliação da epidemiologia molecular da *Klebsiella pneumoniae* e da *Escherichia coli* produtoras de ESBL em onze hospitais e panfóis. Apesar de não dar um quadro completo, a perspectiva é suficientemente ampla para fornecer algumas informações interessantes. As infecções por *K. pneumoniae* que estão normalmente limitadas a uma única instituição mas que, dados relatados previamente, sugerem que pode ocorrer a disseminação de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL a nível inter-hospitalar, inter-regional e até mesmo inter-continental. Num estudo numa única instituição, Harris *et al.*, 2007, tentaram quantificar a importância da transmissão de paciente-a-paciente na aquisição de *K. pneumoniae* produtora de ESBL. Nas unidades de cuidados intensivos, dos pacientes que ficaram colonizados com *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, 52% foi por transmissão paciente-a-paciente comprovado por se melhantes PFGE e internamento simultâneo hospitalar. Este estudo utilizou culturas perianais e os resultados demonstraram a necessidade de mais estudos para avaliar a utilidade e a relação custo-eficácia da vigilância activa para a *K. pneumoniae* produtora de ESBL e a prevenção de contaminação por contacto. Pelo contrário, Diestra *et al.*, 2008, encontraram maior diversidade clonal de *E. coli*. Este resultado não é inesperado, porque existem estudos pontuais que demonstraram que podem ocorrer surtos hospitalares por *E. coli* produtoras de ESBL. A razão pela qual a *K. pneumoniae* produtora de ESBL origina mais surtos de infecções do que a *E. coli* não foi totalmente explorada. Enquanto dezenas de estudos de cientistas se debruçam sobre a patogénese bacteriana, a atenção da comunidade científica deve ser orientada para as razões pelas quais algumas estirpes são mais “adaptadas” ao hospital do que outras. A capacidade de diminuir a colonização bacteriana das mãos, das superfícies inanimadas dentro do ambiente hospitalar e dos utensílios médicos será um importante passo na redução de infecções hospitalares adquiridas. A última informação interessante adquirida deste estudo foi o tipo de espectro de ESBL. Como já foi observado em todo o mundo, o tipo CTX-M de ESBLs é claramente predominante. Isto parece ser verdade dentro dos

hospitais e na comunidade. Alguns tipos de SHV dominantes continuarão a ser importantes como a SHV-12 enquanto as ESBLs do tipo TEM são quase inexistentes nos hospitais espanhóis. Um dos impactos dos organismos produtores de ESBL é o seu efeito no uso de antibioterapia em pírca. Normalmente, uma resposta individual e institucional aos produtores de ESBL leva ao aumento do uso de carbapenemos ou das combinações de beta-lactâmicos/inibidor de beta-lactamase. Futuramente, seria aconselhável complementar a vigilância da epidemiologia molecular de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL com a vigilância das *K. pneumoniae* e das *E. coli* resistentes aos carbapenemos e aos inibidores de beta-lactamase (Paterson, 2008).

Este estudo de Chazan e colaboradores avaliou 1546 episódios de bacteremias durante dois períodos, de 2001 a 2002 e de 2005 a 2006, num hospital comunitário em Israel. Foram avaliadas três situações e comparadas para cada período: bacteremia da comunidade (CB), bacteremia hospitalar (HB) e bacteremia de instituições prestadoras de cuidados de saúde por tempo prolongado (LTCF-B). Como era de esperar, os isolados das CB foram, em geral, mais susceptíveis aos antimicrobianos do que os das HB. Foi observado um ligeiro aumento na taxa de mortalidade nas HB provavelmente relacionadas a comorbilidades e a doenças graves de base. O tracto urinário continuou a ser a principal causa de bacteremia e a *E. coli* o principal agente patogénico isolado durante o estudo, excepto para as HB no primeiro período em que houve um ligeiro predomínio de *Staphylococcus aureus* (surto esporádico). Não foi surpresa que as bacteremias primárias e as relacionadas com catéteres foram as fontes de maior importância nas HB. Os bacilos de gram negativo ($\pm 60\%$) foram uma causa mais frequente de bacteremia do que os cocos de gram positivo ($\pm 29\%$), ao contrário do constante aumento de cocos de gram positivo nos isolados de bacteremias a nível mundial. Estas diferenças devem-se provavelmente às características do hospital: ser periférico, estar orientado para a comunidade e a falta da complexidade terciária que normalmente são a causa do aumento de organismos de gram positivo. Outra descoberta interessante foi o aumento da susceptibilidade para o trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SXZ) observado entre os isolados de *Klebsiella spp* (HB); no entanto, devido à susceptibilidade ao TMP-SXZ da *E. coli* permanecer em $\pm 75\%$ (nas três situações estudadas) permitiu o seu uso no tratamento empírico na suspeita de infecção por microrganismo de gram negativo. Entre as *E. coli* não produtoras de ESBLs foi observada uma diminuição significativa nas taxas de susceptibilidade à cefalotina (LTCF-B), à amoxicilina/ácido clavulânico, à piperacilina (CB e HB) e à piperacilina/tazobactamo (HB).

O último resultado é preocupante e esperado porque levanta dúvidas acerca da eficácia da piperacilina/tazobactamo no tratamento empírico das bacteremias nosocomiais por gram negativos, mesmo nos pacientes sem factores de risco para estirpes produtoras de ESBLs. Pelo contrário, um resultado positivo foi a diminuição nas taxas de resistência de *Klebsiella spp* não produtoras de ESBLs para as cefalosporinas de segunda e de terceira geração e ao aztreonam nas CB e HB no segundo período do estudo. As *E. coli* e as *Klebsiella spp* produtoras de ESBLs são agora relativamente frequentes em locais de prestação de cuidados de saúde bem como na comunidade. Houve uma redução na prevalência de *E. coli* e de *Klebsiella spp* produtoras de ESBLs, relativamente às encontradas anteriormente. Está sob grande supervisão no hospital o uso de antimicrobianos em geral e em particular os agentes de largo espectro. Um formulário detalhado de antibióticos de acordo com os protocolos locais faz parte da política de controlo de infecção e foi aplicada em várias situações durante o período do estudo. Adicionalmente, o uso da ceftazidima é muito limitado; este facto pode ser uma das razões para a baixa observada na taxa de ESBLs. Este estudo forneceu uma descrição completa e detalhada de todos os episódios de bacteremia que ocorreram na instituição. Os resultados, contudo, devem ser interpretados no contexto das diversas limitações. Primeiro, não foram avaliadas as comorbilidades nem a severidade da doença na admissão. Assim, não podemos explicar o aumento da mortalidade nas HB de 2005 a 2006. A segunda limitação foi a falta de dados dos pacientes LTCF-B como um grupo separado quando hospitalizados e a heterogeneidade dessas instituições em termos de número de camas, tipo de pacientes e políticas de tratamento. Terceiro, o hospital está localizado na periferia de Israel e a falta de enfermarias de alta complexidade torna os resultados não representativos da situação do país. De acordo com os dados, concluiu-se que nesta região as bactérias de gram negativo são as mais isoladas nas hemoculturas. É preocupante o aumento da resistência às quinolonas, mesmo se no momento não tem significado estatístico. Se a prevalência de organismos resistentes continua a aumentar como o previsto, o tratamento empírico com antibióticos, a falha terapêutica e a mortalidade aumentam, mesmo nos pacientes admitidos da comunidade. A vigilância contínua da epidemiologia local e da resistência antimicrobiana é indispensável para infecções tratadas empiricamente bem como a implementação de medidas de controlo da resistência (Chazan *et al.*, 2009).

Num hospital pediátrico na Coreia do Sul com uma alta prevalência de produção de ESBL entre *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foi realizado um estudo para

examinar o impacto da mudança da política de antibióticos na prevalência das ESBLs. O uso de cefalosporinas de espectro alargado foi restringido e o uso de combinações beta-lactâmicos/inibidor de beta-lactamase foi encorajado a partir de 2002. Todas as estirpes de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de líquidos biológicos estéreis de 1999 a 2005 foram analisadas para a detecção de beta-lactamase e a prevalência de produção de ESBL. Foram comparadas em 3 períodos: pré-intervenção (1999-2001), período transitório (2002-2003) e pós-intervenção (2004-2005). Num total de 252 estirpes de *Escherichia coli* (n=128) e de *Klebsiella pneumoniae* (n=124), a prevalência de produtoras de ESBL diminuiu de 39,8% (41/103) para 22,8% (18/79). Esta diminuição da produção de ESBL foi mais evidente para a *Klebsiella pneumoniae* (64,1% para 25,6%) do que para a *Escherichia coli* (25% para 19,4%). As taxas de mortalidade de doenças invasivas causadas por *Escherichia coli* ou por *Klebsiella pneumoniae* mantiveram-se inalteradas. A substituição das cefalosporinas de espectro alargado por a piperacilina/tazobactamo diminuiu grandemente a prevalência da produção de ESBLs das *Escherichia coli* e das *Klebsiella pneumoniae* neste hospital de crianças onde as ESBLs eram endémicas. O impacto da mudança da política de antibióticos foi mais evidente na *Klebsiella pneumoniae* do que na *Escherichia coli* (Lee *et al.*, 2007).

Nos isolados clínicos de bactérias de gram negativo resistentes às cefalosporinas obtidos de pacientes de Queen Sirikit National Institute of Child Health (QSNICH), Bangucoque, Tailândia, de 2006 a 2007, foram avaliados os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos para determinar *in vitro* a actividade de vários agentes incluindo o ertapenemo, o imipenemo, o meropenemo, a fosfomicina, a netilmicina, a colistina e a piperacilina/tazobactamo. Aqueles que eram resistentes a todas as cefalosporinas foram avaliados por testes de susceptibilidade em disco e por E-test. Foram testadas as 55 estirpes de *E. coli* e de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL. Os resultados mostraram uma excelente actividade *in vitro* dos fármacos estudados contra *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL com uma percentagem de susceptibilidade de 100 para o ertapenemo, de 100 para o imipenemo, de 100 para o meropenemo, de 89,8 para a fosfomicina e de 92,7 para a colistina. A piperacilina/tazobactamo inibiu 68,2% de isolados de *K. pneumoniae*. Todos os fármacos, excepto a netilmicina, tiveram uma boa actividade contra *E. coli* produtoras de ESBL com 100% de susceptibilidade para os carbapenemos, a fosfomicina, a colistina e 95,8% para a piperacilina/tazobactamo. Os carbapenemos, a fosfomicina e a colistina exibiram uma excelente actividade *in vitro* contra as *E. coli* e as *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL. A

piperacilina/tazobactamo exibiu uma boa actividade *in vitro* contra as *E. coli* produtoras de ESBL, mas não para as *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL (Punpanich *et al.*, 2008).

As estirpes de bacilos de gram negativo produtoras de ESBLs são, frequentemente, a principal causa de septicemia com evolução clínica e terapêutica complicadas. Este estudo foi realizado na Índia para investigar a prevalência das ESBLs nas bactérias isoladas de septicemias neonatais e o padrão de sensibilidade aos antimicrobianos. Foram colhidas 243 amostras de sangue de pacientes que se suspeitava terem septicemia. Além dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos todos os isolados de gram negativo foram submetidos a testes fenotípicos de produção de ESBLs e entre 115 amostras positivas, 84 eram de bacilos de gram negativo e foram detectadas ESBLs em 26 (32%). Dos isolados de gram negativo nenhum era resistente ao imipenemo ou à piperacilina/tazobactamo, e mais de 80% eram susceptíveis à cefoperazona/sulbactamo e à netilmicina independentemente da presença de ESBLs ser positiva ou negativa. Foi observado anteriormente que a taxa de prevalência das ESBLs varia com a localização geográfica dentro do mesmo país. A produção de ESBL nos casos de septicemia neste hospital (hospital de referência terciário) foi mais alta do que num estudo feito no sul da Índia (13,5%) mas foi muito mais baixo do que um estudo feito em Lucknow, no centro da Índia (86,6%). Como menos de 39% dos isolados produtores de ESBLs foram susceptíveis à gentamicina, o uso empírico de amicacina nestes casos é preferível. Também foi observado que um número considerável de produtores de ESBL era “sensível” a uma ou mais cefalosporinas quando testadas *in vitro*. Este estudo demonstra que a detecção de ESBLs deve ser feita por rotina e que o uso de cefalosporinas de terceira geração deve ser desencorajado (Bhattacharjee *et al.*, 2008).

Os relatórios médicos de recém-nascidos admitidos de Janeiro de 2002 a Dezembro de 2003 no hospital Chris Hani Baragwanath na África do Sul que tiveram culturas positivas de sangue e/ou líquido cefalorraquidiano (CSF), por *Klebsiella spp* produtora de ESBL (Klebs-ESBL), foram revistos por causa da clínica, da gestão e da informação sobre o êxito do tratamento, para determinar os factores associados com a mortalidade e avaliar se o uso empírico selectivo do meropenemo está associado com a alta mortalidade. Cerca de uma centena de pacientes teve hemocultura positiva (n=97) e/ou CSF positiva (n=9) por Klebs-ESBL. A taxa de mortalidade foi de 30% e entre aqueles que começaram empiricamente com a piperacilina/tazobactamo e a amicacina (n=48), com o meropenemo (n=40) e aqueles que não começaram com o meropenemo

ou com a piperacilina/tazobactamo e a amicacina foi de 25%, 32% e 42% respectivamente. Os não sobreviventes eram os mais jovens e tinham problemas cardio-respiratórios ou necessitaram de ventilação inicial assistida, e não lhes administraram os antibióticos como o meropenem ou a piperacilina/tazobactamo e a amicacina. Enquanto o uso empírico dos carbapenemos nas sepsis nosocomiais pode ser apropriado nas áreas onde as Klebs-ESBL são prevalentes, a sua utilização pode ser restrita a pacientes com compromisso cardio-respiratório ou sepsis severa sem um aumento da mortalidade (Velaphi *et al.*, 2009).

Um estudo na região norte da costa ocidental portuguesa (Minho) teve como finalidade determinar o perfil molecular e a susceptibilidade aos antimicrobianos de estirpes produtoras de ESBLs. Durante um período de 2 anos, nas bactérias isoladas de pacientes hospitalizados e não hospitalizados foram determinadas as concentrações mínimas inibitórias (MICs) por métodos de microdiluição de acordo com o CLSI. Além disso, a identificação fenotípica das ESBLs foi confirmada por E-test. Foram utilizados vários métodos de identificação molecular dos genes de beta-lactamase (*bla*), envolvendo PCR e estratégias de sequenciação. As estirpes produtoras de ESBLs (n=193) foram isoladas de urina (n=127), de expectoração (n=42), de lavado broncoalveolar (n=14), de sangue (n=7) e de líquido ascítico (n=3). Os isolados produtores de ESBL mais frequentes foram de *E. coli* (67,9%; n=131) seguida por *Klebsiella pneumoniae* (30,6%; n=59) e de 0,5%; n=1 para a *Klebsiella oxytoca*, o *Enterobacter aerogenes* e o *Citrobacter freundii*. As ESBLs detectadas foram do tipo TEM (40,4%), CTX-M (36,8%) e SHV (22,8%). As TEM-52 e TEM-24 foram as mais frequentes (20,2% e 12,9%, respectivamente) mas também foram detectadas as TEM-10 (4,1%) e TEM-116 (2,1%). Dentro da família CTX-M, o grupo CTX-M-9 estava representado pelo CTX-M-9 (13,5%) e CTX-M-14 (8,4%). No grupo CTX-M-1, o tipo CTX-M-15 foi o mais frequente (12,4%), seguido de CTX-M-1 (2,1%), CTX-M-3 (0,5%) e CTX-M-32 (0,5%). Quanto aos tipos CTX-M, parece que a CTX-M-14 está muito difundida no noroeste da Península Ibérica. A *Klebsiella pneumoniae* tem uma enzima CTX-M-15 que foi descrita pela primeira vez em Portugal na área de Lisboa em 2005, mas esta enzima CTX-M-15 também foi recentemente encontrada no norte de Portugal, noutro membro de *Enterobacteriaceae*, isolada de infecções da corrente sanguínea de sete pacientes em dois hospitais diferentes. Esta foi a primeira vez que *C. freundii* foi descrito como produtor de CTX-M-32 em Portugal. Das enzimas SHV a mais frequente foi a SHV-12 (12,4%), seguida por SHV-5 (8,8%) e SHV-2 (2,1%). Alguns isolados produziram mais de um tipo

de ESBL: TEM-52/CTX-M-14 (0,5%); TEM-116/CTX-M-14 (0,5%) e TEM - 116/CTX-M-15 (0,5%). As MICs mostraram que os isolados produtores de ESBLs foram na maioria susceptíveis aos carbapenemos (100%) e à ampicacina (99,5%), pelo contrário, apresentaram taxas baixas de susceptibilidade ao cefepime e às quinolonas. De facto, 98,9% das estirpes produtoras de ESBLs foram resistentes ao cefepime e 85,4% eram resistentes à quinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina). No geral, a alta resistência às quinolonas foi mais evidente nos membros da família CTX-M (98,1%) do que nos tipos TEM ou SHV (80,8% e 72,1%, respectivamente). A literatura recente refere que o inóculo afecta o comportamento do cefepime, no entanto não deve ser apontada como única explicação uma vez que a determinação da MIC é realizada com concentrações de inóculo “standard” de 0,5 de McFarland. Neste estudo, apenas duas *K. pneumoniae* com SHV-2 eram susceptíveis ao cefepime. Isto parece interessante por que um estudo recente mostrou que o cefepime foi administrado com sucesso a três pacientes (dois do sexo feminino e um masculino) com idade entre 47 anos e 87 anos tendo uma estirpe de gram negativo produtora de ESBL. Contudo, outros estudos em todo o mundo descrevem a alta resistência ao cefepime entre os gram negativos produtores de ESBL. O trabalho mostrou uma grande diversidade de enzimas ESBL que ocorrem no norte de Portugal e o tipo mais prevalente ainda é o TEM, mas o CTX-M está em rápido crescimento. O surgimento de produtores de ESBL resistentes ao cefepime em Portugal é um motivo de preocupação. O descontrolado uso de cefalosporinas pode ter um papel importante na aquisição de mecanismos de resistência, particularmente na produção de ESBL. O estabelecimento de políticas para monitorizar a utilização de antimicrobianos nos hospitais e farmácias comunitárias, bem como a implementação de estratégias de defesa da saúde pública e prevenção de resistência aos antimicrobianos parece ser urgente (Fernandes *et al.*, 2009_a).

Durante a última década, bactérias produtoras de ESBL adquiridas na comunidade e em particular a *Escherichia coli* produtora de ESBL do tipo CTX-M disseminaram-se mundialmente. Este organismo é mais frequentemente isolado do tracto urinário mas também tem sido isolado de hemoculturas. Os tratamentos com cefalosporinas e fluoroquinolonas são os maiores factores de risco para o aparecimento de estirpes produtoras de ESBLs. Adicionalmente, a resistência associada a outras classes de agentes antimicrobianos é frequentemente observada nos produtores de CTX-M, limitando as opções terapêuticas. Os carbapenemos devem ser escolhidos para tratar as infecções sistémicas graves causadas por bactérias produtoras de ESBL, mas a

prevenção da disseminação e a adequada gestão destas infecções continua a ser difícil (Zahar *et al.*, 2009).

A disseminação de ESBL nas enterobactérias nosocomiais e adquiridas na comunidade é um grande desafio para os médicos devido ao facto de as opções terapêuticas para estes organismos estarem limitadas. O surgimento de *Escherichia coli* produtora de ESBL na comunidade, associada com a disseminação da ESBL CTX-M, é uma das mais significativas mudanças epidemiológicas nas doenças infecciosas nos últimos anos. A epidemiologia destas infecções é complexa e combina a expansão de elementos genéticos móveis com a disseminação clonal. Uma terapêutica em prática inadequada para infecções severas causadas por estes organismos está associada ao aumento da mortalidade. Os carbapenemos são as drogas escolhidas para infecções graves causadas por organismos produtores de ESBL mas o seu uso em excesso causa preocupação (Rodríguez-Baño and Pascoal, 2008).

Estudos de epidemiologia molecular sugeriram que o súbito aumento mundial de *E. coli* produtoras de CTX-M-15 é principalmente devido a um único clone (ST131) e que viajar para áreas de alto risco, tais como a Índia, pode desempenhar um papel na disseminação deste clone em diferentes continentes. Um tratamento empírico com antibióticos para estes organismos resistentes deve ser considerado para os pacientes com sepsis na comunidade envolvendo o tracto urinário, especialmente se o paciente viajou recentemente para áreas de alto risco. Se esta ameaça de saúde pública for ignorada, é possível que num futuro próximo os médicos sejam forçados a usar na comunidade os carbapenemos como primeira escolha para o tratamento empírico de infecções severas associadas a infecções do tracto urinário originárias da comunidade (Peirano and Pitout, 2010).

Oertapenemo está indicado para o tratamento de infecções complicadas intra-abdominais, da pele e do tracto urinário, bem como da pneumonia adquirida na comunidade, para a qual existem antibióticos mais baratos e de espectro mais estreito. É activo contra bactérias de gram negativo produtoras de ESBL, mas ainda não existem relatórios da sua eficácia clínica. Avaliou-se o uso do mertapenemo em infecções bacterianas durante 13 meses e a taxa de resposta clínica foi de 92%. Assim, o mertapenemo tem um papel no tratamento de primeira linha nestas infecções. O mertapenemo é um carbapenemo com actividade antibacteriana de largo espectro mas não é activo contra *Enterococcus spp*, *Staphylococcus aureus* metacilina resistentes,

Acinetobacter baumannii e *Pseudomonas aeruginosa*. Houve uma excelente eficácia do ertapenemo no tratamento das bacteremias por gram negativo produtores de ESBLs, comparado com o imipenemo ou o meropenemo. Noutro estudo retrospectivo 20% dos pacientes com bacteremia por *K. pneumoniae* não responderam ao imipenemo. No entanto, dada a possibilidade de resistência ao ertapenemo, especialmente na *K. pneumoniae*, a sua actividade *in vitro* deve ser comprovada por testes de laboratório antes do uso clínico. Além disso, como o ertapenemo não é activo contra a *P. aeruginosa*, um patogénico nosocomial virulento, a sua utilização na terapia empírica das infecções hospitalares deve ser desencorajada. Este estudo retrospectivo não conseguiu provar que o ertapenemo predispõe à infecção bacteriana secundária ou colonização porque 11 dos 14 casos foram tratados com antibióticos de espectro mais estreito antes do uso do ertapenemo. Além disso, seis casos recidivaram após o tratamento de infecções urinárias mas havia, além da antibioterapia, outro factor adicional em metade dos casos que era a presença de cateter urinário. A substituição do imipenemo ou meropenemo pelo ertapenemo, sem comprometer o tratamento do paciente em infecções bacterianas comprovadas, é uma vantagem devido à redução de custos, em virtude de o ertapenemo ser muito mais barato. Este estudo retrospectivo não permitiu comparar o ertapenemo com o imipenemo ou meropenemo porque o ertapenemo foi usado para substituir o imipenemo ou meropenemo após o resultado do antibiograma. Além disso, o número de pacientes com bacteriemia por gram negativo produtores de ESBL era pequeno (33%) enquanto 41% tinham UTIs. Um grande estudo envolvendo mais casos de bacteremia e pacientes com doenças de grande severidade vai ajudar a esclarecer a eficácia clínica do ertapenemo. Este é o primeiro relatório sobre a eficácia clínica do ertapenemo por infecções de bactérias de gram negativo produtoras de ESBL. O ertapenemo tem um papel comprovadamente útil no tratamento de primeira linha de infecções por bactérias de gram negativo produtoras de ESBL (Teng *et al.*, 2007).

Foram iniciados estudos retrospectivos de pacientes com bacteriemia por bacilos de gram negativo produtores de ESBLs, tratados com ertapenemo. Quarenta e sete pacientes com bacteriemia por gram negativos resistentes a múltiplas drogas (79% produziram ESBL das quais 53% eram *Klebsiella pneumoniae* e 26% eram *Escherichia coli*) foram tratados com ertapenemo por um período médio de 11 dias em que a idade média dos pacientes era de 70 anos; o choque séptico ocorreu em 19% e a ventilação mecânica foi necessária em 17%. A infecção urinária representou 61% e a hepatobiliar 15%. A resposta clínica favorável ocorreu em 96% e a mortalidade foi de 4%. A terapia

com ertapenemo é promissora na bacteremia por gram negativos produtores de ESBLs e com o uso crescente de carbapenemos no hospital de Singapura, a bacteremia por *E. coli* foi de 22% e por *K. pneumoniae* 12%. O imipenemo e o meropenemo são o tratamento de escolha para bacteriemias por gram negativo produtores de ESBLs. Este estudo põe em evidência que o ertapenemo foi eficaz em 47 episódios de bacteremia por gram negativo resistentes a multidrogas. O ertapenemo foi o único antibiótico eficaz em 38% dos casos e pode ser preferível ao imipenemo ou ao meropenemo por ser mais barato, ter viabilidade no ambulatório em antibioterapia parenteral e o benefício de diminuir a resistência aos carbapenemos do *A. baumannii* e da *P. aeruginosa* (Lye *et al.*, 2008).

A tigeciclina é um antimicrobiano de largo espectro e é a primeira glicilciclina a ser comercializada no Reino Unido. É activa contra algumas bactérias resistentes, incluindo *Staphylococcus aureus* metilicilina resistente (MRSA) e bactérias que produzem ESBLs. A tigeciclina foi licenciada para tratamentos intravenosos nos adultos com infecções do tecido mole e pele e infecções intra-abdominais complicadas, sendo um complemento útil para os agentes antibacterianos disponíveis para tratar tais infecções. A tigeciclina é um derivado da tetraciclina estruturalmente relacionada com a minociclina. O grupo das tetraciclinas, inibe a síntese proteica bacteriana ao nível do ribossoma bacteriano. Em estudos experimentais, em comparação com a minociclina ou a tetraciclina, a tigeciclina ligou-se com maior afinidade às subunidades ribossomais 30S e 70S o que inibiu a síntese proteica mais eficientemente. A tigeciclina é um antibacteriano de largo espectro com actividade bacteriostática contra muitos patogéneos clinicamente relevantes. Este fármaco não é vulnerável a dois mecanismos de resistência que limitam o espectro de actividade das tetraciclinas, ou seja, as proteínas de protecção ribossomais Tet (M) e as bombas de efluxo activas Tet (A) - (E) (bombas que são difundidas em *Enterobacteriaceae*) ou Tet (K) (bombas de efluxo em stafilococos). A tigeciclina é mais activa contra cocos de gram positivo do que contra bacilos de gram negativo. As espécies de gram positivo susceptíveis incluem o *S. aureus*, MRSA, o *S. agalactiae*, o *S. pyogenes*, o *S. pneumoniae* penicilina-resistente e os enterococos vancomicina resistentes. Para as bactérias de gram negativo, a situação é complicada, tanto pela maior variabilidade na susceptibilidade das bactérias, como pelas diferentes concentrações mínimas inibitórias usadas para definir esta susceptibilidade, na Europa e nos EUA. Os organismos susceptíveis incluem a *E. coli*, a *Klebsiella oxytoca* e a *K. pneumoniae* mas agentes patogénicos, tais como o *Proteus spp*, a *Morganella spp* e a *Providencia spp*, são geralmente menos susceptíveis à tigeciclina do que outros membros das

Enterobacteriaceae. A resistência adquirida tem sido detectada em poucos organismos, incluindo a *K. pneumoniae*, o *Enterobacter aerogenes* e o *Enterobacter cloacae*. A tigeciclina também é activa contra os *Bacteroides fragilis* e os organismos de gram negativo produtores de ESBLs. A *Pseudomonas aeruginosa* é inerentemente resistente à tigeciclina. Após a administração intravenosa, a tigeciclina liga-se às proteínas (71-89%) e é bem distribuída na maioria dos tecidos; fica concentrada na bÍlis, na vesÍcula biliar, no cÓlon e nos pulmões. A título de comparação, as concentrações séricas são baixas (cerca de 0,6 a 0,7 mg / L), o que pode limitar o uso da droga na suspeita ou presença de bacteriemia. A penetração da tigeciclina no líquido cefalorraquidiano é pobre, pelo que esta droga está contra-indicada no tratamento da meningite. Menos de 20% da droga é metabolizada antes da excreção, que é principalmente na bÍlis. Os efeitos indesejáveis da tigeciclina, mais frequentemente relatados em ensaios publicados, foram gastrointestinais (náuseas, vÓmitos, diarreia), ocorrendo em cerca de 20% dos pacientes. Entretanto, as taxas de abandono devido a efeitos indesejados foram semelhantes para a tigeciclina e as terapias comparáveis (4,9% vs 4,2%). Tal como acontece com as tetraciclina, a tigeciclina pode interferir com o desenvolvimento ósseo ou dentário, e assim deve ser evitada, se possível, em crianças e nas mulheres grÁvidas. A tigeciclina também pode compartilhar outros efeitos indesejáveis comuns às tetraciclina. A experiência sugere que a droga é tão eficaz como a associação da vancomicina com o aztreonam, em doentes com infecções complicadas da pele e tecidos moles, e como a associação do imipenem com a cilastatina, nos pacientes com infecções intra-abdominais complicadas (BMJ Group, 2008).

A actividade *in vitro* da tigeciclina foi avaliada em isolados de patogéneos de pacientes com pneumonia adquirida na comunidade, em 29 paÍses. Neste estudo 2 isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL foram susceptÍveis à tigeciclina. A excelente actividade *in vitro* da tigeciclina contra estes isolados clÍnicos confirma a sua grande utilidade contra patogéneos associados a pneumonias adquiridas na comunidade (Bradford *et al.*, 2008).

As enterobactÍrias que produzem mais de uma ESBL sÁo pouco frequentes, mas jÁ começaram a ser mais descritas. Estes isolados sÁo geralmente resistentes às fluoroquinolonas e sÁo frequentemente resistentes a outros antibióticos como o trimetoprim / sulfametoxazol (cotrimoxazol) e aos aminoglicosÍdeos. Foi estudada a actividade *in vitro* da tigeciclina, usando o método de E-test, em 28 isolados de enterobactÍrias epidemiologicamente não-relacionadas determinado por PFGE (18 de *E.*

coli, 9 de *Klebsiella pneumoniae* e 1 de *Klebsiella oxytoca*) que produziram duas ou mais ESBLs. As ESBLs foram inicialmente detectadas de acordo com os critérios fenotípicos recomendados pelo CLSI e foram caracterizadas por focagem isoeléctrica, PCR e sequenciação. As actividades do imipenemo, da ciprofloxacina, da gentamicina e do cotrimoxazol também foram testadas pelo método de diluição em agar de acordo com as orientações do CLSI. A maioria dos isolados foi obtida a partir de amostras de urina (18 isolados; 64,3%), de infecções do tracto respiratório (5 isolados; 17,9%), de feridas (3 isolados; 10,7%) e de sangue (2 isolados; 7,1%). As combinações de ESBL estudadas foram as seguintes: CTX-M-14 + TEM-116, 8 de *E. coli* e 1 de *K. pneumoniae*; SHV-12 + TEM-116, 3 de *E. coli*; CTX-M-15 + TEM-116, 2 de *E. coli*; CTX-M-14 + SHV-12, 1 de *E. coli*; CTX-M-9 + TEM-116, 1 de *E. coli*; SHV-2 + TEM-4, 1 de *K. pneumoniae*; SHV-5 + TEM-116, 1 de *K. pneumoniae*; CTX-M-13 + SHV-12, 1 de *K. oxytoca*; CTX-M-14 + TEM-116 + SHV-2, 4 de *K. pneumoniae*; CTX-M-14 + TEM-116 + SHV-12, 1 de *E. coli* e 1 de *K. pneumoniae*; CTX-M-9 + TEM-116 + SHV-5, 1 de *E. coli* e 1 de *K. pneumoniae* e CTX-M-15 + TEM-116 + SHV-12, 1 de *E. coli*. Os resultados da susceptibilidade de acordo com os critérios da Food and Drug Administration (FDA) (susceptível, $\leq 2\mu\text{g/mL}$; intermediário, $2-8\mu\text{g/mL}$; resistente, $\geq 8\mu\text{g/mL}$), e com os critérios do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (susceptível, $\leq 1\mu\text{g/mL}$; intermediário, $1-2\mu\text{g/mL}$; resistentes, $> 2\mu\text{g/mL}$). A actividade da tigeciclina contra *E. coli* foi a seguinte: concentração mínima inibitória para 50% dos isolados (MIC50), 0,25 mg/L; MIC para 90% dos isolados (MIC90), 1 mg/L; intervalo da MIC 0,25-2 mg/L; e taxa de susceptibilidade, 94,4% (EUCAST) /100% (FDA). A sua actividade contra *K. pneumoniae* foi a seguinte: MIC50, 1 mg/L; MIC90, 4 mg/L; intervalo da MIC 0,5 - 4mg/L; e taxa de susceptibilidade, 55,6% (EUCAST) /66,7% (FDA). A MIC da tigeciclina para o isolado da *K. oxytoca* foi de 0,5 mg / L. Estes resultados são semelhantes aos publicados por outros autores sobre a *E. coli* e a *Klebsiella spp* produtoras de CTX-M ou outras ESBLs. Não houve diferenças nas MICs da tigeciclina entre os isolados produtores de duas ou três ESBLs. A resistência aos aminoglicosídeos manteve-se em cerca de 10%, mas quase 20% dos isolados foram resistentes à amoxicilina/ácido clavulânico. A resistência ao cotrimoxazol foi de 39,9% e à ciprofloxacina foi superior a 60%. Estudos anteriores sobre a actividade da tigeciclina contra as enterobactérias produtoras de ESBLs mostraram resultados de susceptibilidade semelhantes à tigeciclina (97,5%), à amoxicilina/ácido clavulânico (81%) e ao imipenemo (100%), mas a taxa de susceptibilidade à ciprofloxacina foi muito maior (64,9% vs 36,9% neste estudo). Assim, a tigeciclina mantém boa actividade contra enterobactérias com mais de uma ESBL. Segundo os

critérios da FDA, não teriam encontrado nenhum isolado resistente. Segundo os critérios da EUCAST, a *E. coli* iria mostrar uma proporção muito baixa de isolados resistentes, mas cerca de 50% de *K. pneumoniae* seriam resistentes. A tigeciclina pode ser uma boa alternativa contra as infecções em que as enterobactérias podem estar envolvidas, em áreas com alta prevalência de isolados produtores de ESBLs, tendo em conta a elevada proporção de co-resistência a outros antibióticos habitualmente usados, as fluoroquinolonas e os aminoglicosídeos. No entanto, deve-se ter em conta que as infecções em que as bactérias produtoras de ESBL estão envolvidas são infecções principalmente do tracto urinário bem como os isolados com mais de uma ESBL (quase 65% neste estudo), uma vez que a excreção da tigeciclina é principalmente biliar, com baixas concentrações urinárias. Além disso, embora a *E. coli* apresente uma taxa muito elevada de susceptibilidade, as estirpes de *K. pneumoniae* ou de *Enterobacter spp* mostram uma maior proporção de isolados resistentes (Vázquez *et al.*, 2008).

Kelesidis e colaboradores procuraram rever a eficácia de actividade microbiológica e clínica da tigeciclina para *Enterobacteriaceae* resistentes a múltiplas drogas (MDR), incluindo as que são resistentes aos beta-lactâmicos devido à manifestação de beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs), enzimas AmpC e carbapenemases. Foram identificados 26 estudos microbiológicos e 10 estudos clínicos. O grau de actividade microbiológica da tigeciclina contra 576 isolados de *Enterobacter spp* MDR foi moderado. Em estudos clínicos, 69,7% de 33 pacientes tratados com tigeciclina houve eficácia contra a infecção causada por *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemos ou produtoras de ESBL ou MDR. A tigeciclina é activa microbiologicamente contra a maioria dos isolados de *E. coli* produtoras de ESBL ou MDR e para a grande maioria de *Klebsiella spp* produtoras de ESBL ou MDR. A síntese dos dados de estudos relevantes mostrou que a tigeciclina tem actividade *in vitro*, de acordo com a FDA, contra mais de 90% de isolados de *E. coli* ou de *Klebsiella spp* caracterizados como MDR ou pela produção de ESBLs, por beta-lactamases AmpC ou por diminuição da susceptibilidade aos carbapenemos. No caso dos isolados de *Klebsiella spp*, as taxas de susceptibilidade foram mais baixas segundo as orientações da EUCAST. Os relatórios clínicos disponíveis sobre a utilização da tigeciclina para o tratamento de infecções causadas por *Enterobacteriaceae* resistentes referem-se a um número limitado de pacientes. Uma vez que a tigeciclina pode ser um dos poucos agentes activos microbiologicamente contra *Enterobacteriaceae* MDR, são necessários estudos sobre a eficácia clínica da tigeciclina

nas infecções causadas por estes patogéneos, em especial nas bacteremias e infecções complicadas do tracto urinário (Kelesidis *et al.*, 2008).

Conclusão

A disseminação comunitária de *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases de espectro alargado, é uma realidade que tem vindo a ser descrita a nível internacional e nacional, condicionando a terapêutica das infecções da comunidade, fazendo-a aproximar da realidade anteriormente típica do ambiente hospitalar.

A colonização fecal de populações pertencentes a nichos particulares da comunidade, particularmente a população idosa, cria novos desafios, em termos de controlo de infecção em instituições de cuidados a idosos, bem como poderá ditar a necessidade de rastreio pré-admissão hospitalar aquando de agudizações de patologias crónicas típicas desta faixa etária da população. As situações de altas precoces, características da actual organização da prestação de cuidados de saúde, com recuperação posterior em unidades de cuidados continuados, terão o consequente impacto de portadores fecais de *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases de espectro alargado, na ecologia bacteriana destas unidades e na disseminação à comunidade em geral.

Esta realidade deverá ser tida em conta na organização geral da prestação de cuidados de saúde, nomeadamente na prevenção de instalação e controlo de surtos de infecções nosocomiais por bactérias multirresistentes aos antibióticos, bem como na sua posterior disseminação comunitária.

Esta é já considerada uma nova ameaça em termos de Saúde Pública, nos nossos dias.

Referências Bibliográficas

Abdel-Hady H, Hawas S, El-Daker M, El-Kady R. Extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in neonatal intensive care unit. *J Perinatol* 2008 Oct; 28(10): 685-90.

Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 2007 Mar 23;128(6):1037-50.

Arpin C, Quentin C, Grobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V, Coulange L, André C. Nationwide survey of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the French community setting. *J Antimicrob Chemother* 2009 Jun; 63(6):1205-14.

Azap OK, Arslan H, Serefhanoglu K, Colakoğlu S, Erdoğan H, Timurkaynak F, Senger SS. Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase positivity in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections. *Clin Microbiol Infect* 2010 Feb; 16(2):147-51.

Baquero F, Negri MC, Morosini MI, Blázquez J. Antibiotic-selective environments. *Clin Infect Dis* 1998 Aug;27 Suppl 1:S5-11.

Ben-Ami R, Rodríguez-Baño J, Arslan H, Pitout JD, Quentin C, Calbo ES *et al.* A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in nonhospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2009 Sep 1; 49(5):682-90.

Ben-Ami R, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Schwartz D, Giladi M, Chmelnitsky I, *et al.* Influx of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* into the hospital. *Clin Infect Dis*. 2006 Apr 1;42(7):925-34.

Bhattacharjee A, Sen MR, Prakash P, Gaur A, Anupurba S. Increased prevalence of extended spectrum beta lactamase producers in neonatal septicemic cases at a tertiary referral hospital. *Indian J Med Microbiol* 2008 Oct-Dec; 26(4): 356-60.

Blaschke AJ, Korgenski EK, Daly JA, LaFleur B, Pavia AT, Byington CL. Extended-spectrum beta-lactamase-producing pathogens in a children's hospital: a 5-year experience. *Am J Infect Control* 2009 Aug; 37(6):435-41.

Blázquez J, Oliver A, Gómez-Gómez JM. Mutation and Evolution of Antibiotic Resistance: Antibiotics as Promoters of Antibiotic Resistance. *Curr Drug Targets* 2002 Aug; 3(4):345-9.

BMJ Group. What role for tigecycline in infections? *Drug Ther Bull.* 2008 Aug;46(8):62-4.

Bortolaia V, Guardabassi L, Trevisani M, Bisgaard M, Venturi L, Bojesen AM. High diversity of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* from Italian broiler flocks. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 Jan 25.

Bradford PA, Petersen PJ, Tuckman M, Jones CH. *In vitro* activity of tigecycline and occurrence of tetracycline resistance determinants in isolates from patients enrolled in phase 3 clinical trials for community-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2008 Sep;14(9):882-6.

Briñas L, Lantero M, de Diego I, Alvarez M, Zarázaga M, Torres C. Mechanisms of resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* isolates recovered in a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Dec;56(6):1107-10. Epub 2005 Oct 20.

Budak F, Nordmann P, Girlich D, Gür D. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolates in a children's hospital in Ankara-first report of SHV-2a and SHV-9 in *Salmonella spp* from Turkey. *Turk J Pediatr* 2009 Jan-Feb; 51(1):28-34.

Bush K, Jacoby AG. Updated Functional Classification of beta-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010 March, p. 969-976, Vol. 54, nº 3.

Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, *et al.* Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Jan;14 Suppl 1:144-53.

Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin Microbiol Infect* 2008 Jan; 14 Suppl 1:117-23.

Carneiro LA, Silva AP, Merquior VL, Queiroz ML. Antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli isolated from infant formulas. *FEMS Microbiol Lett* 2003 Nov 21; 228(2):175-9.

Cavaco LM, Abatih E, Aarestrup FM, Guardabassi L. Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 Oct; 52(10): 3612-6.

Cekanová L, Kolár M, Chromá M, Sauer P, Sedláčková M, Koukalová D. Prevalence of ESBL-positive bacteria in the community in the Czech Republic. *Med Sci Monit* 2009 Jul; 15(7):BR202-6.

Chazan B, Raz R, Teitler N, Nitzan O, Edelstein H, Colodner R. Epidemiology and susceptibility to antimicrobials in community, hospital and long-term care facility bacteremia in northern Israel: a 6 year surveillance. *Isr Med Assoc J* 2009 Oct; 11(10):592-7.

Cheng CH, Tsai MH, Huang YC, Su LH, Tsau YK, Lin CJ *et al.* Antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in children with vesicoureteral reflux receiving prophylactic antibiotic therapy. *Pediatrics* 2008 Dec; 122(6):1212-7.

Costa D, Vinué L, Poeta P, Coelho AC, Matos M, Sáenz Y, *et al.* Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Vet Microbiol* 2009 Sep 18;138 (3-4): 339-44.

Da Silva G J. Resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos. Disponível em <http://www.farbeira.pt/Portals/farbeira/documentos/Artigo%20Plural%20GJ%20Silva%20Resist%C3%Aancia.pdf> [acedido em 01/04/2010]

Demir S, Soysal A, Bakir M, Kaufmann ME, Yagci A. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in pediatric wards: a nested case-control study. *J Pediatr Child Health* 2008 Oct; 44(10): 548-53.

Diestra K, Coque TM, Miró E, Oteo J, Nicolau CJ, Campos J, *et al.* Characterization and molecular epidemiology of ESBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 11 Spanish hospitals (2004). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008 Aug-Sep;26(7):404-10.

Dolejská M, Bierosová B, Kohoutová L, Literák I, Cízek A. Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. *J Appl Microbiol* 2009 Jun; 106(6):1941-50.

Escudero E, Vinué L, Teshager T, Torres C, Moreno MA. Resistance mechanisms and farm-level distribution of fecal *Escherichia coli* isolates resistant to extended-spectrum cephalosporins in pigs in Spain. *Res Vet Sci* 2010 Feb; 88(1):83-7.

Fankhauser C, Zingg W, Francois P, Dharan S, Schrenzel J, Pittet D, *et al.* Surveillance of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a Swiss Tertiary Care Hospital. *Swiss Med Wkly* 2009 Dec 26; 139(51-52):747-51.

Fernandes R, Gestoso A, Freitas JM, Santos P, Prudêncio C. High resistance to fourth-generation cephalosporins among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases isolated in Portugal. *Int J Antimicrob Agents* 2009 Feb;33(2):184-5.

Fernandes SA, Paterson DL, Ghilardi-Rodrigues AC, Adams-Haduch JM, Tavechio AT, Doi Y. CTX-M-2-producing *Salmonella Typhimurium* isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. *Microb Drug Resist* 2009 Dec; 15(4):317-21.

Forbes AB, Sahm FD, Weissfeld SA. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th ed. St. Louis: Mosby; 2007.

Friedmann R, Raveh D, Zartzer E, Rudensky B, Broide E, Attias D, *et al.* Prospective evaluation of colonization with extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* among patients at hospital admission and of subsequent colonization with ESBL-producing *Enterobacteriaceae* among patients during hospitalization. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009 Jun; 30(6):534-42.

García San Miguel L, Cobo J, Valverde A, Coque TM, Diz S, Grill F, Cantón R. Clinical variables associated with the isolation of *Klebsiella pneumoniae* expressing different extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2007 May; 13(5): 532-8.

Giske CG, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, Paterson DL, *et al.* Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother* 2009 Jan;63(1):1-4.

Hammad AM, Ahmed AM, Ishida Y, Shimamoto T. First characterization and emergence of SHV-60 in raw milk of a healthy cow in Japan. *J Vet Med Sci* 2008 Nov; 70(11): 1269-72.

Harris AD, Perencevich EN, Johnson JK, Paterson DL, Morris JG, Strauss SM, *et al.* Patient-to-patient transmission is important in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* acquisition. Clin Infect Dis. 2007 Nov 15;45(10):1347-50.

Ho PL, Wong RC, Chow KH, Yip K, Wong SS, Que TL. CTX-M type beta-lactamases among fecal *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in non-hospitalized children and adults. J Microbiol Immunol Infect 2008 Oct; 41(5): 428-32.

Jensen LB, Hasman H, Agersø Y, Emborg HD, Aarestrup FM. First description of a non-oxyimino-cephalosporin-resistant, ESBL-carrying *Escherichia coli* isolated from meat sold in Denmark. J Antimicrob Chemother 2006 Apr;57(4):793-4.

Jouini A, Vinué L, Slama KB, Sáenz Y, Klibi N, Hammami S, *et al.* Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. J Antimicrob Chemother 2007 Nov; 60(5): 1137-41.

Kader AA, Kumar A, Kamath KA. Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in patients and a symptomatic healthy individuals. Infect Control Hosp Epidemiol 2007 Sep; 28(9):1114-6.

Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. J Antimicrob Chemother 2008 Nov;62(5):895-904.

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 May 1;3(4): 295-9.

Kola A, Holst M, Chaberny IF, Ziesing S, Suerbaum S, Gastmeier P. Surveillance of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria and routine use of contact isolation: experience from a three-year period. J Hosp Infect. 2007 May;66(1):46-51. Epub 2007 Mar 12.

Lee J, Pai H, Kim YK, Kim NH, Eun BW, Kang HJ, *et al.* Control of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a children's hospital by changing antimicrobial agent usage policy. J Antimicrob Chemother 2007 Sep; 60(3): 629-37.

Literak I, Dolejska M, Radimersky T, Klimes J, Friedman M, Aarestrup FM, *et al.* Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *J Appl Microbiol* 2009 Sep 30.

Lye DC, Wijaya L, Chan J, Teng CP, Leo YS. Ertapenem for treatment of extended-spectrum beta-lactamase-producing and multidrug-resistant gram-negative bacteraemia. *Ann Acad Med Singapore* 2008 Oct;37(10):831-4.

Machado E, Coque TM, Cantón R, Sousa JC, Peixe L. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 2008 Aug; 62(2):296-302.

Machado E, Coque TM, Cantón R, Sousa JC, Silva D, Ramos M, *et al.* Leakage into Portuguese aquatic environments of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2009 Mar;63(3):616-8.

Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortés P, González JJ, Lavilla S, *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother* 2006 Jul; 58(1):211-5.

Meyer E, Serr A, Schneider C, Utzolino S, Kern WV, Scholz R, *et al.* Should we screen patients for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in intensive care units? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009 Jan;30(1):103-5.

Mumtaz S, Ahmad M, Aftab I, Akhtar N, ul Hassan M, Hamid A. Extended spectrum beta-lactamases in enteric gram-negative bacilli: related to age and gender. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2007 Oct-Dec;19(4):107-11.

Murray RP, Baron JE, Tenover JC, Pfaller AM, Tenover FC, Tenover JC, *et al.* Manual of Clinical Microbiology. 8th ed., Vol. 1 & 2 Washington: ASM Press; 2003.

Nguyen KV, Nguyen PT, Jones SL. Effectiveness of an alcohol-based hand hygiene programme in reducing nosocomial infections in the Urology Ward of Binh Dan Hospital, Vietnam. *Trop Med Int Health* 2008 Oct; 13(10): 1297-302.

Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, *et al.* Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in

commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 Aug; 51(8):2720-5.

Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005 Oct; 18(4): 657-86.

Paterson DL. The molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase producing organisms. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008 Aug-Sep;26(7):403.

Peirano G, Pitout JD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents* 2010 Apr;35(4):316-321.

Poeta P, Radhouani H, Igrejas G, Gonçalves A, Carvalho C, Rodrigues J, *et al.* Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases. *Appl Environ Microbiol* 2008 Dec; 74(23): 7439-41.

Poeta P, Radhouani H, Pinto L, Martinho A, Rego V, Rodrigues R, *et al.* Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. *J Basic Microbiol* 2009 Dec; 49(6):584-8.

Punpanich W, Tantichattanon W, Wongwatcharapaiboon S, Treeratweeraphong V. *In vitro* susceptibility pattern of cephalosporin-resistant Gram-negative bacteria. *J Med Assoc Thai* 2008 Oct;91 Suppl 3:S21-7.

Radhouani H, Pinto L, Coelho C, Gonçalves A, Sargo R, Torres C, *et al.* Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M classes in faecal samples of common buzzards (*Buteo buteo*). *J Antimicrob Chemother* 2010 Jan;65(1):171-3.

Reddy P, Malczynski M, Obias A, Reiner S, Jin N, Huang J, *et al.* Screening for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* among high-risk patients and rates of subsequent bacteremia. *Clin Infect Dis* 2007; 45:846-852.

Rodríguez-Baño J, Alcalá J C, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, *et al.* *Escherichia coli* producing SHV-type extended-spectrum beta-lactamase is a significant cause of community-acquired infection. *J Antimicrob Chemother* 2009 Apr; 63(4):781-4.

Rodríguez-Baño J , Alcalá JC , Cisneros JM , Grill F , Oliver A , Horcajada JP , *et al.* Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. Arch Intern Med 2008 Sep 22; 168(17): 1897-902.

Rodríguez-Baño J , López-Cerero L , Navarro MD, Díaz de Alba P , Pascual A . Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. J Antimicrob Chemother 2008 Nov; 62(5):1142-9.

Rodríguez-Baño J, Navarro MD. Extended-spectrum beta-lactamases in ambulatory care: a clinical perspective. Clin Microbiol Infect 2008 Jan; 14 Suppl 1:104-10.

Rooney PJ, O'Leary MC, Loughrey AC, McCalmont M, Smyth B, Donaghy P, *et al.* Nursing homes as a reservoir of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 2009 Sep; 64(3):635-41.

Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Infect. 2008 Jan;14 Suppl 1:33-41.

Ruimy R, Brisabois A, Bernede C , Skurnik D , Barnat S , Arlet G , *et al.* Organic and conventional fruits and vegetables contain equivalent counts of Gram-negative bacteria expressing resistance to antibacterial agents. Environ Microbiol 2009 Nov 17.

Ruppé E, Woerther PL, Diop A, Sene AM, Da Costa A, Arlet G, *et al.* Carriage of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates among children living in a remote village in Senegal. Antimicrob Agents Chemother 2009 Jul; 53(7):3135-7.

Shahid S K. Cefepime and its role in pediatric infections. Recent Pat Antiinfect Drug Discov 2008 Jun; 3(2): 145-8.

Shakil S, Ali SZ, Akram M, Ali SM, Khan AU. Risk Factors for Extended-Spectrum beta-Lactamase Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Acquisition in a Neonatal Intensive Care Unit. J Trop Pediatr 2009 Jul 16.

Simões RR, Poirel L, Da Costa PM, Nordmann P. Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis 2010 Jan; 16(1): 110-2.

Siu, Leung-Kei Antibiotics: action and resistance in gram-negative bacteria. J Microbiol Immunol Infect 2002 Mar; 35(1): 1-11.

Slama TG. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. Crit Care 2008;12 Suppl 4:S4.

Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Cloeckeaert A, *et al.* Comparative analysis of extended-spectrum-beta-lactamase-carrying plasmids from different members of *Enterobacteriaceae* isolated from poultry, pigs and humans: evidence for a shared beta-lactam resistance gene pool? J Antimicrob Chemother 2009 Jun; 63(6):1286-8.

Sun Y, Zeng Z, Chen S, Ma J, He L, Liu Y, *et al.* High prevalence of *bla* extended-spectrum beta(CTX-M)-lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. Clin Microbiol Infect 2009 Nov 20.

Teng CP, Chen HH, Chan J, Lye DC. Ertapenem for the treatment of extended-spectrum beta-lactamase-producing Gram-negative bacterial infections. Int J Antimicrob Agents 2007 Oct;30(4):356-9.

Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Med 2006 Jun; 119(6 Suppl 1):S3-10; discussion S62-70.

Texto de Apoio às Aulas Teóricas de Microbiologia Médica do ICBAS, 1993/ 1994.

Tian SF, Chen BY, Chu YZ, Wang S. Prevalence of rectal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among elderly people in community settings in China. Can J Microbiol 2008 Sep; 54(9): 781-5.

Valverde A, Grill F, Coque TM, Pintado V, Baquero F, Cantón R, *et al.* High rate of intestinal colonization with extended-spectrum-beta-lactamase-producing organisms in household contacts of infected community patients. J Clin Microbiol 2008 Aug; 46(8):2796-9.

Vázquez MF, Romero ED, García MI, Rodríguez JA, Bellido JL. Comparative *in vitro* activity of tigecycline against enterobacteria producing two or more extended-spectrum beta-lactamases. Int J Antimicrob Agents 2008 Dec;32(6):541-3.

Velaphi S, Wadula J, Nakwa F. Mortality rate in neonates infected with extended-spectrum beta lactamase-producing *Klebsiella spp* and selective empirical use of meropenem. Ann Trop Paediatr 2009 Jun; 29(2):101-10.

Vinué L, Lantero M, Sáenz Y, Somalo S, de Diego I, Pérez F, *et al.* Characterization of extended-spectrum beta-lactamases and integrons in *Escherichia coli* isolates in a Spanish hospital. *J Med Microbiol* 2008 Jul; 57(Pt 7): 916-20.

Vinué L, Sáenz Y, Martínez S, Somalo S, Moreno MA, Torres C, *et al.* Prevalence and diversity of extended-spectrum beta-lactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humans in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2009 Oct; 15(10):954-7.

von Baum H, Marre R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int J Med Microbiol* 2005 Oct; 295(6-7):503-11.

Warren RE, Ensor VM, O'Neill P, Butler V, Taylor J, Nye K, *et al.* Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2008 Mar; 61(3): 504-8.

Yilmaz E, Akalin H, Ozbey S, Kordan Y, Sinirtaş M, Gürcüoğlu E, *et al.* Risk factors in community-acquired/onset urinary tract infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Chemother* 2008 Oct; 20(5): 581-5.

Zahar JR, Lortholary O, Martin C, Potel G, Plesiat P, Nordmann P. Addressing the challenge of extended-spectrum beta-lactamases. *Curr Opin Investig Drugs* 2009 Feb;10(2):172-80.