Helena Maria Neto Ferreira

β-lactamases de espectro alargado e enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos em estirpes hospitalares Portuguesas de *Klebsiella pneumoniae*

1997

Helena Maria Neto Ferreira

Licenciada em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Porto

β-lactamases de espectro alargado e enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos em estirpes hospitalares Portuguesas de *Klebsiella pneumoniae*

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data ~~97/10/23~~
Reg ~~76~~ 3586
Cota ~~Pasta 137-516(04)~~
2730.2006

Pasta 137
3586

Porto

1997

À Ana Teresa

Ao José Manuel

A meus Pais

AGRADECIMENTOS

Neste momento, venho manifestar o meu agradecimento a todos quantos, mesmo aqueles que apesar de não citados, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Ao Professor Doutor João Carlos Figueiredo de Sousa, orientador deste trabalho e Director do Laboratório de Microbiologia, a que me orgulho de pertencer, gostaria de agradecer o exemplo do Professor, a orientação científica e pedagógica, o apoio e confiança ao longo deste percurso no Serviço que dirige.

Ao Professor George Miller e Schering-Plough Research Institute pela colaboração no âmbito de estudos internacionais da resistência aos aminoglicosídeos e pela hospitalidade por altura da minha passagem pelo laboratório de Biologia Molecular.

Ao Professor Antone Medeiros pela disponibilização da metodologia experimental de focagem isoeléctrica e de estirpes para referência na determinação dos pontos isoeléctricos.

Ao departamento de Química-Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, nas pessoas do seu Director Prof. Doutor José Luís Costa Lima e Prof. Dr. Rui Lapa, agradeço a disponibilização do equipamento e criação das condições necessárias ao estudo da cinética enzimática, particularmente ao Rui Lapa pela disponibilidade na montagem e automatização do processo.

À Profª. Drª. Aida Duarte do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Farmácia de Lisboa, gostaria de agradecer a colaboração, especialmente com a caracterização genómica das estirpes por PFGE e disponibilização das estirpes do Hospital de Sᵗᵃ. Maria.

Ao Serviço de Bacteriologia do Hospital Geral de Sᵗᵒ. António, na pessoa do seu Director Dr. Mário Costa, agradeço o interesse manifestado nesta colaboração e a disponibilidade demonstrada pela Drª Paula na recolha e triagem das estirpes

À Drª Manuela Aguiar, minha professora de Bacteriologia laboratorial, gostaria de agradecer o despertar do interesse particular por esta área e a disponibilização das estirpes do Hospital da Prelada.

À Drª Olga Cardoso do departamento de Microbiologia da Faculdade de Farmácia de Coimbra agradeço a colaboração na caracterização das proteínas da membrana externa.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia, agradeço a camaradagem, o apoio e o entusiasmo, especialmente à Luísa Peixe, parceira destas questões da resistência aos antibióticos.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia agradeço a disponibilidade demonstrada.

Aos colegas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, particularmente aos colegas do Departamento de Bioquímica.

À Bial, pela disponibilização de material bibliográfico.

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, a cujo corpo docente tenho a honra de pertencer.

Aos amigos.

Aos familiares.

ÍNDICE

RESUMO VI

ABSTRACT VIII

RÉSUMÉ X

DECLARAÇÃO XII

ABREVIATURAS XIII

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 Resistência aos antibióticos no fim do século 1

1.2 Infecções nosocomiais 4

1.3 Infecções na comunidade e suas relações com infecção hospitalar 5

1.4 *Klebsiella pneumoniae* - um patogénico nosocomial 7
1.4.1 Epidemiologia das infecções nosocomiais por *Klebsiella pneumoniae* 10

1.5 Resistência aos β-lactâmicos 14
1.5.1 Evolução da resistência aos β-lactâmicos 14
1.5.2 Factores que influenciam o nível de resistência 15
1.5.3 β-lactamases de espectro alargado 18
1.5.3.1 Classificação das β-lactamases de espectro alargado 19
1.5.3.2 Relação estrutura função das β-lactamases de espectro alargado da família SHV 22
1.5.3.3 Detecção de estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado 34

1.6 *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamases de espectro alargado 36
1.6.1 Incidência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamases de espectro alargado 36
1.6.2 Epidemiologia e distribuição geográfica de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamases de espectro alargado 37
1.6.3 *Klebsiella pneumoniae* - uma espécie prevalente entre as produtoras de β-lactamases de espectro alargado 41

1.7 Resistências associadas 42
1.7.1 Resistência às associações de β-lactâmicos com inibidores de β-lactamases 42
1.7.2 Resistência aos aminoglicosídeos - Enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos 44
1.7.3 Resistências múltiplas 47

1.8 *Klebsiella pneumoniae* - um patogénico multi-resistente 49

2. OBJECTIVOS 51

3. MATERIAL E MÉTODOS 52

3.1 Meios de cultura e tampões de pH 53
3.1.1 Meios sólidos 53
3.1.2 Meios líquidos 54
3.1.3 Meios tampão de pH 55

3.2 Estirpe de referência e estirpes receptoras 55

3.3 Detecção de estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado 56
3.3.1 Determinação do fenótipo de resistência 56
3.3.1.1 Detecção do sinergismo de oxiimino-β-lactâmicos com ácido clavulânico 57
3.3.1.1.1 Teste da acção de sinérgica de dois discos 57
3.3.1.1.2 Determinação do sinergismo por adição de ácido clavulânico 58
3.3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória - CMI 59

3.4 Caracterização das β-lactamases 59
3.4.1 Focagem isoeléctrica 59
3.4.2 Cinética enzimática 61

3.5 Caracterização genómica dos isolados clínicos 66
3.5.1 Perfil de restrição do DNA genómico por pulsed-field gel electrophoresis - PFGE 66

3.6 Outros mecanismos que condicionam a resistência aos β-lactâmicos 68
3.6.1 Análise de proteínas da membrana externa 68

3.7 Resistências associadas 69

3.8 Caracterização de enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos 70

3.9 Transferência do determinante genético das β-lactamases 71
3.9.1 Conjugação 71
3.9.2 Transformação 72

3.10 Análise do DNA plasmídico 74

3.11 Verificação "in vitro" do efeito de pressão antibiótica exercida em isolado produtor de enzima que condiciona nível baixo de resistência aos oxiimino-β-lactâmicos 75

4. RESULTADOS 76

4.1 Relações genotípicas e fenotípicas dos isolados clínicos por ordem cronológica do isolamento 77

4.2 Resultados representativos dos isolados clínicos que apresentam nível baixo de resistência aos oxiimino-β-lactâmicos - caracterização da enzima responsável por este fenótipo de resistência 83

4.3 Resultados representativos dos isolados clínicos que apresentam nível elevado de resistência aos oxiimino-β-lactâmicos - caracterização da enzima responsável por este fenótipo de resistência 86

4.4 Resultados de isolados clínicos do Hospital de S. João produtores de β-lactamase de espectro alargado do tipo TEM - caracterização da enzima 90

4.5 Análise de comportamentos específicos de cada Hospital 92
4.5.1 Hospital de S.João 92
4.5.2 Hospital de S^{to}. António 93
4.5.3 Hospital de S^{ta}. Maria 96

4.6 Verificação "in vitro" da evolução da resistência em função da pressão selectiva imposta a isolado clínico tipo 98

4.7 Fenótipo de resistência condicionado pelas enzimas inactivadoras de aminoglicosídeos detectadas nos isolados estudados 99

4.8 Perfil de plasmídeos de isolados tipo 101

4.9 Transferência de resistência 101

4.10 Resistência não enzimática aos β-lactâmicos 104
4.10.1 Análise das proteínas da membrana externa 104

4.11 Perfis de restrição de DNA genómico obtidos por PFGE 105

5. DISCUSSÃO 107

5.1 Análise dos surtos 107

5.2 Características epidemiológicas das estirpes de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β-lactamases de espectro alargado estudadas 118

5.3 Subavaliação de β-lactamases de espectro alargado - consequências clínicas 122

5.4 Influência das resistências associadas à produção de β-lactamase de espectro alargado 123
5.4.1 Resistência aos aminoglicosídeos aminociclitóis 123

5.5 Influência de outros mecanismos de resistência 125

5.6 Consequências terapêuticas 126

5.7 Consequências económicas das infecções nosocomiais 129

5.8 Controle de surtos de infecções nosocomiais 130

5.9 Hipóteses para justificação da clonalidade 132

6. CONCLUSÕES 134

7. BIBLIOGRAFIA 136

8. APÊNDICE 156

RESUMO

A resistência aos antibióticos em *Klebsiella pneumoniae* a nível Hospitalar, constitui uma preocupação crescente, devido ao condicionamento que provoca na terapêutica das infecções nosocomiais. Estes agentes patogénicos humanos são responsáveis por infecções graves e em ambiente Hospitalar provocam surtos infecciosos preferencialmente em Unidades de Cuidados Intensivos. As estirpes envolvidas nestas situações apresentam elevada resistência aos antibióticos de vários tipos, nomeadamente aos β-lactâmicos de largo espectro e aminoglicosídeos-aminociclitóis.

O objectivo deste trabalho consistiu em caracterizar os tipos de β-lactamases de espectro alargado e de enzimas inactivadoras de aminoglicosídeos prevalentes em isolados clínicos hospitalares de *Klebsiella pneumoniae*, bem como caracterizar as relações entre as estirpes, de forma a interpretar epidemiologicamente a sua ocorrência em Hospitais Portugueses.

Caracterizaram-se genomicamente as estirpes responsáveis por situações infecciosas em ambiente Hospitalar e procedeu-se à caracterização das resistências às cefalosporinas de terceira geração e aminoglicosídeos através da caracterização bioquímica das β-lactamases de espectro alargado e caracterização fenotípica e genética, por hibridização de DNA dos genes responsáveis pela codificação das enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos.

Verificou-se disseminação clonal intra e inter-hospitalar no Norte do País, de estirpe de *Klebsiella pneumoniae* resistente a amino, carboxi e ureído penicilinas, oxiimino-β-lactâmicos, à associção de amoxicilina com ácido clavulânico e aos aminoglicosídeos gentamicina, tobramicina, kanamicina, neomicina e apresentando redução da susceptibilidade à netilmicina, produtora de SHV-5, TEM-1, AAC(3)-II e APH(3')-I, apresentando um perfil de restrição de DNA genómico comum a vários isolados clínicos.

Estirpes do mesmo perfil de restrição de DNA genómico, apresentam-se como produtoras de SHV-2, mantendo as restantes características comuns às estirpes produtoras de SHV-5, verificando-se apenas redução da resistência a β-lactâmicos condicionada por esta enzima, nestas condições.

A produção de SHV-5, por estirpes não relacionadas genomicamente e codificada por plasmídeo conjugativo que poderá apresentar associada a produção de TEM-1 e de AAC(6')-IV e APH(3')-I, alerta-nos para a necessidade de analisar independentemente cada situação, de forma a detectar o fenómeno relevante para a disseminação da resistência.

Num Hospital de Lisboa existe uma β-lactamase epidémica diferente da do Norte do País, TEM-26, parecendo neste caso ser mais relevante para a situação epidémica a transferência do determinante genético, embora haja predomínio de dois tipos principais de perfil de restrição de DNA genómico, neste caso a disseminação deverá ser mista, com disseminação clonal e disseminação do gene de resistência através de plasmídeo conjugativo.

O aparecimento restrito no tempo, de TEM-6, no início do estudo, alerta-nos para a necessidade de caracterização molecular da alteração dos padrões de resistência.

A resistência múltipla dos isolados estudados e as diferentes características de disseminação, demonstram a necessidade de uma vigilância da evolução da resistência aos antibióticos em estirpes hospitalares de *Klebsiella pneumoniae*, bem como a monitorização de situações epidémicas de forma a controlar a disseminação.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae antibiotic resistance, is an Hospital problem conditioning the therapeutic options of nosocomial infections. This human pathogen is responsible for life-threatening infections in the Hospital environment mainly in the Intensive Care Units. The strains responsible by Hospital outbreaks are resistant to many types of antibiotics mainly extended-spectrum β-lactams and aminoglycosides.

The aim of this study was to characterise the prevalent types of extended-spectrum β-lactamases and aminoglycoside modifying enzymes in clinical isolates *of Klebsiella pneumoniae* and to determine the relationships among the strains in the way to understand the occurrence in Portuguese Hospitals.

The strains responsible for Hospital infections were characterised by restriction of genomic DNA and the mechanism of resistance to third generation cephalosporins and aminoglycosides were characterised by biochemical identification of the extended-spectrum β-lactamases and phenotypic and genetically by DNA hybridisation of the genes coding aminoglycoside inactivating enzymes.

We noticed intra and inter-hospital clonal dissemination of a *Klebsiella pneumoniae* strain resistant to amino, carboxy and ureydo-penicilins, oxyimino-β-lactams, association of amoxicillin with clavulanic acid and to the aminoglycosides gentamycin, tobramycin, kanamycin, neomycin, and showing reduction of susceptibility to netilmycin, producing SHV-5, TEM-1, AAC(3)-II and APH(3')-I, presenting a pattern of restriction of genomic DNA common to the clinical isolates.

We found strains of the same pattern of restriction of genomic DNA, producing SHV-2 instead of SHV-5, with the same other characteristics and with reduced level of resistance to the extended-spectrum β-lactams.

Strains genomically not related, producing SHV-5 coded by a conjugative plasmid that may produce also TEM-1, AAC(6')-IV and APH(3')-I, should alert us to the need of independent analysis of each case to detect the relevant phenomenon for dissemination of resistance.

At an Hospital of Lisbon we found an epidemic β-lactamase different from the North of the Country, TEM-26, and the transfer of the genetic determinant seems more relevant for the epidemic situation. The occurrence of two main patterns of restriction of genomic DNA, seems to indicate clonal dissemination and dissemination of the resistance gene by a conjugative plasmid, as showed by transconjugants with the same β-lactamase.

The restrict appearance of TEM-6 at the beginning of the study, should alert us to the need of monitoring molecular changes in the resistance patterns.

The multiple resistance of the clinical isolates and the different patterns of dissemination, show the need of surveillance of the evolution of antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* Hospital strains, and monitoring of epidemics to control dissemination.

RÉSUMÉ

La résistance aux antibiotics en *Klebsiella pneumoniae* représent une preocupation croissant, par la limitation de la thérapeutique des infections nosocomiales. Ces pathogènes humaines sont responsables par des infections graves en milieu hospitalier et provoque epidemies infectieuses preferencielement en Unités de Assistance Intensive. Les souches responsables par cettes situations present resistance aux differents antibiotics, notamment les β-lactamines de spectre élargi et les aminosides.

L'objectif de ce travail a consisté en charactériser les β-lactamases de spectre élargi et les enzimes inactivatrices des aminosides prevalentes en souches cliniques hospitaliers de *Klebsiella pneumoniae* et charactériser les relations entre les souches de forme a interpreter epidemiologiquement sa occurrence en Hôpitaux de Portugal.

On a charactérisée genomiquement les souches responsables par infections en milieu hospitalier et procédé à la charactérisation des resistances aux céphalosporins de troisiéme génération et aminosides, par la identification biochimique des β-lactamases à spectre élargi et charactérisation phenotipique e genetique par hibridization de DNA des gènes que codifie des enzimes inactivatrices des aminosides.

On a verifié la dissemination clonale intra et inter-hospitalier de souche de *Klebsiella pneumoniae* resistant aux amino, carboxi et ureido-pénicillines, oxiimino-β-lactamines, à la association de amoxicillin avec acide clavulanique et aux aminosides, gentamicin, tobramicin, kanamicin, neomicin et presentant reduction de susceptibilité à netilmicin, productrice de SHV-5, TEM-1, AAC(3)-II et APH(3')-I, avec un profil de restriction de DNA genomique identique pour ces souches.

Souches qui present un profil de restriction de DNA genomique identique, sont produtrices de SHV-2, et identiques, en autres characteristiques, aux souches productrices de SHV-5.

La production de SHV-5, par souches genomiquement non relationés e codifiés par plasmid conjugative presentant associé la production de TEM-1, AA(6')-IV e APH(3')-I, alert pour la necessité d'étudier chaque situation par forme a détecter le phénomène déterminant pour la dissémination de la resistance.

Un Hôpital en Lisbon montrent une β-lactamase epidemic different de la du Nord du Pays, TEM-26. Dans ce cas, la transference de le determinant genetique será le plus important pour la situation epidemic. La occurrence concomitant de deux profils de DNA genomique préférenciels, suggest dissemination des souches et du determinant genetique, comme montre la obtention de transconjugants avec la meme β-lactamase.

La occurrence restrict dans le temps, de TEM-6 alert pour la nécessité d'attention pour les alterations moleculaires des profils de resistance.

La resistance multiple de ces souches cliniques et les différents formes de dissemination, montrent la nécessité de une vigilance de la evolution de la resistance aux antibiotics en souches hospitaliers de *Klebsiella pneumoniae* et de la monitorization des épidémies, pour controller la dissemination.

DECLARAÇÃO

Ao abrigo do número 2 do artigo 8° do Decreto-Lei n° 388/70, de 18 de Agosto, declara-se que a presente dissertação inclui resultados que foram parcialmente usados nas publicações a seguir indicadas:

. **Ferreira H. M. N., J. C. Sousa and L. M. Peixe.** 1992. Caracterização das β-lactamases responsáveis pela resistência de estirpes hospitalares de *Klebsiella pneumoniae* aos antibióticos β-lactâmicos. **Rev. Portug. Doenças Infecc.. 15:** 207-209

. **Ferreira, H. N. , G.H. Miller, M. J. M. Vaz, M. L. Queirós, L.M. V. Peixe, G. C. Silva, O. Cardoso, R. Leitão, J. C. Sousa.** 1994. Caracterização molecular da resistência bacteriana aos antibióticos aminoglicosídeos-aminociclitóis em isolados clínicos hospitalares. **Arq. Med. 8:** 137-139

. **Miller, G. H., and The Aminoglycoside Resistance Study Groups.** 1994. Increasing complexity of aminoglycoside resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. **APUA Newsletter 12:** 1,5-7

. **Miller, G. H., F. J. Sabatelli, L. Naples, R.S. Hare, K. J. Shaw, and the aminoglycoside study groups.** 1995. The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and the role of isepamicin - a new broad-spectrum aminoglycoside. **J. Chemother. 7 (Suppl. 2):** 31-44

. **Miller, G. H., F. J. Sabatelli, R.S. Hare, Y. Glupczynski, P. Mackey, D. shlaes, K. Shimizu, K. J. Shaw, and The Aminoglycoside Resistance Study Groups *.** 1997. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms - changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns?. **Clin. Infect. Dis. 24 (Suppl. 1):** S46-62

. **Neto H. M., J. C. Sousa, M. L. Queirós, A. Aguiar and C. Guimarães.** 1992. Comportamento "in vitro" de estirpes patogénicas de *Klebsiella pneumoniae* face aos antibióticos β-lactâmicos. **Rev. Portug. Doenças Infecc.. 15:** 121-124

. **The Aminoglycoside Resistance Study Groups.** 1995. The most frequently occuring aminoglycoside resistance mechanisms - combined results of surveys in eight regions of the World. **J. Chemother. 7 (Suppl. 2):** 17-30

ABREVIATURAS

2'-Net	2'-netilmicina
6'-Net	6'-netilmicina
Ala	Alanina
Am	Amicacina
Apra	Apramicina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
AZT	Aztreonamo
CAZ	Ceftazidima
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
FDA	Food and Drug Administration
Fort	Fortimicina
Fox	Cefoxitina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
Gm	Gentamicina
I	Isepamicina
Ile	Isoleucina
IRT	Inhibitor Resistant TEM
K	Canamicina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
N	Neomicina
NCCLS	National Comitee for Clinical Laboratory Standards
Net	Netilmicina
PAGE	Electroforese em gele de poliacrilamida (Poliacrilamide gel electrophoresis)
PBPs	Proteínas de ligação da penicilina (Penicillin Binding Proteins)
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
pI	ponto isoeléctrico
SDS	Dodecil sulfato de sódio (Sodium Dodecil Sulfate)
Ser	Serina
Thr	Treonina
Tm	Tobramicina
UCI	Unidade de Cuidados Intensivos
Val	Valina
MOPS	Ácido morfolino propano sulfónico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
TEMED	NNN'N'-tetrametiletilenediamina

Introdução

1. Introdução

1.1 Resistência aos antibióticos no fim do século

A descoberta, desenvolvimento e uso terapêutico dos antibióticos no século vinte reduziu consideravelmente a mortalidade devida a infecções bacterianas (Cohen, 1992).
A partir de 1980 o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos tornou-se alarmante e nos dias de hoje começam a aparecer situações em que as opções terapêuticas para o tratamento de infecções graves começam a ser muito restritas, enfatizando a necessidade de novas posturas e opções terapêuticas para obviar este problema (Chopra, et al., 1997).
O uso de antibióticos gera resistência, afectando seriamente a sua eficácia para a terapêutica, principalmente nas infecções nosocomiais.

A pressão selectiva exercida pelo uso dos antibióticos despoleta o desenvolvimento de resistência, pelo que o seu uso constitui um factor de risco para a infecção com um agente patogénico resistente. A resistência às drogas antimicrobianas é um problema global. Devido à facilidade das comunicações e esbatimento de fronteiras, o risco de disseminação da resistência aos antibióticos é cada vez maior, pois os patogénicos resistentes a múltiplas drogas podem distribuir-se facilmente através do globo.
Os antibióticos que constituíam uma arma de primeira linha, estão a tornar-se progressivamente ineficazes não estando disponíveis novos antibióticos para tratar estirpes multi-resistentes (Levy, 1996).
A utilização de antibióticos na produção animal constitui cerca de metade da produção total de antibióticos dos Estados Unidos da América. Também em Portugal e nos países dos quais importamos carne, a utilização de antibióticos na produção animal (DECO, 1997), no que respeita quer à profilaxia ou como promotores de crescimento, pode ter consequências importantes na prevalência de estirpes resistentes na flora normal da população, influenciando o tipo de infecções na comunidade e a nível hospitalar, uma vez

que as estirpes que colonizam a população quando pressionadas podem originar situações difíceis de resolver.

O uso de antibióticos nas explorações animais, em doses subterapêuticas, promove a resistência dos patogénicos animais e humanos (Cohen, 1992). Temos como exemplo, o aparecimento de estirpes humanas, produtoras de um tipo particular de enzimas que degradam os aminoglicosídeos, relacionado com a utilização de um determinado aminoglicosídeo, a apramicina, na produção animal em determinados países (Miller et al., 1997). O aparecimento de estirpes produtoras de β-lactamases do tipo TEM resistentes aos inibidores de β-lactamases, em coliformes fecais de vitelas, associadas a resistências a apramicina, gentamicina, tetraciclina, sulfonamidas e estreptomicina alerta-nos para a importância dos antibióticos usados em veterinária e a sua contribuição para a disseminação de resistência aos antibióticos (Hunter et al., 1993).

O interesse crescente da aquacultura para a produção alimentar, os problemas associados com as doenças infecciosas dos peixes e o rápido desenvolvimento de resistência aos antibióticos usados nestas situações, alertam-nos para a importância desta vertente da produção alimentar para o desenvolvimento de resistência. Esta actividade crescente ainda não está regulamentada e os antibióticos usados em aquacultura são os mesmos que os usados para tratar infecções nos humanos. Os antibióticos permanecem no ambiente podendo fluir para cursos de água e sistemas de esgotos, tornando-se contaminantes ambientais amplamente distribuídos. O que em países e zonas em que o tratamento de esgotos não seja adequado, facto que poderá considerar-se um índice de subdesenvolvimento, poderá constituir um problema sério (Schaechter, 1994).

Os factores de resistência, particularmente os codificados por elementos genéticos móveis, podem disseminar-se rapidamente nas populações humanas e animais e em certa medida no ambiente, pelo que deverão ser definidas orientações para reduzir a disseminação de agentes infecciosos e resistência aos antibióticos (Cassel & Task Force on Antibiotic Resistance, 1995).

Alterações tecnológicas e sociais poderão ser também responsáveis pela transmissão de microorganismos resistentes (abolição de fronteiras, facilidade de transportes, transporte de alimentos).

Na era pré-antibiótico as unidades hospitalares apresentavam pacientes com pneumonia, meningite, bacteremia, sífilis, tuberculose, entre outras. Na actualidade as unidades hospitalares apresentam pacientes com cancro, doenças cardíacas, ou complicações de

diabetes ou hipertensão, como exemplo. Contudo, o aparecimento de estirpes multi-resistentes e o pequeno desenvolvimento de novos antibióticos, leva-nos a pensar que se não forem tomadas medias rigorosas e atempadas podemos não estar longe da era pós antibiótico em que poderão aparecer, como em 1930, unidades hospitalares de doenças infecciosas com situações não tratáveis (Cohen, 1992). Teremos de apostar cada vez mais numa medicina preventiva em desfavor da curativa para evitar os efeitos da pressão selectiva criada pela terapêutica, devendo evitar-se a disseminação da infecção, com medidas de controlo de infecção adequadas a cada situação.
A necessidade de uma vigilância cada vez mais apertada das modificações de padrões de resistência dos patogénicos humanos é uma realidade, uma vez que a disseminação de microorganismos resistentes a um número cada vez maior de antibióticos é um problema actual que tem de ser controlado, sob pena de vir a constituir um problema grave de Saúde Pública (Cassel, 1995).

O desenvolvimento de cefalosporinas de largo espectro, altamente estáveis às β-lactamases então conhecidas, no início dos anos oitenta, foi um grande avanço terapêutico. Contudo, em alguns anos apareceram várias β-lactamases de espectro alargado, principalmente em isolados nosocomiais de *Klebsiella pneumoniae*, condicionando resistência a essas cefalosporinas (Philippon, Arlet & Lagrange, 1994).

A resistência aos antibióticos a nível hospitalar, aumenta a morbilidade e a mortalidade devido à demora na instituição de terapêuticas adequadas para a infecção, principalmente quando a resistência surge relativamente à droga de escolha para uma infecção específica ou relativamente à terapêutica empírica adequada a determinada situação clínica (Cohen, 1992).

1.2 Infecções nosocomiais

O ambiente hospitalar e em particular as Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) são factores ambientais importantes para a emergência e persistência da resistência, bem como para a transmissão de agentes resistentes de doente para doente.

As infecções nosocomiais podem considerar-se indicadores da qualidade dos cuidados de saúde e portanto a vigilância deverá ser cada vez mais intensa.
A infecção urinária associada a cateterização constitui a infecção nosocomial mais comum e causa de bacteremia por bactérias Gram negativo e é crescentemente devida a agentes multi-resistentes. Outras situações também comuns, são a pneumonia nosocomial e infecção de ferida pós-operatória.
A incidência de infecções e resistência nas UCI é muito maior do que nas outras unidades hospitalares.

O controle de infecções nosocomiais tem grande impacto no que se refere à redução da mortalidade e morbilidade associadas à infecções adquiridas em ambiente hospitalar, bem como relativamente aos custos dos cuidados de Saúde (Wenzel, 1995).

Um estudo numa Unidade de Medicina Interna de um Hospital Espanhol refere que o tratamento das infecções nosocomiais pode ser responsável por 25% do total de tratamento antibiótico, sendo o tratamento não eficaz em 20% dos casos totais (Moròn, et al., 1994).

O problema dos agentes patogénicos multi-resistentes poderá ser agravado devido ao uso aumentado de antibióticos na profilaxia nos doentes imunossuprimidos ou em cuidados intensivos, bem como devido ao uso de antibióticos de largo espectro na comunidade. Será necessário um uso de antibióticos mais restrito e direccionado, uma sensibilização dos pacientes e dos prescritores para controlar o problema da resistência aos antibióticos. Será também necessário uma vigilância das tendências de alterações dos padrões de resistência, bem como uma maior atenção às técnicas de controle de infecção.

Kresken e Wiedemann em 1986 escreviam que não devia haver muitas bactérias resistentes a todos os antibióticos, mas esse optimismo deve ter sido ultrapassado nos dias de hoje (Gould, 1994).

1.3 Infecções na comunidade e suas relações com infecção hospitalar

Os dados epidemiológicos em resistência a antibióticos, baseiam-se em três tipos principais de fontes: vigilância, investigação de surtos e estudos prospectivos. A vigilância permite detectar tendências de evolução do fenómeno de resistência, enquanto a análise de surtos permite elucidar os factores associados com a emergência, persistência e transmissão das bactérias resistentes aos antibióticos.

Na análise de infecções humanas por microorganismos resistentes é conveniente considerar o hospital e a comunidade como ecossistemas separados. Uma vez que reflectem populações, pressões selectivas e reservatórios diferentes, que podem influenciar a emergência, persistência e transmissão de organismos resistentes aos antibióticos. Contudo, estes ecossistemas não são isolados um do outro e podem influenciar-se mutuamente (Cohen, 1992, Goldstein et al., 1995).

A flora bacteriana dos pacientes hospitalizados é constituída por estirpes bacterianas que transportaram consigo para o Hospital, que representam a flora da comunidade, mais as estirpes adquiridas no ambiente hospitalar que constituem a flora nosocomial (O'Brien et al., 1977).

A existência de estirpes resistentes aos antibióticos na comunidade saudável deve alertar-nos para o facto de as estirpes resistentes aos antibióticos não serem restritas ao ambiente hospitalar, pelo que devemos ser cuidadosos no uso dos antibióticos no ambulatório. O aparecimento de novas enzimas do tipo TEM é possível a partir da introdução das versões orais das cefalosporinas da terceira geração na prática corrente, uma vez que a disseminação da β-lactamase TEM-1 na flora comensal da população saudável constitui um reservatório de genes de resistência que podem dificultar a

terapêutica e funcionar como fonte de novas β-lactamases, de espectro alargado e de β-lactamases resistentes às combinações de β-lactâmicos com inibidores de β-lactamases, de acordo com a pressão selectiva que é imposta às estirpes da flora normal (Thomson, Shanahan & Amyes, 1994).

O mesmo fenómeno será possível para flora normal transportando genes de resistência da família SHV, principalmente em relação a *Klebsiella pneumoniae*, o que poderá justificar a prevalência de enzimas desta família neste agente patogénico, a nível hospitalar.

Sendo as β-lactamases SHV-1, TEM-1 e TEM-2 ubíquas, (TEM-1 e TEM-2 possivelmente devido ao facto de terem sido codificadas, pelo menos inicialmente, por elementos transposáveis da família Tn*A* que são amplamente distribuídos pelas bactérias Gram negativo, podendo ter sofrido posteriormente deleções que levaram à perda das funções de transposição (Heritage et al., 1992) e constituindo a matriz para o desenvolvimento de β-lactamases de espectro alargado, a disseminação da resistência às cefalosporinas de terceira geração e aztreonamo pode ser preocupante (Gould, 1994).

Os residentes em lares de terceira idade poderão constituir fonte de agentes de infecção hospitalar. Num estudo grego, cerca de 20% dos residentes do sexo masculino e 14% dos do sexo feminino apresentavam infecção do tracto urinário, em que 85% destes eram posteriormente hospitalizados (Gerolymatos, et al., 1994).

Os lares de terceira idade poderão constituir uma das fontes de agentes de infecções nosocomiais se considerar-mos a frequência com que algumas pessoas aí residentes são internadas nos hospitais para resolver situações agudas ou agudizações de situações crónicas. Normalmente estes residentes estão colonizados com potenciais patogénicos. Em estudos nos Estados Unidos é referido que 25 a 50% dos residentes nestas instituições apresentam colonização orofaríngea com organismos Gram negativo, mais frequentemente *Klebsiella* spp..

A colonização orofaríngea está relacionada com uma maior incidência de infecções e mortalidade aumentada.

Os agentes anti-microbianos constituem cerca de 40 % das drogas sistémicas usadas nos lares de terceira idade americanos, o que relacionado com as características próprias destas instituições relativamente à possibilidade de transmissão cruzada dos organismos, devido à

proximidade dos residentes, facilita o aparecimento de surtos infecciosos por bactérias resistentes (Nicolle, Strausbaugh & Garibaldi, 1996).

Os surtos infecciosos por estirpes resistentes, em lares de terceira idade, deverá alertar-nos para a importância deste tipo de ecossistema específico, para o desenvolvimento de resistência na comunidade (Rasmussen et al., 1993).

Os antibióticos não são como os outros medicamentos, pois apresentam uma perspectiva social, que tem a ver com o desenvolvimento e disseminação de resistência.

1.4 Klebsiella pneumoniae - um patogénico nosocomial

Klebsiella pneumoniae é um agente patogénico que a nível hospitalar, apresenta multi-resistência aos antibióticos. É um dos principais agentes de infecções nosocomiais, o que associado à multi-resistência apresentada, começa a levantar alguns problemas de terapêutica destas infecções.

Um estudo em UCI de vários hospitais franceses encontrou *Klebsiella pneumoniae* como o terceiro agente mais comum, de infecções nosocomiais, a seguir a *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* apresentando incidências de resistência de 38% à ceftazidima, de 35% à ciprofloxacina e 44% à tobramicina, o que vem atestar da importância deste agente patogénico a nível hospitalar (Scheftel et al., 1993).

Em Portugal, *Klebsiella pneumoniae* é considerada como um importante e frequente agente de infecção hospitalar (Costa et al., 1993) apresentando resistência de cerca de 30% às cefalosporinas de terceira geração e elevada resistência a gentamicina (70%) (Ribeiro et al., 1996).

Klebsiella pneumoniae é um dos agentes patogénicos sugeridos pelo relatório da Sociedade Americana de Microbiologia, como prioritário para a vigilância da resistência aos antibióticos (Cassel & Task Force on Antibiotic Resistance, 1995). É a principal espécie em que têm sido detectadas β-lactamases de espectro alargado, constituindo cerca de 75% das estirpes produtoras destas enzimas (Sirot, 1995). *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamases de espectro alargado e resistente a múltiplos antibióticos poderá

constituir no futuro o equivalente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes, das décadas anteriores (Jacoby, 1993).

Klebsiella pneumoniae é um dos principais agentes de infecções nosocomiais, principalmente em pacientes com características de maior debilidade como sejam os recém-nascidos, idosos, imunossuprimidos e doentes sujeitos a acções invasivas como cateterização vesical e outras. Este agente é responsável por infecções supurativas, bacteremia e septicemia.

Para este quadro, não será decerto de excluir, a importância dos seus mecanismos de virulência e de resistência aos agentes físicos e desinfectantes.

Entre os seus factores de virulência encontra-se o polissacarídeo capsular que protege o microrganismo contra o efeito bactericida do complemento e contra a ingestão e destruição pelos fagócitos profissionais. Outros factores de virulência potenciais serão o lipopolissacarídeo, e pili mediadores de aderência (Nassif et al., 1989).

Devido à formação de plasmídeos que codificam resistência aos antibióticos que também codificam factores de virulência, o uso de antibióticos favorece a disseminação destes factores e facilita a evolução das estirpes com virulência aumentada. A emergência de estirpes epidémicas que apresentam uma virulência aumentada, responsáveis por infecções nosocomiais em França, poderá ser devida à aquisição de plasmídeos que codificam factores de virulência como aerobactina, factor de adesão às células intestinais e resistência múltipla aos antibióticos (Darfeuille-Michaud, et al., 1992).

Como exemplo, poderemos considerar os surtos de infecções nosocomiais causadas por estirpe de *Klebsiella pneumoniae* resistente a múltiplos antibióticos, incluindo cefalosporinas de terceira geração, aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclinas. Estas estirpes eram produtoras de β-lactamases de espectro alargado e a resistência era codificada por plasmídeos conjugativos de tamanhos compreendidos entre os 85 e 185 Kb. As investigações epidemiológicas revelaram que o reservatório das estirpes de *Klebsiella pneumoniae* era o tracto gastrintestinal dos pacientes, pelo que as estirpes deveriam apresentar capacidade de aderir ao epitélio intestinal. A proteína de superfície, não fimbrial, responsável pela adesão das bactérias patogénicas às células intestinais, aparece associada a outros factores de virulência e marcadores de multi-resistência. O gene que codificava o factor de aderência às células intestinais e o gene que codificava a β-lactamase de espectro alargado, pertenciam a um mesmo

plasmídeo conjugativo de elevado peso molecular, bem como genes que codificavam aerobactina.

O facto destas estirpes multi-resistentes, apresentarem factores de virulência codificados pelo mesmo fragmento de restrição que a β-lactamase de espectro alargado, demonstra a vantagem que as estirpes que adquiram este plasmídeo podem apresentar relativamente a outras espécies e mesmo outras estirpes da mesma espécie que não apresentem esta característica.

O factor de aderência, ao facilitar a colonização intestinal, permite compreender que esta estirpe se mantenha em ambiente hospitalar, podendo causar surtos clonais (Darfeuille-Michaud, et al., 1992).

A privação de ferro é uma defesa do organismo contra infecções microbianas. A capacidade de um microorganismo adquirir ferro pode ser considerado um factor fundamental para a virulência. Para retirar ferro do ambiente, as bactérias sintetizam e segregam compostos que quelatam o ferro, os sideróforos (Kadurugamuwa, et al., 1988), pelo que a produção de aerobactina poderá considerar-se um factor de virulência. A quelatação de ferro deverá facilitar o crescimento destes agentes patogénicos extra celulares nos tecidos e durante a subsequente disseminação sistémica. A aerobactina sendo um sideróforo permite à bactéria, a quelatação de ferro facilitando o crescimento nos tecidos. A correlação entre a presença de aerobactina e de proteína receptora do complexo aerobactina-ferro em estirpes virulentas de tipo capsular K1 e K2 de *Klebsiella pneumoniae* veio confirmar a presença de factores de virulência além do polissacarídeo capsular. Nos isolados virulentos os genes codificadores de aerobactina foram detectados num plasmídeo de 180 Kb, podendo estar localizado numa estrutura tipo transposão (Nassif and Sansonetti, 1986).

Vernet e colaboradores (Vernet et al., 1992) não encontraram relação entre a presença de factor mucóide e aerobactina e a prevalência das estirpes causadoras de infecção nosocomial, considerando que não eram fundamentais para a disseminação da infecção, o que estará de acordo com o facto de que existam outros factores importantes para a disseminação da infecção, como sejam as quebras de medidas de controle de infecção e outros factores de virulência, como por exemplo o factor de aderência (Darfeuille-Michaud et al., 1992).

Os factores de virulência podem justificar a prevalência de um tipo de estirpe num surto conferindo-lhe vantagem competitiva e capacidade de colonização que justifiquem a sua manutenção ao longo do tempo.

1.4.1 Epidemiologia das infecções nosocomiais por *Klebsiella pneumoniae*

A infecção endémica por *Klebsiella* não pode explicar-se apenas pela auto-infecção dos doentes a partir da flora endógena intestinal, pelo que a infecção cruzada também deverá ter a sua contribuição para este fenómeno. As mãos do pessoal que presta cuidados de saúde podem constituir uma via de transmissão de infecções por *Klebsiella*, adquiridas em ambiente hospitalar, de epidemiologia não esclarecida. O estudo de Casewell e Phillips (Casewell & Phillips, 1977), veio provar que as mãos do pessoal de saúde podem constituir um veículo de estirpes de *Klebsiella* que podem manter-se viáveis por períodos superiores a 150 minutos. O facto de numa UCI ter sido encontrado 17% do pessoal de enfermagem com as mãos contaminadas com estirpes de *Klebsiella* spp. cujos serótipos eram relacionados com os que colonizavam ou infectavam os doentes no mesmo dia, veio alertar para a importância desta questão para o controle de infecção. Procedimentos habitualmente considerados "limpos" levaram à contaminação do pessoal de enfermagem que estava convencido que não estava contaminado e que apenas procederia a lavagem de mãos antes de passar a outro doente se fosse proceder a técnicas assépticas. Procedimentos como medição da tensão arterial e pulso, de doentes colonizados, poderiam ser suficientes para a contaminação do pessoal de enfermagem. Uma vez que os pacientes podem apresentar colonização da orofaringe, procedimentos como entubação endotraqueal podem colonizar o pessoal de enfermagem. Os pacientes poderão apresentar colonização cutânea das mãos o que justifica colonização do pessoal de enfermagem em procedimentos habitualmente considerados "limpos" e em que um contacto ligeiro com a pele do doente pode originar uma transferência de cerca de 100 a 1000 células viáveis de *Klebsiella*, para as mãos do pessoal de enfermagem. Este estudo alerta para a necessidade da sensibilização do pessoal de saúde para estas hipóteses de contaminação cruzada de doentes em UCI (Casewell and Philllips, 1977). A proporção de doentes colonizados baixou após a implementação de cuidados de lavagem de mãos entre tratamentos a doentes diferentes.

Um estudo posterior, sugere que a resistência de *Klebsiella* à desidratação é fundamental para a sobrevivência na pele das mãos e que será uma característica importante das estirpes epidémicas. Caswell e Desai demonstraram que a capacidade de sobrevivência aumentada na pele, de estirpes de *Klebsiella* multi-resistentes não é mediada por plasmídeos mas contribui para a transmissão, durante os surtos hospitalares (Caswell & Desai, 1983).
No surto estudado por Gerding, o facto de haver um predomínio de um serótipo, sugeria que a infecção cruzada, provavelmente pelo pessoal hospitalar, seria o principal modo de disseminação (Gerding, et al., 1979).
A necessidade de uma observância estrita de medidas de controle de infecção para evitar surtos de infecções nosocomiais é bem exemplificada pelo caso ocorrido numa unidade de Neonatologia de um hospital Sul Africano em que foi detectado um surto de infecção por *Klebsiella pneumoniae* multi-resistente afectando nove recém-nascidos. A mesma estirpe foi encontrada colonizando o nariz e as mãos do médico da unidade, as mãos de uma enfermeira, as mãos da mãe de um dos bébés e em nove amostras ambientais, entre elas termómetros, atestando da importância da sobrevivência destas estirpes para a infecção cruzada. Foi provado que na altura do surto a observância das regras de controle de infecção não estavam a ser implementadas como deveriam, tendo o surto sido erradicado rapidamente através do cumprimento estrito de normas de controle de infecção instituídas (Coovadia et al., 1992).

Um dos maiores riscos para que um paciente seja colonizado ou infectado com bactérias multi-resistentes é o ser admitido numa Unidade Hospitalar em que exista uma dessas estirpes e ser vítima de uma quebra dos procedimentos de controle de infecção. Uma vez que estes organismos são ubíquos no ambiente hospitalar em determinadas unidades, especialmente nas UCI, depois de aparecerem a sua erradicação é difícil. É necessária uma rigorosa observância das técnicas de controle de infecção para evitar transferência de paciente para paciente, pelo que é necessário uma sensibilização do pessoal de saúde para estas questões (Gould, 1994).
Vinte a trinta por cento dos pacientes numa UCI, adquirem pelo menos uma infecção nosocomial, estando este facto relacionado com a gravidade da doença de base, exposição a procedimentos invasivos, drogas imunossupressoras, quebra das regras de controle de infecção e uso de antibióticos.

A maioria dos doentes nas UCI adquire infecção por patogénicos nosocomiais a partir das mãos do pessoal do hospital, dos outros pacientes, de fontes ambientais contaminadas e de equipamento invasivo contaminado. Os pacientes previamente colonizados podem transportar os microorganismos para a UCI, daí que os métodos de controle de infecção devam interromper as vias de transmissão, reduzindo a colonização e eliminando os reservatórios dos agentes patogénicos nosocomiais. Estas medidas deverão envolver programas educacionais de controle de infecção, precauções de barreira, isolamento dos doentes infectados, controle da medicação e métodos de monitorização adequados (Craven, 1992).

O intestino é um reservatório de microrganismos potencialmente patogénicos, causadores de infecções nosocomiais, daí que em alguns casos, as estirpes possam ser adquiridas por contaminação cruzada, a partir das estirpes que podem estar presentes antes da admissão hospitalar, colonizando intestinalmente os pacientes. Contudo, a flora normal constitui uma protecção contra a colonização por microorganismos exógenos e limita a concentração de microorganismos potencialmente patogénicos endógenos.

A flora intestinal endógena é reconhecida como fonte maior de agentes patogénicos nas infecções nosocomiais e o intestino é considerado como o local de entrada destes agentes patogénicos. A translocação bacteriana, processo em que os agentes bacterianos atravessam a mucosa intestinal invadindo os tecidos, orgãos e sangue, é facilitada por factores como a alteração do equilíbrio ecológico da flora intestinal normal, levando a um crescimento superior ao normal. Outros factores incluem a destruição física da barreira mucosa intestinal, e imunidade comprometida. Estes factores são comuns a pessoas gravemente doentes, pelo que poderão ter papel importante nas infecções adquiridas em ambiente hospitalar (Beloborodova, et al., 1994).

A descontaminação selectiva consiste na inibição da flora potencialmente patogénica mas não da flora que confere resistência à colonização. Os microorganismos potencialmente patogénicos são eliminados e a flora resistente não cresce, pois a flora que impede a colonização foi poupada (Vollaard and Clasener, 1994).

A descontaminação intestinal selectiva com antibióticos orais não absorvíveis, pode ajudar a controlar surtos de colonização intestinal e infecção com bacilos Gram negativo multi-resistentes, em UCI, mas não deverá ser recomendada como medida de rotina para a

prevenção de infecções nosocomiais endémicas. A descontaminação intestinal poderá ser combinada com descontaminação orofaríngea e com profilaxia antibiótica sistémica, contudo esta opção poderá ser contestada devido à hipótese de infecção com microorganismos resistentes (Brun-Buisson et al., 1989).
As quebras de observância dos procedimentos de controle de infecção têm sido responsáveis por vários surtos, estando contudo envolvidos outros factores de risco na aquisição de infecção nosocomial, tais como admissão quando colonizado com um agente resistente, exposição a antibióticos, infecção cruzada, ventilação assistida e cateterização.

A flora faríngea de doentes hospitalizados por longos períodos, parece alterar-se ao longo do tempo de internamento, estando relacionada com o tratamento antibiótico. Sendo referido um aumento de enterobacteriáceas, em 39% dos casos, na segunda semana de internamento, tendo sido isolada uma estirpe de *Klebsiella* resistente a tobramicina e aztreonamo provocando colonização orofaríngea (Loupa, et al., 1994).

A resistência à desidratação e aos antissépticos e desinfectantes poderá ter importância na epidemiologia hospitalar destas infecções. Os agentes multi-resistentes colonizam as soluções de antissépticos e desinfectantes podendo haver relação entre a resistência aos antibióticos e a esses agentes, como foi detectado em plasmídeos de resistência aos antibióticos que também codificavam factores que conferiam resistência a alguns tipos de desinfectantes e antissépticos (Jacoby and Sutton, 1991, Ascenzi, 1996). O aparecimento de genes que codificam resistência a antissépticos e desinfectantes em integrões, alerta-nos para a importância da disseminação destes factores de resistência.

1.5 Resistência aos β-lactâmicos

1.5.1 Evolução da resistência aos β-lactâmicos

As estratégias de adaptação dos microrganismos passam por evoluções quantitativas e qualitativas.

As β-lactamases poderão ter sido originadas a partir da excreção de PBPs de baixo peso molecular por bactérias expostas a β-lactâmicos em que estas PBPs solúveis em água possam ter-se convertido em enzimas capazes de degradar os β-lactâmicos. As β-lactamases não apresentam actividade peptidásica, portanto não interferem com o metabolismo do peptidoglicano (Ghuysen, 1991).

O primeiro passo de resistência aos β-lactâmicos deverá ter sido devido a esta evolução de peptidases da parede celular, como poderá ser especulado a partir da homologia da sequência nucleotídica das β-lactamases que apresentam no local activo um resíduo de serina e as PBPs (proteínas de ligação da penicilina). Estas enzimas deverão ter adquirido capacidade de serem transportadas para o espaço periplasmático dos Gram negativo podendo ter havido um passo em que tenha havido um aumento da produção. Outra fase da evolução refere-se à mobilização dos genes que codificam estas enzimas através de plasmídeos e transposões.

Um exemplo de evolução quantitativa é o da resistência às associações de β-lactâmicos com inibidores de β-lactamases, em que o mecanismo mais frequente consiste na hiperprodução de β-lactamase não modificada, normalmente como consequência da presença de múltiplas cópias do plasmídeo ou alterações no promotor, ou modificações das proteínas da membrana externa, limitando a entrada da combinação e reduzindo a quantidade de molécula activa que poderá ser degradada pela β-lactamase existente, bem como a selecção de hiperprodutores de β-lactamase cromossómica (Siu et al., 1997, Stapleton et al., 1995)

A estratégia qualitativa, baseia-se na alteração da actividade da enzima ancestral, de forma a torná-la mais eficaz na hidrólise de novas moléculas através da mutação de um número reduzido de nucleótidos que condiciona alterações dos aminoácidos fundamentais para

alterações da configuração tridimensional do local activo que permitem a actuação em novas moléculas.

Relativamente às alterações que originam enzimas resistentes às associações de β-lactâmicos com inibidores de β-lactamases, esta parece dever-se a uma redução da afinidade da enzima (Baquero & Blázquez, 1993).

As β-lactamases plasmídicas, deverão ter tido na sua origem β-lactamases cromossómicas, embora em alguns casos seja difícil descobrir os organismos ancestrais (Livermore, 1995).

1.5.2 Factores que influenciam o nível de resistência

As β-lactamases conferem resistência às penicilinas cefalosporinas e agentes relacionados devido à capacidade de se ligarem e hidrolisarem esses fármacos antes de atingirem as PBPs que estão localizadas na superfície da membrana citoplasmática. Nas bactérias Gram negativo as β-lactamases habitualmente têm uma localização periplasmática que lhes permite interceptar as moléculas de β-lactâmico antes de atingirem o alvo (Du Bois, Marriot & Amyes, 1995).

As cefalosporinas, como todos os β-lactâmicos, necessitam de atingir o alvo de acção, PBPs, de forma a inibirem as enzimas da parede celular, parando o crescimento das células, fenómeno que constitui o primeiro passo da acção bactericida destes agentes.

Os alvos enzimáticos dos antibióticos β-lactâmicos são as D-alanil-D-alanina transpeptidases que catalizam o último passo da ligação cruzada da parede de peptidoglicano da célula bacteriana. A eficácia dos β-lactâmicos na inibição das peptidases é devida à formação de um intermediário acil-enzima estável, apresentando uma velocidade de desacilação lenta, relativamente à velocidade de crescimento do microorganismo, através de um resíduo de serina do local activo. Este fenómeno é semelhante ao que ocorre na acção das β-lactamases, sendo diferente a estabilidade deste intermediário acil-enzima havendo uma desacilação rápida, no caso das β-lactamases, originando uma molécula de antibiótico inactivada pela hidrólise do anel β-lactâmico, ponto através do qual a molécula se liga à enzima (Kuzin et al., 1995).

Nas bactérias Gram negativo estes agentes têm de difundir através das porinas da membrana externa de acordo com a sua carga , peso molecular e hidrofobicidade. Uma vez no espaço periplasmático a sua capacidade de atingirem o alvo de acção vai depender do número de moléculas presentes neste espaço e da presença ou não de β-lactamases, do seu tipo e da sua quantidade. Desta forma, a resistência a estes agentes nos Gram negativo será devida essencialmente à presença de enzimas eficazes para a hidrólise do composto em questão, por vezes associada a alterações da permeabilidade de membrana externa (Gutmann, 1993).

Nos Gram negativo a β-lactamase protege a célula individualmente e não a cultura bacteriana. Se a captação de droga pela célula é muito lenta, mesmo uma baixa concentração de β-lactamase no espaço periplasmático poderá evitar que esta atinja uma dose tóxica.

As CMI estão relacionadas com vários factores que afectam a sensibilidade da estirpe e que se podem considerar relacionados, com algumas simplificações, através do seguinte modelo matemático:

$$CMI = I_p\{1+V_{max}/C(K_m+I_p)\}$$

I_p - concentração externa do antibiótico necessária para inactivar as PBPs

C - coeficiente de difusão do antibiótico através da membrana externa

V_{max} - velocidade de hidrólise enzimática

K_m - afinidade da enzima para o antibiótico

que considera a inter-relação de factores tais como a permeabilidade de membrana que condiciona a difusão da droga através da membrana externa, coeficiente de difusão da droga através da membrana externa e a cinética enzimática (Vmax Km).

A CMI corresponderá à menor concentração externa da droga que origina uma concentração periplasmática capaz de inactivar as PBPs. Considerando que a difusão transmembranar segue a lei de Fick e que a cinética enzimática segue a lei de Michaelis-Menten.

Esta equação integra os efeitos devidos às características da enzima e características da estirpe e do antibiótico, como seja a sua capacidade de atravessar a membrana externa em função da permeabilidade que esta apresenta que é condicionada pelo coeficiente de difusão. O coeficiente de difusão e a concentração externa de antibiótico, vão condicionar a concentração periplasmática deste que é a que interage com a enzima existente neste espaço, condicionando a concentração de antibiótico que vai actuar nas PBPs, que constituem o alvo de acção (Livermore, 1995).

Portanto a concentração periplasmática da droga é determinada pela interacção entre permeabilidade e β-lactamase, condicionando o destino da célula.

Uma baixa afinidade da β-lactamase para o antibiótico, elevado Km, e uma permeação da célula rápida, elevado coeficiente de difusão (C), reduzem a capacidade da β-lactamase provocar resistência à droga (Livermore, 1993).

A resposta à questão de qual será o nível de resistência que condiciona falência clínica, nem sempre é fácil, principalmente quando as CMI são dependentes do inóculo. As estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado podem apresentar baixo nível de resistência com CMI abaixo dos "break points" indicados pelo NCCLS, contudo funcionam como resistentes *in vivo* (Rice et al., 1991). O critério seguido pelo NCCLS, que define a resistência relativamente à concentração de droga atingida *in vivo* poderá necessitar de uma adaptação para o caso particular das estirpes produtoras, de β-lactamases de espectro alargado, de resto já reconhecido pelo próprio organismo que tem um grupo a trabalhar neste sentido. Por vezes as CMI destas estirpes apresentam um aumento de 32 a 128 vezes em relação às estirpes não produtoras apesar de não atingirem os "break points", sendo contudo uma redução de susceptibilidade muito intensa que não deverá ser ignorada (Livermore, 1995), este facto demonstra que cada vez mais é necessária uma vigilância das alterações dos padrões de comportamento, mesmo quando subtis, para prever a evolução da resistência aos antibióticos.

As CMI relativas a determinados β-lactâmicos, condicionadas pela produção de determinados tipos de β-lactamase, poderão variar consideravelmente entre estirpes, em função da quantidade da enzima produzida e das diferentes características de permeabilidade (Sanders, 1992).

A perda de porinas como causa de resistência tem sido demonstrada em *Klebsiella pneumoniae* (Sanders et al., 1984, Gutmann, et al., 1985, Gutmann, et al., 1989, Vatapoulos, et al., 1990).

1.5.3 β-lactamases de espectro alargado

A lista das β-lactamases de espectro alargado típicas, ou seja β-lactamases derivadas de TEM ou SHV capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração e ou aztreonamo e inactivadas por inibidores de β-lactamases (Philippon, Labia & Jacoby, 1989) foi acrescida a partir de 1990, por outros tipos de β-lactamases de largo espectro, não derivadas da família TEM ou SHV e outras que apresentam um espectro ainda mais ampliado (Jacoby and Medeiros, 1991) como é o caso das cefalosporinases plasmídicas do tipo Amp C e das carbapenemases plasmídicas.

Paralelamente a esta evolução, observou-se o aparecimento de β-lactamases resistentes às associações de penicilinas com inibidores de β-lactamases, mas de espectro mais reduzido devidas a mutações "para trás" condicionadas pela pressão selectiva criada pela utilização de associações de antibióticos β-lactâmicos com inibidores de β-lactamases.

A característica comum de estas β-lactamases serem codificadas por genes habitualmente contidos em elementos genéticos móveis, plasmídeos e transposões, que normalmente transportam genes de resistência a várias famílias de antibióticos, por exemplo enzimas inactivadoras de aminoglicosídeos, condiciona o aparecimento de estirpes multi-resistentes. A selecção continuada de estirpes, vai provocando uma acumulação de características que lhes conferem vantagem competitiva, como seja a produção de várias β-lactamases. Assim a produção de TEM-1 associada a β-lactamase de espectro alargado pode reduzir a eficácia da acção dos inibidores nestas estirpes, reduzindo as opções terapêuticas.

Observa-se ainda, uma acumulação de mecanismos de resistência que actuam sinergicamente, de forma a originar estirpes resistentes a um número cada vez maior de antibióticos, reduzindo de forma significativa as opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por estes agentes.

Preocupante é o aparecimento de estirpes que apresentam acumulação de vários tipos de β-lactamases e de mecanismos de resistência, como sejam as responsáveis por um surto nos Estados Unidos da América em que algumas estirpes apresentam associação de β-lactamases de espectro alargado clássicas e β-lactamases plasmídicas tipo Amp C e alterações de permeabilidade de membrana que condicionam resistência a todos os antibióticos comercializados, incluindo fluoroquinolonas e imipenemo (Bradford et al., 1997). Tal facto mostra que poderemos estar próximos da era pós-antibiótica e evidencia a necessidade do aparecimento de terapêuticas alternativas.

1.5.3.1 Classificação das β-lactamases de espectro alargado

As β-lactamases têm sido alvo de variadas tentativas de sistematização da sua classificação, sendo actualmente aceite como mais relevante a classificação de Bush, Jacoby e Medeiros que relaciona a função com a estrutura molecular (Bush, Jacoby & Medeiros, 1995).

β-lactamases de espectro alargado, são tipicamente, β-lactamases derivadas de TEM-1, TEM-2 ou SHV-1 por mutação nos genes das suas ancestrais em um número reduzido de aminoácidos que condicionam resistência a cefalosporinas de terceira geração e/ou aztreonamo e são sensíveis à inibição pelos inibidores de β-lactamases. Com o aparecimento de outras enzimas capazes de degradar os β-lactâmicos anteriormente considerados resistentes, não derivadas destas duas famílias, houve necessidade de distinguir quatro tipos principais de enzimas de espectro alargado, uma vez que já haviam sido referidas as enzimas de largo espectro que degradavam penicilinas e cefalosporinas da primeira geração.

Para clarificação dos conceitos, iremos referenciar por β-lactamases de espectro alargado típicas, as β-lactamases derivadas das famílias TEM e SHV por mutação conferindo resistência ou redução da susceptibilidade aos oxiimino-β-lactâmicos e que são inibidas pelos inibidores das β-lactamases, tipicamente pelo ácido clavulânico.

As β-lactamases que apresentem características semelhantes mas não sejam consideradas derivadas destas duas famílias serão referenciadas por, β-lactamases de espectro alargado

não derivadas de TEM ou SHV e têm aparecido em outras espécies que não *Klebsiella*, tais como *Escherichia coli, Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Philippon, Arlet & Lagrange, 1994). Nesta categoria deveremos ainda incluir as β-lactamases cromossómicas de *Klebsiella oxytoca.*

Um outro grupo actualmente já representativo, pelo número de β-lactamases que têm sido descritas nos últimos tempos, e pela sua importância clínica, uma vez que apresentam um espectro ainda mais alargado, conferindo resistência ou redução de susceptibilidade a cefalosporinas de terceira geração e cefamicinas, derivados 7-α-metoxi, e resistência à inibição pelo ácido clavulânico, será referenciado pelo grupo de β-lactamases plasmídicas tipo Amp C. Actualmente, poderemos agrupar as β-lactamases plasmídicas tipo Amp C, de acordo com a localização do gene ancestral que parece ter-lhe dado origem, de acordo com a análise de homologia das sequências nucleotídicas que codificam a β-lactamase plasmídica e a β-lactamase cromossómica correspondente, presente em espécies diferentes (Bradford et al., 1997). Assim, poderemos considerar como derivadas da cefalosporinase cromossómica de *Enterobacter cloacae* as enzimas MIR-1 (Papanicolaou, Medeiros & Jacoby, 1990) e ACT-1 (Bradford et al., 1997), derivadas da cefalosporinase cromossómica de *Citrobacter freundii* as enzimas BIL-1 (Payne, Woodford & Amyes, 1992), CMY-2 (Bauernfeind et al., 1996), LAT-1 (Tzouvelekis et al., 1993, Tzouvelekis, Tzelepi & Mentis, 1994) e LAT-2 (Gazouli et al., 1996) e como derivadas de cefalosporinase cromossómica de *Pseudomonas aeruginosa* as enzimas CMY-1 (Bauernfeind, Chong & Schweighart, 1989), FOX-1 (Leiza et al., 1994) e MOX-1 (Hori et al., 1993).

Outro grupo preocupante de enzimas de espectro alargado são as carbapenemases, de que felizmente ainda existem poucas referências (Livermore, 1993, Rasmussen & Bush, 1997). O seu espectro de acção envolve oxiimino cefalosporinas, cefamicinas e carbapenemos e não são inibidas pelos inibidores normais das β-lactamases como ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam, sendo contudo inibidas, *in vitro,* por EDTA, uma vez que são metalo-β-lactamases.

Existem ainda enzimas capazes de degradar o imipenemo, mas que são β-lactamases que apresentam no local activo serina, ao contrário das carbapenemases típicas e são inibidas pelo ácido clavulânico, são pouco frequentes, mas alertam para a hipótese da disseminação

da resistência ao imipenemo se a pressão selectiva aumentar (Rasmussen et al., 1996, Bush, Jacoby & Medeiros, 1995, Rasmussen & Bush, 1997).

A família das β-lactamases de espectro alargado típicas, é a mais representativa (Bush, Jacoby & Medeiros, 1995), apresentando 12 enzimas da família SHV (Nüesch-Inderbinen, Kayser & Hächler, 1997) e 46 enzimas da família TEM (Chanal-Claris et al., 1997).

Relativamente às enzimas da família TEM, existe actualmente um grupo considerável destas enzimas que apesar de terem adoptado a numeração sequencial relativamente às enzimas da família TEM, não são consideradas β-lactamases de espectro alargado, são as β-lactamases resistentes às associações de amoxicilina com inibidores de β-lactamases, ou IRT (Inhibitor Resistant TEM) que são enzimas que não apresentam espectro alargado, havendo autores que sugerem que tenham surgido a partir de "mutações para trás", que confeririam condições para a resistência aos inibidores de β-lactamases, o que está de acordo com a homologia apresentada pelas sequências nucleotídicas. Daí que nesta numeração sequencial de β-lactamases derivadas de TEM tenhamos de referir as β-lactamases TEM-30 a 41 (Bush, Jacoby & Medeiros, 1995, Stapleton et al., 1995) e a TEM-45 (IRT-14) (Caniça et al., 1997) como não sendo β-lactamases de espectro alargado típicas.

Também em relação à família SHV começam a aparecer as primeiras referências de enzimas resistentes às associações de β-lactâmico com inibidores de β-lactamases, caso de SHV-10 (Prinarakis et al., 1997).

A pressão selectiva criada pela utilização da associação de uma penicilina e um inibidor de β-lactamase funcionará contra as β-lactamases de espectro alargado, favorecendo mutações no sentido de enzimas mais inócuas, como parece ter acontecido com as IRT (Du Bois, Marriot & Amyes, 1995).

Com a aplicação da sequenciação de genes codificadores, foram descritas novas enzimas que apresentam características semelhantes, diferindo na sua sequência nucleotídica, parecendo esta ser uma tendência que se irá manter .

Cada gene poderá evoluir de acordo com as condições específicas que lhe são impostas, podendo haver alterações de sequência que sejam irrelevantes, enquanto outras poderão ser fundamentais para a evolução para enzimas mais activas e de espectro mais alargado.

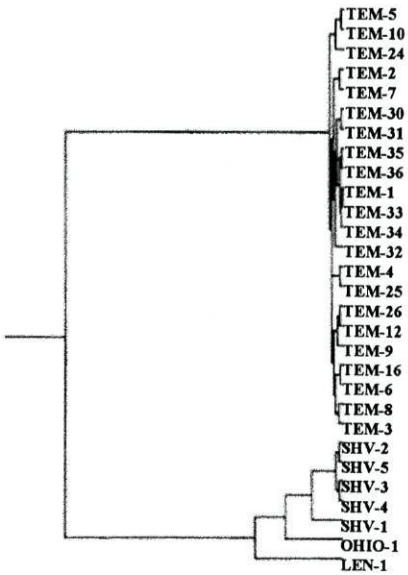


Figura 1 - Homologia das β-lactamases das famílias TEM e SHV (adaptado de Bush, Jacoby & Medeiros, 1995)

1.5.3.2 Relação estrutura função das β-lactamases de espectro alargado da família SHV

As β-lactamases catalizam a abertura hidrolítica do anel β-lactâmico, convertendo o antibiótico num produto inócuo, incapaz de interferir com a síntese da parede celular através de um intermediário covalente acil-enzima (Sousa e Prista, 1988, Fisher et al., 1980).

As β-lactamases da classe A apresentam em comum um domínio helicoidal com cinco bandas antiparalelas circundando a hélice α. O resíduo do local activo Ser-70 apresenta-se no terminal N da hélice α, H2. A estrutura de uma β-lactamase que ainda não foi esatbelecida experimentalmente pode ser estudada usando como modelo a estrutura de

qualquer uma das homólogas uma vez que apresentam um enrolamento semelhante. Considerando que as sequências das β-lactamases da família TEM e SHV apresentam 68% de homologia e uma vez que existem estruturas tridimensionais que permitem interpretar as relações estrutura função das enzimas mutantes da família TEM, iremos usá-las como modelo para as enzimas da família SHV, considerando que a estrutura do local activo se mantem nestas famílias da classe A. Contudo, a estrutura tridimensional dos locais catalíticos poderá apresentar algumas diferenças que justifiquem comportamentos pontuais diferentes em relação a estas duas famílias de β-lactamases de espectro alargado (Knox, 1995, Huletsky, Knox & Levesque, 1993).

Nas β-lactamases do tipo TEM, é fundamental a alteração do resíduo de aminoácido da posição 164 por serina ou histidina, que poderá ser complementado por alterações da posição 240 para lisina. Alterações da posição 238 para serina foram conotadas com aumento da actividade relativamente a cefotaxima.
As alterações verificadas situam-se em locais próximos do local activo da enzima, resultando numa melhor afinidade da enzima modificada, para os oxiimino β-lactâmicos.

A hidrólise do anel β-lactâmico é levada a cabo pelo resíduo de serina da posição 70 do local activo. Este é um resíduo que se mantém nas β-lactamases de serina. O grupo amina do resíduo de lisina da posição 73 está envolvido na ligação de hidrogénio no local activo. A proximidade das cadeias laterais de Ser-70 e Lys-73, ligadas por pontes de hidrogénio, indicam que o resíduo de Lys-73 exerce um papel fundamental no processo de acilação, funcionando como base para a activação de Ser-70 (figura 2) (Matagne & Frére, 1995).

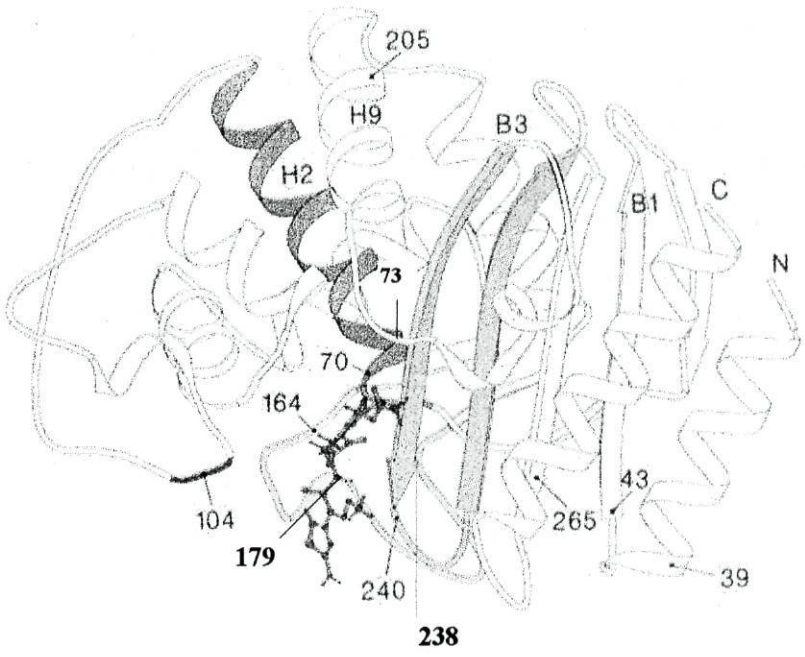


Figura 2 - Estrutura terciária de β-lactamase da classe A, apresentando cefotaxima no local activo (adaptado de Knox, 1995)

As β-lactamases mutantes, apresentam reorganizações subtis do local activo resultando numa posição diferente do substrato na cavidade catalítica. As cadeias laterais nesta porção da enzima podem desenvolver um papel estrutural, indirecto ou um papel directo de ligação ao substrato. Os resíduos da posição 238 podem distorcer a banda B3 de forma a que o β-lactâmico se mantenha numa posição mais favorável. Resíduos que sejam potenciais dadores de pontes de hidrogénio (serina ou cisteína) ou que apresentem propriedades electrostáticas adequadas, asseguram uma ligação mais estável e uma posição no local activo mais favorável à hidrólise do β-lactâmico ligado (Matagne & Frère, 1995).

Na família SHV, a substituição por serina na posição 238, de acordo com a numeração de Ambler, tal como nas da família TEM, aumenta a actividade frente a cefotaxima (figura 3) (Labia et al., 1988, Sougakoff et al., 1988). A alteração da posição 240 para lisina está relacionada com o aumento de acção em ceftazidima. As duas alterações da posição 238 e

240 são necessárias para a acção em ceftazidima enquanto a alteração em 238 é suficiente para a acção em cefotaxima o que está relacionado com o facto de SHV-2 condicionar redução da susceptibilidade à cefotaxima sem afectar a ceftazidima, como sendo um passo intermédio para a evolução para uma maior resistência à ceftazidima como por exemplo em SHV-5, em que se acumulam duas mutações com acções sinérgicas (Huletsky, Knox & Levesque, 1993). A cadeia lateral de lisina-240 poderá formar ligações electrostáticas com o ácido carboxílico dos oxiimino-β-lactâmicos permitindo a hidrólise de ceftazidima e aztreonamo.

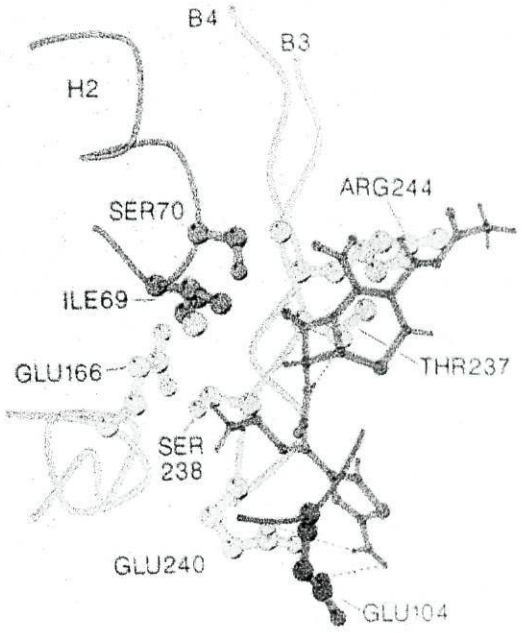


Figura 3 - Ligação de cefotaxima ao local activo da enzima (Knox, 1995)

Este fenómeno pode ser representado por estruturas tridimensionais do local activo da enzima justificando a necessidade da associação das mutações de serina 238 e lisina 240 (figura 4) para a actuação em ceftazidima enquanto a cefotaxima necessita apenas da alteração de serina 238 (Knox, 1995, Huletsky, Knox & Levesque, 1993, Labia et al., 1988).

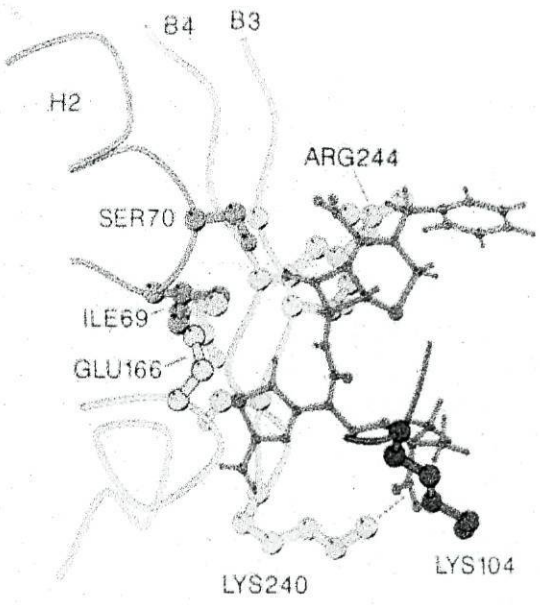


Figura 4 - Ligação de ceftazidima ao local activo (Knox, 1995)

Alterações da posição Leu-35 para Gln, verificadas na variante de SHV-2, SHV-2a (Podbielsky et al., 1991a) e nas enzimas desta família, mais recentemente descritas, SHV-11 e SHV-12 (Nüesch-Inderbinen, Kayser & Hächler, 1997), são partilhadas pela enzima cromossómica de *Klebsiella pneumoniae*, LEN-1, sugerindo uma evolução separada de SHV-2 e SHV-2a.

Esta mutação tem influência no nível de resistência condicionado pela enzima (Nüesch-Inderbinen, Hächler & Kayser, 1995). Contudo, o nível de resistência pode ser condicionado pelo promotor, podendo mascarar o efeito da mutação pontual, demonstrando a importância dos mecanismos de regulação (Podbielsky et al., 1991, Nüesch-Inderbinen, Hächler & Kayser, 1995).

A variante de SHV-1, SHV-11 não apresenta espectro alargado, enquanto SHV-12 apresentando as mutações típicas nas posições 238 e 240, mantém o alargamento de espectro verificado nas outras enzimas desta família.

Em SHV-7, as alterações na posição 8 parecem não influenciar a hidrólise. O resíduo 43 de arginina situa-se no início da banda B1 da β-lactamase e a cadeia lateral projecta-se para trás da banda β funcionando como dador de duas ligações de hidrogénio para a cadeia lateral de Glu-64 e para a cadeia principal CO do resíduo 65. A função deste resíduo não é

clara e o resultado da alteração de arginina para serina poderá ser importante para a manutenção da posição do resíduo de Ser-70 do local activo. Mantêm-se as alterações nas posições 238 e 240 características das enzimas de espectro alargado desta família.

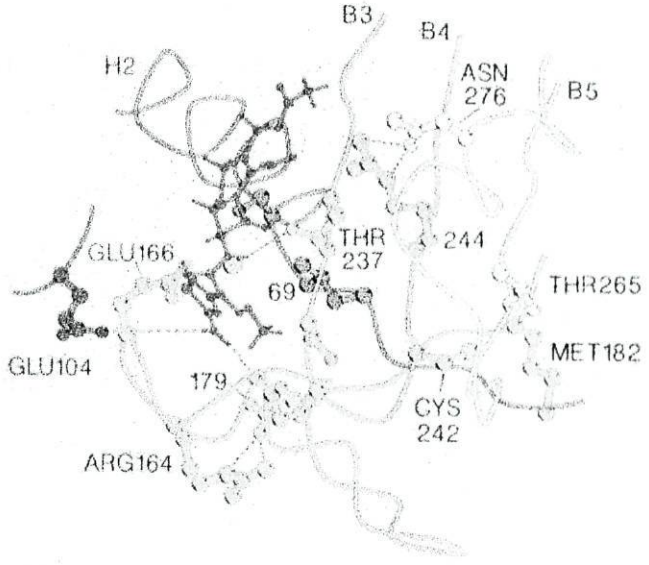


Figura 5 - Ligação entre os resíduos Arg-164 e Asp-179 definindo a "loop" Ω (com cefotaxima no local activo) (Knox, 1995)

Alterações no resíduo 179 de Asp para Asn, presentes em SHV-8, expandem o local de ligação, permitindo a hidrólise de ceftazidima, devido ao enfraquecimento da ligação entre os resíduos 179 e 164 (figura 5) que ligam os terminais da "loop" Ω da β-lactamase, desestabilizando-a e expandindo o local de ligação (Rasheed et al., 1997).

O resíduo Asp- 179 deverá apresentar uma função estrutural ligando-se a Arg-164, para fechar a "loop" Ω, através de interações electrostáticas e ligações de hidrogénio, de acordo com o descrito para enzimas do tipo TEM (Knox, 1995). O enfraquecimento da ligação entre os resíduos 164 e 179 e o movimento aumentado da "loop" expandirá o local de ligação e destabiliza Glu-166 e a molécula de água que lhe está ligada.

Este facto parece-nos relevante, na medida em que a mutação em um único aminoácido condiciona o alargamento do espectro, estando ausentes as mutações típicas das enzimas de espectro alargado desta família nas posições 238 e 240, sendo a primeira referência a resistência devida a desestabilização da "loop" Ω, em enzimas do tipo SHV.

de espectro alargado desta família nas posições 238 e 240, sendo a primeira referência a resistência devida a desestabilização da "loop" Ω, em enzimas do tipo SHV.

Em SHV-9 (Prinarakis et al., 1997), inicialmente referida como SHV-5a (Prinarakis et al., 1996), a questão mais relevante parece ser o facto de ter sido originada a partir de SHV-1 e não de SHV-2 como as restantes β-lactamases de espectro alargado desta família, como parece indicar a presença dos aminoácidos das posições 192 e 193 iguais aos de SHV-1 (na sequência descrita por Mercier & Levesque, 1990). Mantêm-se as alterações nas posições 238 e 240 necessárias ao largo espectro que apresenta. Verifica-se uma deleção na posição Gly-54 e uma alteração aminoacídica na posição 140 de Ala para Arg que parecem não apresentar repercussões fenotípicas. As quatro alterações verificadas em SHV-9 relativamente a SHV-5, não influenciam a afinidade ou a velociadade máxima, originando CMI semelhantes em condições isogénicas e as enzimas são expressas em quantidades semelhantes, pelo que foram consideradas funcionalmente idênticas.
Desta forma, enzimas funcionalmente indistinguíveis, SHV-5 e SHV-9, parecem ter evoluído de forma independente a partir de ancestrais diferentes. Portanto a caracterização molecular das β-lactamases de espectro alargado pode permitir elucidar a epidemiologia dos determinantes de resistência (Prinarakis et al., 1996).

Alterações do resíduo 130 de serina para glicina, presentes em SHV-10, condicionam a redução da actividade da enzima face aos β-lactâmicos de largo espectro e resistência aos inibidores de β-lactamases, em enzimas derivadas de SHV-9, uma variante de SHV-5 (Prinarakis et al., 1997). Este fenómeno parece dever-se ao facto de este resíduo ser importante para a ligação e hidrólise do β-lactâmico, mantendo a geometria do local activo através da ligação de hidrogénio com o resíduo de lisina da posição 234. A cadeia lateral da serina-130 está envolvida no reconhecimento do substrato, interagindo com os carboxilatos de penicilinas, cefalosporinas e inibidores de β-lactamases. Apresenta ainda um efeito importante no mecanismo de hidrólise através da formação de uma ligação de hidrogénio com a amina, no curso da acilação pelo resíduo de serina-70, ou facilitando a transferência de protão de serina-70 para a amina do β-lactâmico com a ajuda de lisina-73 (Prinarakis et al., 1997).
Esta constitui a primeira referência de enzimas da família SHV resistentes à associção de β-lactâmico com inbidores de β-latamases, podendo constituir o início de uma nova família

de enzimas refractárias à inibição, tal como verificado para as IRT. Demonstrando a importância da pressão selectiva na evolução da resistência.

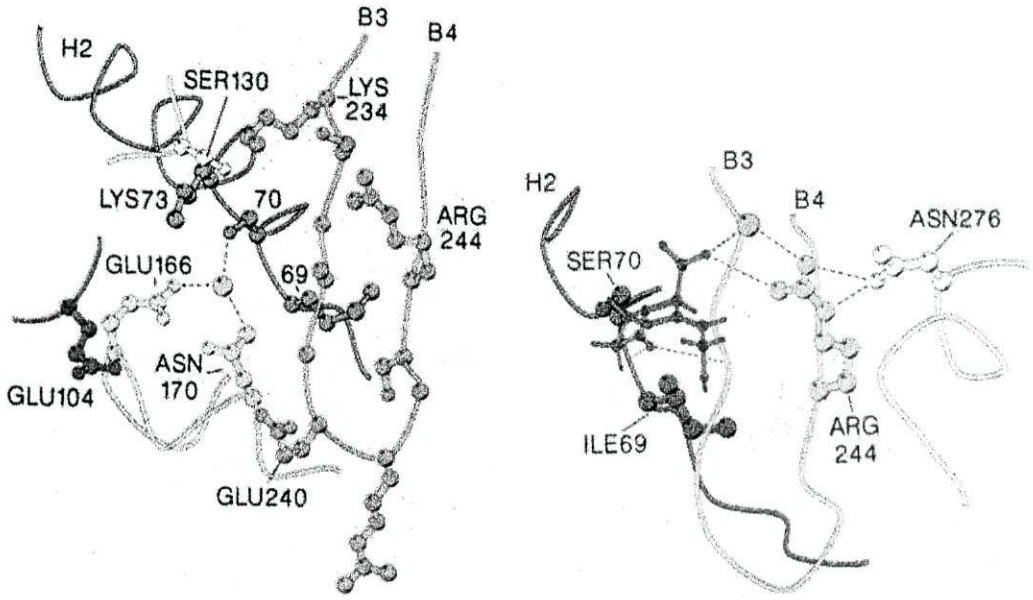


Figura 6 - Estrutura cristalográfica do local activo da β-lactamase mostrando os resíduos conservados e a localização da molécula de ácido clavulânico (Knox, 1995)

Alterações da posição 205, verificadas em SHV-3, de arginina para leucina, presente no extremo superior do local activo, em associação à alteração serina 238, condicionam um aumento de actividade relativamente a cefalosporinas com substituintes volumosos em C_3. Quando associadas a alterações de lisina 240, presentes em SHV-4, actuam sinergicamente, aumentando a capacidade hidrolítica da enzima (Knox, 1995, Du Bois, Marriot & Amyes, 1995). A substituição de um resíduo básico, arginina posição 205 por um aminoácido não carregado leucina, condiciona uma redução de ponto isoeléctrico de 7,6 (SHV-2) para 7,0 (SHV-3) (Nicolas et al., 1989).

Quadro 1 - Comparação das sequências aminoacídicas das β-lactamases do tipo SHV

β-lactamase	pI	Posição do aminoácido											Referência
		8	35	43	130	140	179	192	193	205	238	240	
SHV-1	7,6	Ile	Leu	Arg	Ser	Ala	Asp	Lys	Leu	Arg	Gly	Glu	Barthélémy et al., 1988
								Asn	Val				Mercier & Levesque, 1990
SHV-2	7,6										Ser		Garbarg-Chenon et al., 1990
SHV-2a	7,6		Gln								Ser		Podbielsky et al., 1991
SHV-3	7,0									Leu	Ser		Nicolas et al, 1989
SHV-4	7,8									Leu	Ser	Lys	Péduzzi et al., 1989
SHV-5	8,2										Ser	Lys	Billot-Klein et al., 1990
SHV-7	7,6	Phe		Ser							Ser	Lys	Bradford et al., 1995
SHV-8	7,6						Asn						Rasheed et al., 1997
SHV-9	8,2					Arg		Asn	Val		Ser	Lys	Prinarakis et al., 1996
SHV-10	8,2				Gly	Arg		Asn	Val		Ser	Lys	Prinarakis et al., 1997
SHV-11			Gln										Nüesch-Inderbinen, Kayser & Hächler, 1997
SHV-12			Gln								Ser	Lys	Nüesch-Inderbinen, Kayser & Hächler, 1997

Numeração de aminoácidos de acordo com Ambler et al., 1991

SHV-6 foi descrita bioquimicamente mas não foram publicados resultados de sequenciação (Arlet et al., 1991)

Alterações na posição 8 detectadas em SHV-7 parecem não condicionar o espectro

SHV-9 apresenta uma delecção na posição Gly-54 que tal como a alteração na posição 140 parece não influenciar a hidrólise

SHV-10 não apresenta espectro alargado, apresentando resistência às associações de β-lactâmico com inibidores de β-lactamases

SHV-11 não apresenta espectro alargado

Não foi referido o pI para SHV-11 e SHV-12

Estas β-lactamases de espectro alargado, apresentam uma maior velocidade de hidrólise das cefalosporinas de terceira geração e aztreonamo, relativamente às suas ancestrais.

A actividade hidrolítica não é único condicionante da resistência, daí que a redução da velocidade de hidrólise para penicilinas como amoxicilina e ampicilina, causada por estas mutações relativamente a TEM-1, TEM-2 e SHV-1, possa ser compensada por outros factores, como o aumento da afinidade da enzima (redução do Km) com o consequente

efeito no aumento da eficiência catalítica (Vmax/Km), ou por aumento da quantidade de β-lactamase produzida por aumento da eficiência do promotor do gene como foi descrito para TEM-6 e SHV-2 (Goussard et al., 1991, Podbielski et al., 1991).

Hiperprodução de SHV-1 pode condicionar resistência a ceftazidima (Petit et al., 1992), enquanto a hiperprodução produção de TEM-1 pode condicionar resistência à associação com inibidores de β-lactamases, como foi descrito em *E.coli* (Wu Shanon, and I. Phillips, 1994, Jacoby, 1994).

O aparecimento de TEM-1, numa mesma estirpe produtora de β-lactamase de espectro alargado, é um acontecimento frequente (Mabilat & Courvalin,1990, Thomson, Sanders & Washington, 1991) e que parece condicionar a redução da eficácia do tratamento com ceftazidima associada a inibidores de β-lactamase, relativamente ao que seria na ausência de TEM-1, pelo menos relativamente à associação de ceftazidima com sulbactam (Jacoby, 1994).

A resistência à associação de inibidor de β-lactamase com β-lactâmico, verifica-se para a concentração de inibidor habitualmente usada e que é a usada na clínica, concentrações de inibidor superiores poderão ser eficazes (Thomson et al., 1990).

As β-lactamases de espectro alargado são menos eficazes a hidrolisar os β-lactâmicos antigos do que as suas ancestrais (Du Bois, Marriot & Amyes, 1995). A natureza paga um preço elevado para alterar uma enzima que está adaptada para a um substrato específico e por vezes inclui um outro plasmídeo que codifique a β-lactamase ancestral para lidar com os β-lactâmicos clássicos. As associações de β-lactamase de espectro alargado e TEM-1 na mesma estirpe, funcionam como uma estratégia que origina vantagem competitiva (Knox, 1995). A presença de TEM-1, em estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado, pode compensar a redução de actividade que acompanha o alargamento do espectro para as penicilinas, e apresenta o efeito adicional de tornar o tratamento com associação com inibidor menos eficaz (Jacoby, 1994). Os inibidores potenciam a actividade das cefalosporinas de terceira geração contra estirpes produtoras de β-lactamase de espectro alargado mas este sinergismo é reduzido pela produção concomitante de TEM-1. Esta associação de β-lactamases, poderá condicionar a resistência às associações de penicilina com inibidor das β-lactamases como seja o caso de amoxicilina+ácido

clavulânico, que quando associado a alterações da permeabilidade da membrana externa poderá ser ainda mais eficaz (Rice et al., 1993).

Poderão ocorrer mutações silenciosas, sem consequências funcionais, mas que poderão preparar as bactérias para alterações mais radicais quando pressionadas pelos oxiimino-β-lactâmicos. Por vezes as mutações podem passar despercebidas se causam uma redução de susceptibilidade que não é superior aos "break points" dos testes de susceptibilidade, daí a necessidade de vigilância de alterações subtis dos comportamentos em relação aos vários antibióticos para detectar precocemente estas alterações que poderão funcionar como alterações intermédias, no desenvolvimento de resistência (Du Bois, Marriot & Amyes, 1995).

O tratamento com penicilina selecciona as enzimas ancestrais na progenia (TEM-1, TEM-2 e SHV-1) tornando-as ubíquas. A pressão por oxiiminoβ-lactâmicos seleccionará na população os que apresentam maior nível de resistência devido à produção de β-lactamases de espectro alargado. Um terceira mutação poderá ocorrer para tornar a β-lactamase mais eficaz se a pressão pelos oxiimino β-lactâmicos se mantém. Se a pressão mudar para uma associação de penicilina com inibidor esta funciona contra a β-lactamase de espectro alargado e a tendência será a reversão da mutação para enzimas menos eficazes contra os oxiimino β-lactâmicos. A evolução das β-lactamases depende da pressão selectiva a que são sujeitas. Uma pressão criada pelo uso de associações de β-lactâmico com inibidores de β-lactamases, pode causar mutações "para trás", pois neste caso conferem maior vantagem do que as seleccionadas pelos oxiimino-β-lactâmicos.

Poderemos apresentar como exemplo, a evolução de enzimas da família SHV (figura 7):

SHV-1→SHV-9→SHV-10.

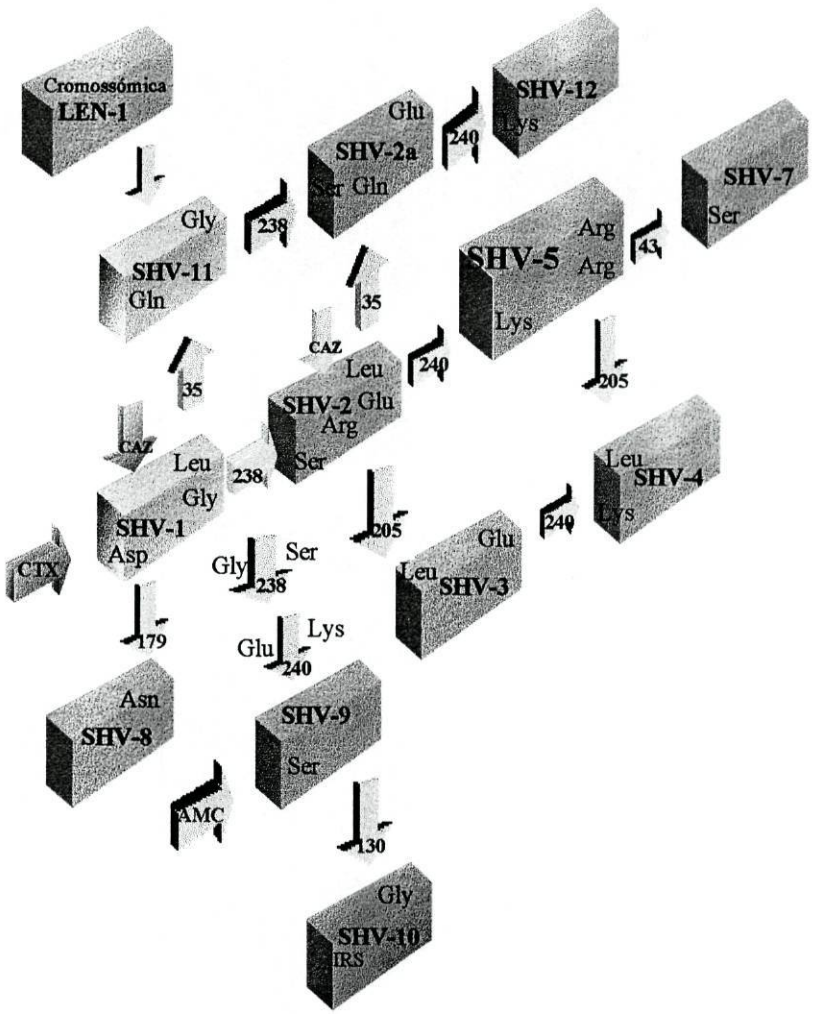


Figura 7 - Evolução, face à pressão selectiva, das β-lactamases da família SHV

SHV-1 e SHV-11 não apresentam espectro alargado
SHV-10 não apresenta espectro alargado, apresentando resistência à associação de β-lactâmico com inibidor de β-lactamase
LEN-1 - β-lactamase cromossómica de *Klebsiella pneumoniae*
CTX - cefotaxima CAZ - ceftazidima AMC - Amoxicilina+ácido clavulânico
As posições das alterações dos aminoácidos estão indicadas nas setas que envolvem as transições e os aminoácidos modificados estão referidos no bloco

1.5.3.3 Detecção de estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado

O uso de técnicas de difusão e de "break-points" elevados pode mascarar as alterações subtis que ocorrem no início do desenvolvimento de resistência.

A detecção de estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado reveste-se de grande importância no que respeita à detecção precoce de surtos e implementação da terapêutica adequada. A necessidade da verificação da presença de β-lactamases de espectro alargado, mesmo para estirpes que apresentam sensibilidade às cefalosporinas de terceira geração e aztreonamo, é justificada pelo facto de essas estirpes se comportarem *in vivo* como resistentes (Brun-Buisson et al., 1987, Jarlier et al., 1988). O efeito de inóculo, observado nestes casos é um dos fenómenos que poderá justificar a falência terapêutica (Rice et al., 1991). Este efeito é especialmente significativo em *Klebsiella pneumoniae* (Jett et al., 1995).

A intervenção do laboratório para a interpretação dos perfis de resistência reveste-se de grande importância, sendo necessária uma interpretação do comportamento de um isolado clínico face aos vários antibióticos, principalmente a nível hospitalar (Sahm, 1996).

A detecção de resistência, considerando como a presença de um marcador que condicione a falência terapêutica, mesmo em presença de isolados clínicos que apresentem sensibilidade aparente *in vitro*, é de grande valor na previsão da eficácia da terapêutica instituída. Detectar a presença de uma β-lactamase de espectro alargado, mesmo quando a sua presença não condiciona redução de susceptibilidade considerável, poderá apresentar grande importância na previsão de uma falência terapêutica da droga em questão (Sanders, 1991).

A eficácia do tratamento pode depender da dose e dos regimes de administração que vão condicionar a concentração sérica, bem como do local de infecção (Thauvin-Eliopoulos et al., 1997).

O teste de sinergismo de cefalosporinas de terceira geração com ácido clavulânico foi inicialmente sugerido por Jarlier e colaboradores como forma de detectar estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado mesmo quando estas condicionam níveis baixos de resistência, devido à hipótese de falência terapêutica (Jarlier et al., 1988).

O desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais de detecção destas enzimas, todas baseadas na característica de sinergismo de acção dos inibidores de β-lactamases com cefalosporinas de terceira geração em que se baseou o primeiro teste usado para a sua detecção (Jarlier et al., 1988), vem demonstrar o grande interesse que as estirpes que produzem estas enzimas apresentam na clínica (Thomson & Sanders, 1992, Katsanis et al., 1994, Cormican, Marshall & Jones, 1996, Jacoby & Han, 1996, Bush, 1996) bem como o interesse da detecção dos seus determinantes genéticos (Nüesch-Inderbinen et al., 1996, M'Zali et al., 1996).

Nas estirpes produtoras de várias β-lactamases é mais difícil detectar a produção de β-lactamases de espectro alargado (Bush, 1996).

Esta questão tem vindo a receber cada vez maior atenção por parte da comunidade científica Internacional interessada nestas questões, de forma que o NCCLS está a desenvolver um estudo no sentido de definir condições adequadas a uma detecção eficaz destas enzimas (Bush, 1996).

A detecção destas enzimas é fundamental mesmo quando não conferem resistência pois a presença do gene que a codifica confere a potencialidade, à estirpe produtora, de a tornar altamente resistente (Nüesch-Inderbinen et al., 1996).

Novas β-lactamases de espectro alargado podem surgir a partir de mutações pontuais e recombinação entre diferentes genes em ambientes em que esses genes sejam endémicos (Medeiros, 1993 a).

O nível de resistência aumenta com um aumento de inóculo, mesmo para estirpes que apresentem uma resistência ligeira, as CMI podem aumentar 16 vezes com um aumento de inóculo de 10^5 para 10^7 ufc/ml, concentração de microrganismos que pode ser atingida nas secreções purulentas por exemplo de pneumonia.

Os isolados multi-resistentes são os primeiros candidatos à pesquisa de β-lactamases de espectro alargado, uma vez que a resistência a outras famílias de antibióticos nomeadamente aminoglicosídeos, normalmente anda associada à produção destas enzimas (Jacoby, 1994).

1.6 *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamases de espectro alargado

1.6.1 Incidência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamases de espectro alargado

Desde as primeiras investigações, o panorama de resistência em *Klebsiella pneumoniae* alterou-se de forma considerável (O'Brien et al., 1987).
Num estudo entre 1980 e 1984, em Espanha, realizado em 487 isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, foi identificada apenas uma estirpe produtora de β-lactamases de espectro alargado (Reig et al., 1993). Este panorama alterou-se de forma considerável nos últimos tempos. Resultados de incidência de β-lactamases de espectro alargado em estirpes hospitalares de *Klebsiella pneumoniae* demonstram em França, Inglaterra (Liu et al., 1992) e Portugal (Ferreira, Sousa & Peixe, 1992) uma percentagem de 14 a 16%.

Num período de sete anos, de 1986 a 1992, Maniatis e colaboradores, encontraram um aumento de cerca de 6% para 9% nas infecções nosocomiais causadas por *Klebsiella spp.*. (Maniatis, et al., 1994), resistentes aos aminoglicosídeos e cefalosporinas de terceira geração (Maniatis et al., 1994a) indicando um aumento da resistência nestes agentes de infecções nosocomiais, reduzindo as opções terapêuticas para o tratamento.

Para a determinação da prevalência de estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado em determinada espécie, deverão ser verificadas todas as estirpes isoladas e a presença da β-lactamase deverá ser avaliada de forma rigorosa, mesmo em situações em que existe apenas redução da susceptibilidade, daí a possibilidade de uma grande variabilidade nos resultados apresentados por vários autores. Bastará que a análise seja feita em unidades hospitalares com características específicas para que a prevalência seja completamente diversa (nas UCI a prevalência poderá ser tão elevada como cerca de 50%, como descrito para uma UCI do Hospital Geral de S^{to}. António (52,7%), pelo que nos estudos de prevalência devem estar bem definidas todas as variáveis que possam condicionar o significado e interpretação dos valores que dependem de situações pontuais,

tal como a existência de surto em curso, entre outras questões que poderão influenciar estes resultados de prevalência. Em Portugal existem grandes diferenças entre os padrões de resistência de *Klebsiella pneumoniae* entre os vários Hospitais (Costa et al., 1993). Estas variações também poderão justificar-se por factores epidemiológicos específicos de cada local e pela política de antibióticos de cada hospital (Jacoby and Medeiros, 1991). Num estudo alargado em França, em 1993, a incidência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamases de espectro variava entre 3 e 32%, havendo 38% dos Centros que não apresentavam β-lactamases deste tipo. Contudo 50% das estirpes produtoras destas β-lactamases eram de apenas um Centro Hospitalar, em que as estirpes eram do mesmo biótipo e apresentavam o mesmo perfil de resistência, pelo que poderiam resultar de um surto clonal (Goldstein et al., 1993). Neste estudo 50% das estirpes de *Klebsiella pneumoniae* apresentavam-se sensíveis, apesar da presença da β-lactamase de espectro alargado e 12% das estirpes produtoras de β-lactamase de espectro alargado eram resistentes à cefoxitina (parecendo representar associação de mecanismos de resistência conferindo vantagem competitiva às estirpes).

1.6.2 Epidemiologia e distribuição geográfica de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamases de espectro alargado

A epidemiologia de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamases de espectro alargado é complexa. Os determinantes genéticos das várias β-lactamases comportam-se de forma diferente. Em alguns casos as estirpes que apresentam β-lactamases de espectro alargado são muito semelhantes sugerindo uma origem clonal das estirpes e estabilidade dos genes que codificam a resistência. Noutros surtos a disseminação de resistência está ligada a plasmídeos transferíveis ou à transposição de genes de resistência entre diferentes plasmídeos através de elementos transposáveis (Gouby et al., 1994).

Surtos clonais em que a disseminação da mesma estirpe por dois hospitais era o factor preponderante para a instalação do surto foram documentados no Reino Unido (Cookson et al., 1995) em que o caso índice parecia ser um doente proveniente do Bahrain o que

justificou a sugestão de implementação de medidas de verificação dos pacientes que tivessem sido hospitalizados no estrangeiro nos 6 meses anteriores ao internamento.
Em França este fenómeno está bem documentado e em surtos por estirpes produtoras de β-lactamases do tipo TEM (Petit et al., 1990, De Champs et al., 1991, Archambaud et al., 1991) os genes codificadores transferiam facilmente entre estirpes e até entre espécies, ao contrário de outros surtos em que a disseminação era clonal, alertando para a necessidade da análise de cada surto em particular, para a interpretação da sua epidemiologia própria (Nouvellon et al., 1994, Gouby et al., 1994).
A enzima SHV-4 foi descrita pela primeira vez em França e era produzida por uma mesma estirpe de *Klebsiella pneumoniae* que se disseminou por cinco hospitais da área de Paris (Buré, et al., 1988), tendo posteriormente sido verificada a disseminação inter-hospitalar do mesmo clone em 14 hospitais (Arlet, et al., 1994).

A disseminação de *Klebsiella pneumoniae* produtora de TEM-3 em França, parece indicar uma combinação de disseminação de plasmídeos e estirpes (De Champs et al., 1991), enquanto a disseminação de SHV-4 parece indicar uma disseminação preferencial de estirpes (Arlet, et al., 1994).

Surtos de infecções nosocomiais por *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamases de espectro alargado têm sido descritos na Europa e nos Estados Unidos da América, contudo o tipo de enzima presente é diferente de acordo com a localização geográfica.
Algumas β-lactamases de espectro alargado parecem disseminadas por vários países, como sejam SHV-2, SHV-5 e TEM-6, enquanto outras parecem apresentar distribuições preferenciais por determinados países.

TEM-10 e TEM-12 aparecem preferencialmente nos Estados Unidos e Reino Unido (Medeiros, 1993a, Liu et al., 1992) e a enzima que aparece referida com mais frequência nos Estados Unidos, é a TEM-26 (Quinn, 1993) contudo, nos últimos tempos, as referências internacionais têm vindo a confirmar a distribuição alargada de SHV-5 (Jacoby, 1993, Jacoby & Han, 1996).
TEM-3 é prevalente em França, contudo TEM-26 parece ter chegado à Europa (Soilleux et al., 1996).

A diferente distribuição destas enzimas poderá ser consequência dos padrões de utilização de antibióticos a nível hospitalar, nos diferentes países (Medeiros, 1993a).

A distribuição de SHV-5 por todo o Mundo é um facto relevante sendo responsável por surtos hospitalares em vários Países: Alemanha (Bauernfeind, et al. 1993), Grécia (Legakis, et al., 1995, Vatapoulos, et al., 1990), Itália (Pagani, et al., 1994) Estados Unidos (Jacoby, 1993) e Portugal (presente trabalho).

A disseminação de um tipo particular de β-lactamase de espectro alargado pode depender da patogenicidade da estirpe, da estabilidade do plasmídeo que a codifica, dos outros marcadores de resistência e da manutenção da pressão selectiva para a estabilização do plasmídeo de resistência. A pressão selectiva poderá ser exercida por um outro antibiótico que não as cefalosporinas de terceira geração (Payne & Amyes, 1991).

Nos Estados Unidos as primeiras referências de surtos devidos as estirpes de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β-lactamases de espectro alargado datam de 1992 enquanto a primeira β-lactamase plasmídica tipo Amp C foi referida em 1990 o que parece ser consequência da terapêutica usada, ou consequência da atenção dada ao fenómeno.
Em França entre 1985 e 1988 a prevalência de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β-lactamases de espectro alargado aumentou de 1% para cerca de 15% (Medeiros, 1993).

A situação verificada em Portugal, apresenta alguma discrepância de valores entre os vários Hospitais, relativamente à prevalência de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* resistentes às cefalosporinas de terceira geração (Cristino et al., 1994).

São numerosos os casos referidos internacionalmente de surtos de infecções nosocomiais por estirpes de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β-lactamases de espectro alargado - SHV-4, CTX-1/TEM-3 - França (Arlet, et al., 1990, Bingen, et al., 1993, Nouvellon, et al., 1994, Gouby, et al., 1994), TEM-26 - USA (Rice, et al.1990, Naumovsky, et al., 1992, Meyer, et al., 1993 e Urban et al., 1994), Austrália (Eisen, et al., 1995). Em particular por estirpes produtoras de SHV-5, na Alemanha (Bauernfeind, et al. 1993),

Grécia (Legakis, et al., 1995, Vatapoulos, et al., 1990), Itália (Pagani, et al., 1994) Estados Unidos (Jacoby, 1993) e SHV-2, em França (Jarlier, et al., 1988).

A disseminação intra-hospitalar, por pacientes de diferentes unidades hospitalares foi também referida na Alemanha relativamente a estirpes de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de SHV-5 (Bauernfeind et al., 1993).
Também no Reino Unido foi descrita a disseminação de uma mesma estirpe de *Klebsiella pneumoniae* resistente a cefalosporinas de terceira geração por dois Hospitais (Johnson et al., 1992).
Num hospital Turco onde foi encontrada uma prevalência de 25% de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β-lactamase de espectro alargado, foram encontradas estirpes produtoras de β-lactamases transferíveis de pI 7,6 cujas características parecem estar de acordo com SHV-2 e estirpes em que as β-lactamases não foram transferidas apresentando associações 5,4+7,6+8,2 que predominavam entre outras (Gur et al., 1992).
A disseminação de uma mesma estirpe de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamases de espectro alargado parece dar-se também a nível Internacional, como referido por um caso de aquisição destas estirpes no Reino Unido a partir do Egipto e Grécia (Shannon et al., 1990).
Os doentes idosos transferidos entre várias unidades hospitalares e hospitais diferentes podem constituir um grupo de risco para a aquisição destas estirpes.

A não detecção de surtos pode causar o aparecimento de mutantes de β-lactamases de espectro alargado com nível de resistência superior, na mesma instituição (Pagani et al., 1994, Bradford et al., 1994).

O facto de ser comum o surto clonal de estirpes multi-resistentes apresentando plasmídeos que codificam a resistência e que por vezes apresentam transferência por conjugação, mas cujos genes apresentam elevada estabilidade, atestam a importância da disseminação da estirpe que poderá constituir o factor preponderante para o surto.

1.6.3 *Klebsiella pneumoniae* - uma espécie prevalente entre as produtoras de β-lactamases de espectro alargado

As estirpes de *Klebsiella pneumoniae* produzem uma penicilinase cromossómica normalmente expressa em níveis baixos e que confere resistência moderada à maioria das penicilinas (Mathew, 1979, Neto et al., 1992). Uma dessas β-lactamases, LEN-1, apresenta uma homologia considerável com SHV-1, sugerindo que possa haver uma relação evolutiva entre as β-lactamases plasmídicas do tipo SHV e LEN-1 (Petit et al., 1992) confirmada pela homologia de 92% entre os genes que codificam SHV-3 e LEN-1 (Nicolas et al., 1989).

A elevada proporção de estirpes de *Klebsiella* produtoras de SHV-1, sugere que o gene estrutural desta enzima tenha sido originado a partir de um gene de *Klebsiella* que tenha adquirido transposabilidade (Mathew, 1979) questão já sugerida anteriormente (Matsumoto et al., 1972, Sawai, Yamagishi & Mitsuashi, 1973).

As β-lactamases plasmídicas apresentam uma distribuição preferencial de acordo com a espécie, existindo um predomínio de TEM-1 em *Escherichia coli* (Sousa et al., 1991, Sanders and Sanders, 1992) e de SHV-1 em *Klebsiella pneumoniae* (Ferreira, Sousa & Peixe, 1992, Sanders and Sanders, 1992), o que poderá condicionar os tipos de β-lactamases de espectro alargado em cada espécie.

Cada espécie apresenta comportamentos característicos relativamente à resistência aos antibióticos. Em *Klebsiella pneumoniae* o fenómeno mais significativo é produção de β-lactamases de espectro alargado, o que poderá estar relacionado com o facto de os genes codificadores de factores de virulência poderem andar associados aos genes que codificam β-lactamases de espectro alargado o que facilitará a maior incidência destas estirpes entre as causadoras de infecção.

Esta maior incidência de β-lactamases de espectro alargado em *Klebsiella pneumoniae* não parece ser devida a diferenças na expressão da resistência nem na frequência de mutação (Katsanis & Jacoby, 1992) podendo ser devida, em parte, a infecção cruzada com disseminação clonal das estirpes produtoras (Livermore, 1995). Os factores predisponentes para a colonização ou infecção com estirpes de *Klebsiella pneumoniae* produtoras destas enzimas, poderão contribuir para a sua prevalência (Quinn, 1994).

A distribuição das enzimas mediadas por plasmídeos reflecte a transmissibilidade dos elementos em que os seus genes estão incluídos. Muitos destes genes estão em transposões facilitando a disseminação entre diferentes plasmídeos e organismos.
Plasmídeos de elevado peso molecular, codificando resistência a múltiplos agentes são mais comuns em *Klebsiella pneumoniae* do que em *Escherichia coli*, o que poderá constituir vantagem competitiva que justifique a maior incidência de β-lactamases de espectro alargado em *Klebsiella pneumoniae* (Jacoby & Medeiros, 1991, Philippon, Labia & Jacoby, 1989).
A descoberta em *Klebsiella pneumoniae*, de uma sequência apresentando perto 100% de homologia, com o gene da integrase, *tnpI*, dos transposões do tipo Tn*21*, indica que as estirpes poderão albergar elementos transposáveis deste tipo, integrando os genes codificadores destas β-lactamases (Rasmussen & Bush, 1997).

1.7 Resistências associadas

1.7.1 Resistência às associações de β-lactâmicos com inibidores de β-lactamases

Resistência às associações com inibidor de β-lactamase podem ser devidas a vários mecanismos de resistência sendo de entre eles os mais frequentes a produção de β-lactamases, normalmente susceptíveis ao inibidor, em níveis elevados, redução da expressão das proteínas porínicas da membrana externa, produção de β-lactamases resistentes aos inibidores do tipo das Amp C (Rice et al., 1993) e do tipo TEM resistentes aos inibidores (IRT) (Lemozy et al., 1995). A resistência aos inibidores é tanto mais problemática se associada β-lactamases de espectro alargado.

A combinação de mecanismos de resistência em *Klebsiella pneumoniae*, produção de β-lactamase e alteração das proteínas da membrana externa, pode resultar numa redução substancial da eficácia *in vivo* das combinações de β-lactâmico com inibidor de

β-lactamase. A relativa facilidade com que as estirpes clínicas reduzem a expressão de proteínas da membrana externa do tipo das porinas sugere que a frequência de aparecimento de combinação de mecanismos de resistência, poderá aumentar com o uso das associações de β-lactâmico com inibidor de β-lactamase (Rice et al., 1993).

Também em *Klebsiella pneumoniae* têm aparecido referências de isolados clínicos produtores de IRTs (Lemozy et al., 1995, Bermudes et al., 1997).

A resistência a combinações de penicilina com inibidor de β-lactamases pode ser também devida a produção aumentada de SHV-1 (Rice et al., 1996).

O controle de surtos devidos a estirpes produtoras de múltiplas β-lactamases requer uma atenção constante bem como cuidado na utilização dos agentes antimicrobianos disponíveis. O uso de cefalosporinas de terceira geração e o uso aumentado de combinações de β-lactâmico com inibidor de β-lactamase leva ao aparecimento cada vez mais frequente de estirpes multi-resistentes apresentando múltiplas β-lactamases (Rice et al., 1996) e associação de mecanismos de resistência (Rice et al., 1993)

Um estudo Europeu de prevalência de resistência aos antibióticos demonstrou que os países do Sul da Europa apresentam níveis de resistência mais elevados, havendo diferenças de hospital para hospital relacionadas com a epidemiologia específica de cada hospital (Kresken et al., 1993)

Devido ao desenvolvimento de resistência a vários tipos de antibióticos pelas estirpes nosocomiais, actualmente a FDA já recomenda a ciprofloxacina injectável para tratamento de pneumonias nosocomiais por *Klebsiella pneumoniae* (FDA, 1997), mas a emergência de resistência às fluoroquinolonas começa a ser uma realidade.

Tal como na família TEM, também na família SHV começam a aparecer as primeiras referências de enzimas resistentes às combinações de β-lactâmico com inibidor de β-lactamase ajudando a aumentar o número das enzimas pertencentes a esta família como aconteceu com a família TEM. Interessante é que neste caso a enzima resultou de mutação a partir de gene que codifica uma β-lactamase de espectro alargado ao contrário do que

parece acontecer com as derivadas da família TEM, em que a mutação parece ter surgido no gene que codifica as ancestrais, TEM-1. Este fenómeno é mais um exemplo de que a evolução das β-lactamases se dá em função da pressão exercida e depende da enzima presente inicialmente no isolado, alertando para o facto que a alteração de terapêutica pode condicionar a evolução da resistência de acordo com a pressão exercida. Estas mutações que conferem resistência às associações com inibidores de β-lactamases parecem ser incompatíveis com o largo espectro evidenciado pelas enzimas que as podem originar, funcionando como mutações em sentidos opostos em que para condicionar resistência a um tipo de composto perde a capacidade de condicionar resistência ao outro (Prinarakis et al., 1997).

1.7.2 Resistência aos aminoglicosídeos - Enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos

Em *Klebsiella pneumoniae* a resistência aos aminoglicosídeos constitui um problema de multi-resistência. A partir de 1984 observou-se um aumento da incidência de combinações de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos em *Klebsiella pneumoniae*, relacionada com a utilização de antibióticos de cada país (Miller, 1996), sendo um dos agentes patogénicos em que se verifica uma maior complexidade da associação de enzimas inactivadoras de aminoglicosídeos (Miller et al., 1997).

A resistência bacteriana aos aminoglicosideos é devida preferencialmente à inactivação enzimática por acetilação dos grupos amina e adenilação e fosforilação dos grupos hidroxilo, por acetil-transferases, nucleotidil-transferases e fosfo-transferases (figura 8). Outros mecanismos, menos comuns incluem alterações ribossómicas e perda da permeabilidade à droga (Sousa & Prista, 1990).

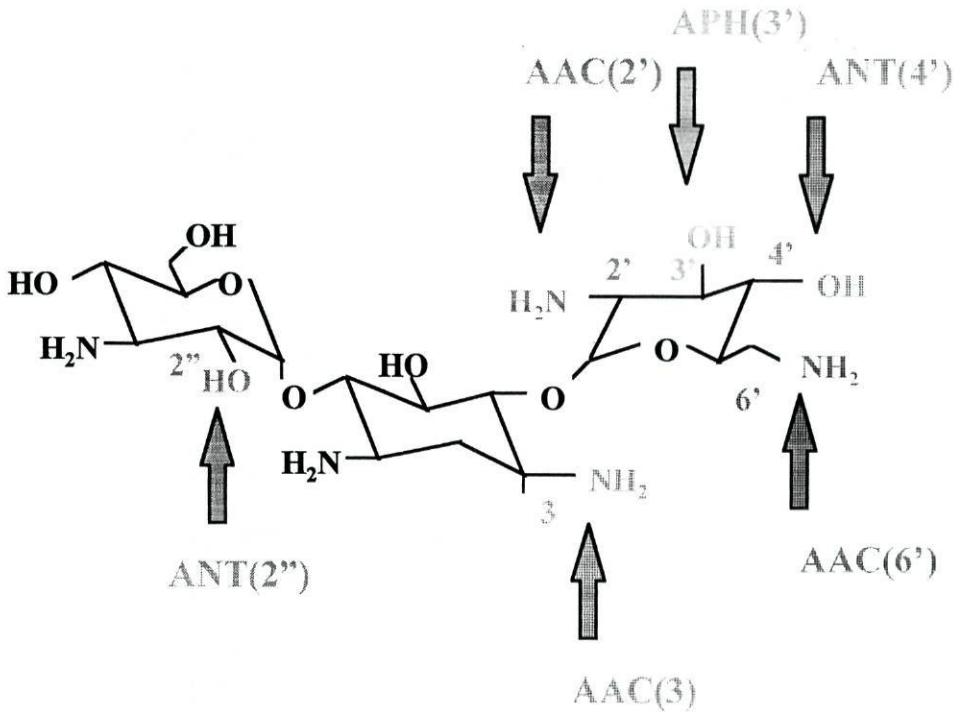


Figura 8 - Fórmula estrutural dos aminoglicosídeos e local de actuação das enzimas inactivadoras (adaptado de Miller & Aminoglycoside Resistance Study Groups, 1994)

A presença de mais de uma enzima inactivadora dos aminoglicosídeos num mesmo isolado clínico, cria fenótipos de resistência aditivos, relativamente a cada um isoladamente e por vezes sobreponíveis em relação a alguns compostos, pelo que a utilização de técnicas de hibridização com genes específicos de cada enzima é útil para caracterizar a disseminação de genes de resistência aos aminoglicosídeos em situações epidémicas hospitalares (Tolmasky et al., 1986, Courvalin, 1991, Shaw, et al., 1991).

Para cada tipo de enzima inactivadora dos aminoglicosídeos poderá existir mais do que um gene responsável pela codificação da mesma enzima pelo que a hibridização dos isolados clínicos é testada com várias sondas diferentes. Como exemplo, a família de enzimas AAC(6') actualmente, apresenta 17 genes que conferem quatro fenótipos de resistência diferentes. São conhecidos para AAC(6')-I, 10 genes diferentes que codificam esta enzima e nomeados de *a k*, para AAC(6')-II existem 2 genes a e b, para AAC(6')-III 4 genes nomeados I e,l,m e n, para AAC(6')-IV um gene nomeado I o.

Alterações num único aminoácido podem alterar substancialmente o perfil de substrato de uma enzima modificadora de aminoglicosídeos (Shaw et al., 1993).

A combinação de cefalosporina e aminoglicosídeo é usada como terapia de primeira escolha contra infecções bacterianas graves (Boisivon et al., 1992).
As enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos são prevalentes entre as estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado (Fernandez-Rodriguez et al., 1992). A incidência local de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos pode influenciar a sua associação com as β-lactamases de espectro alargado.

Em *Klebsiella pneumoniae* as estirpes produtoras de β-lactamase de espectro alargado normalmente são estirpes multi-resistentes, aparecendo a β-lactamase associada às enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos, o que parece dever-se ao facto de os genes que codificam estas resistências aparecerem próximos nos plasmídeos que os codificam, justificando a transferência da resistência em bloco (Lee, Hopkins & Syvanen, 1990).

As estirpes resistentes adquirem genes que codificam enzimas inactivadoras destas drogas, alguns deles associados com transposões (Tolmasky & Crosa, 1987). A capacidade dos genes de resistência se moverem para e de vários replicões, tem permitido a rápida disseminação destes genes.
Os estudos de hibridização de DNA, documentam a disseminação a nível mundial dos genes de resistência aos aminoglicosídeos que parece ser facilitada pela integração destes genes num integrão, inicialmente observado no transposão Tn*21*. Esta integração poderá ajudar a explicar as várias combinações de mecanismos de resistência encontrados em isolados clínicos recentes, facto que não se observava anteriormente, em que as estirpes clínicas apresentavam apenas um mecanismo de resistência (Shaw et al., 1993).

Os resultados do nosso país, espelham a utilização preferencial de gentamicina, tobramicina e netilmicina, como demonstrado pelo aparecimento preferencial de AAC(3)-II (Miller et al., 1997).

1.7.3 Resistências múltiplas

A capacidade de as bactérias desenvolverem resistência a múltiplas drogas é em parte devida à capacidade para adquirir novos genes de resistência aos antibióticos. Os elementos móveis recentemente descritos, integrões, determinam um sistema de recombinação específica de local que é responsável pela aquisição de vários determinantes de resistência. Um grande número de genes de resistência a antibióticos conferindo resistência a aminoglicosídeos, β-lactâmicos, cloranfenicol e trimetoprim, têm sido encontrados inseridos em integrões.

Integrões são elementos genéticos que apresentam determinantes de recombinação específica de local através dos quais são capazes de capturar genes. Estes genes, normalmente de resistência a antibióticos, fazem parte de cassetes móveis que contêm uma região codificadora e um local de recombinação, conhecido como elemento de 59 bases, localizado no extremo 3' do gene. Os elementos de 59 bases constituem locais de recombinação reconhecidos pela integrase do integrão e as cassetes são inseridas no único local de reconhecimento da enzima adjacente ao gene da integrase. Uma vez integradas, as cassetes fazem parte do integrão e serão expressas a partir de um promotor comum (figura 9).

Os integrões podem apresentar várias cassetes de genes e o nível de expressão de cada, parece depender da posição relativamente ao promotor. Os efeitos da diferença da força do promotor e da posição da cassete no nível de expressão da resistência, poderão apresentar relevância clínica. A pressão selectiva criada por determinado antibiótico, poderá promover rearranjos mediados pela integrase, originando variantes em que a cassete esteja mais próxima do promotor, condicionado maior nível de expressão (Collis & Hall, 1995).

Tem sido referida a presença de genes que codificam enzimas inactivadoras de aminoglicosídeos (Bunny, Hall & Stokes, 1995, Hannecart-Pokorni et al., 1997) em integrões presentes em isolados clínicos hospitalares de *Klebsiella pneumoniae*, pelo que se considerar-mos a frequência com que estas enzimas andam associadas a β-lactamases de espectro alargado, será provável que existam vários integrões que acumulem genes de resistência a aminoglicosídeos e codificadores destas β-lactamases que justificariam a multi-resistência encontrada em estirpes de *Klebsiella pneumoniae* de ambiente hospitalar, como de resto já havia sido encontrado por Lee e colaboradores, num

elemento genético de estrutura semelhante aos integrões (Lee, Hopkins & Syvanen, 1990) e por Mabilat e colaboradores que demonstraram a presença de um integrão expressando o gene *aacA4* em estirpes que apresentam TEM-3 (Mabilat et al., 1992).

A terapêutica de associação aminoglicosídeo/β-lactâmico e mais concretamente aminoglicosídeo-cefalosporina da terceira geração, tão comum na terapêutica empírica hospitalar, ao criar uma pressão selectiva mista, poderá ter contribuído para o aparecimento de operões contendo genes de resistência que codificam β-lactamases de espectro alargado, por exemplo SHV-2 e enzimas inactivadoras de aminoglicosídeos, fosfotransferase (gene *aphA7*) como é o caso do operão IAB, presente num plasmídeo de *Klebsiella pneumoniae*, transcrito a partir um promotor híbrido com a sequência de inserção IS*26*. Lee e colaboradores sugerem que tenha havido uma evolução a partir de rearranjos genéticos mediados pela sequência de inserção, sugerindo que o gene *aphA7* tenha evoluído a partir do gene *aphA1* presente no transposão Tn*903* e que o gene *blaS2A* tenha evoluído a partir de uma forma ancestral semelhante a *blaS1* (produtor de SHV-1). O promotor híbrido será mais eficiente do que os promotores dos dois genes quando separados, criando uma unidade transcricional dos dois genes de resistência mais eficaz (Lee, Hopkins & Syvanen, 1990). Esta estrutura genética, parece apresentar semelhanças consideráveis com a estrutura dos integrões.

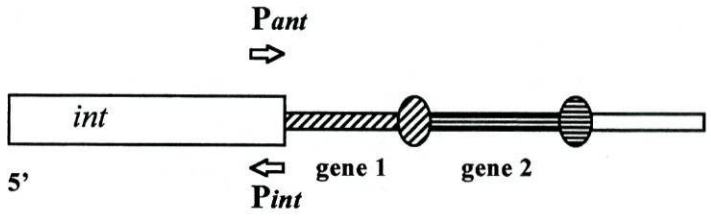
São vários os casos de transferência de resistências associadas aos aminoglicosídeos e β-lactâmicos. Estes casos parecem estar associados à presença de sequências de inserção que justificam a facilidade de disseminação dos genes de resistência (Petit et al., 1990, Sirot, et al., 1991).

A presença de um integrão expressando o gene *aacA4* em estirpes que apresentam TEM-3, poderá justificar a variedade de genes de resistência aos aminoglicosídeos associados a esta β-lactamase (Mabilat et al., 1992) constituindo um exemplo da associação destes dois tipos de resistência a antibióticos de famílias diferentes, em elementos genéticos que permitem a disseminação de genes de resistência múltipla.

Este fenómeno também foi referido para o gene tipo bla_{IMP} de carbapenemase de isolado clínico de *Serratia marcescens* associado a gene tipo *aac(6')-Ib* codificador de enzima inactivadora de aminoglicosídeos, presentes numa estrutura tipo integrão mediado por um plasmídeo transferível de elevado peso molecular (Arakawa et al., 1995) que parece ter

passado do cromossoma para plasmídeo, com subsequente disseminação a outras espécies, entre elas *Klebsiella pneumoniae* (Rasmussen & Bush, 1997).

O facto de os genes das β-lactamases fazerem parte de transposões de multi-resistência do tipo Tn*21* (Lafond et al., 1989) e o facto deste transposão aparecer com frequência em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* (Zühlsdorf & Wiedemann, 1992) alerta-nos para a importância destas estruturas, para a prevalência das β-lactamases de espectro alargado nesta espécie e para a possibilidade do desenvolvimento de maior multi-resistência pela incorporação de cassetes de genes em transposões deste tipo.



int - gene estrutural da integrase

P*int* - promotor do gene da integrase

P*ant* - promotor comum dos genes de resistência

círculos - elementos de 59 bases no extremo 3' das cassetes de genes

Figura 9 - Estrutura básica de integrão (adaptado de Collis & Hall, 1995)

1.8 *Klebsiella pneumoniae* - um patogénico multi-resistente

Klebsiella pneumoniae é um dos agentes Gram negativo preferenciais nas infecções nosocomiais e nos últimos tempos têm vindo a surgir referências de estirpes que apresentam uma acumulação de mecanismos de resistência, criando estirpes multi-resistentes em que os antibióticos que se mantêm activos são muito restritos. Um exemplo recente deste fenómeno é o aparecimento de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* responsáveis por surtos de infecções nosocomiais em que alguns dos isolados se

apresentavam resistentes a todos os antibióticos comercializados, excepto polimixina (Bradford, et al., 1997). Este fenómeno era devido a um conjunto de factores, envolvendo a produção de β-lactamase de espectro alargado que conferia resistência às cefalosporinas de terceira geração e aztreonamo, associada à produção de β-lactamase plasmídica do tipo Amp C que conferia resistência às cefamicinas e alterações das proteínas da membrana externa que associadas à acção da β-lactamase plasmídica tipo Amp C conferia resistência ao imipenemo. O facto, de neste caso, o elemento genético que codificava as enzimas, aparecer no cromossoma e em plasmídeo sugere a sua presença num elemento transposável.

Esta referência de resistência de *Klebsiella pneumoniae* ao imipenemo, é um acontecimento preocupante na resistência aos antibióticos, uma vez que para muitas estirpes de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β-lactamases de espectro alargado, enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos e β-lactamases plasmídicas do tipo Amp C, o imipenemo era a única opção terapêutica para infecções graves. Desta forma, *Klebsiella pneumoniae* torna-se um agente patogénico susceptível a um número muito reduzido de terapêuticas antibióticas.

O aparecimento no Japão, de isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae*, produtor de carbapenemase codificada por gene contido em elemento transposável, num plasmídeo transferível, vem associar-se à preocupação crescente com a resistência deste agente nosocomial e com a disseminação da resistência ao imipenemo (Rasmussen & Bush, 1997).

Um outro facto preocupante consiste no aparecimento de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* resistentes às fluoroquinolonas, por alterações da subunidade A da DNA girase, enzima alvo da acção destes agentes antibacterianos, em associação a alterações da subunidade ParC da toposiomerase IV (Deguchi, et al., 1997).

A referência cada vez mais comum, a integrões apresentando vários genes de resistência (Mabilat et al., 1992), em *Klebsiella pneumoniae*, faz-nos pensar que será um patogénico que já nos dias de hoje, poderá causar graves problemas terapêuticos, a nível hospitalar, podendo mesmo chegar-se a situações em que não haja nenhum antibiótico que consiga combater infecções por este agente (Bradford et al., 1997).

Objectivos

2. Objectivos

A resistência aos antibióticos e o risco de novas doenças infecciosas e outras reemergentes, constitui uma preocupação crescente no Mundo inteiro.

Os agentes patogénicos humanos, têm vindo a tornar-se progressivamente mais resistentes aos antibióticos, nos últimos tempos. A nível Hospitalar, esta é uma realidade que começa a tornar-se preocupante, pelas restrições que condiciona na terapêutica de infecções graves.

Klebsiella pneumoniae é um dos agentes patogénicos das infecções nosocomiais que apresenta elevada resistência aos antibióticos.

Neste estudo, pretendemos verificar a realidade do nosso País, no que respeita à resistência de estirpes hospitalares de *Klebsiella pneumoniae*.

A terapêutica empírica das infecçõe nosocomiais, apresenta como opção relevante a associação de cefalosporinas de terceira geração e aminoglicosídeos.

Foi objectivo deste estudo, caracterizar em *Klebsiella pneumoniae*, os mecanismos preponderantes para a resistência a β-lactâmicos de largo espectro e aminoglicosídeos, em hospitais Portugueses, através da determinação dos tipos de β-lactamases de espectro alargado e enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos, prevalentes. As relações de identidade das estirpes foram consideradas, de forma a interpretar epidemiologicamente a sua ocorrência.

Material e métodos

3. Material e métodos

Foram analisadas para este estudo 400 estirpes de *Klebsiella pneumoniae* de origem ambulatória e hospitalar sendo 330 de origem hospitalar. Desta amostra foram escolhidas 80 estirpes exclusivamente de origem hospitalar oriundas de Hospitais da zona urbana do Porto: Hospitais centrais - Hospital Geral de S^{to}. António, Hospital de S. João, Centro Hospitalar Vale de Sousa - Paredes e Penafiel, um Hospital privado do centro do Porto - Hospital da Prelada e esporadicamente estirpes dos Hospitais de Ovar e S. Paio de Oleiros. Foram também consideradas neste estudo, a título comparativo, estirpes do Hospital de S^{ta}. Maria.

A selecção das estirpes foi feita de acordo com o facto de apresentarem sinergismo do ácido clavulânico com as cefalosporinas da terceira geração, característica fundamental das estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado.

Este fenómeno foi detectado por alargamento halo de inibição do crescimento produzido por cefalosporinas de terceira geração na zona de influência do ácido clavulânico contido disco da associação amoxicilina/ácido clavulânico, colocado na posição adequada à detecção deste fenómeno.

As estirpes foram identificadas inicialmente pelos métodos tradicionais e confirmadas por API 32 GN - Biomérieux.

3.1 Meios de cultura e tampões de pH

3.1.1 Meios sólidos

Mac Conkey

	g/l
peptona	20
lactose	10
sais biliares nº 3	1,5
cloreto de sódio	5
vermelho neutro	0,03
cristal violeta	0,001
agar	15

Autoclavar a 121°C durante 15 minutos e distribuir assepticamente em placas de Petri

Meio de Muller-Hinton II

	g/l
extracto de carne	2
bio-case	17,5
amido	1,5
agar	17

Autoclavar a 116°C durante 15 minutos e distribuir assepticamente em placas de Petri de forma a apresentarem 4 mm de espessura de meio.

3.1.2 Meios líquidos

TSB - (Trypticase soy broth) - pH 7,3

	g/l
bio-trypcase	17
bio-syase	3
cloreto de sódio	5
hidrogenofosfato de potássio	2,5
glucose	2,5

Dissolver os ingredientes e autoclavar a 121°C durante 15 minutos

SOB

triptona	2%
extracto de levedura	0,5%
cloreto de sódio	10 mM
cloreto de potássio	2,5 mM

Acertar pH a 6,8-7 com hidróxido de potássio e autoclavar a 121°C durante 15 minutos
Adicionar antes de utilizar, cloreto de magnésio 1 M para uma concentração final de 1% (v/v).

3.1.3 Meios tampão de pH

TfB1 (transformation buffer 1)

	mM
cloreto de rubídeo	100
cloreto de manganésio	50
acetato de potássio	30
cloreto de cálcio	10
glicerol	15%

acertar pH a 5,8 com ácido acético, esterilizar por filtração e conservar a 4°C

TfB2 (transformation buffer 2)

	mM
MOPS (pH 7)	10
cloreto de rubídeo	10
cloreto de cálcio	75
glicerol	15%

acertar a pH 7 com solução de hidróxido de sódio 1M, esterilizar por filtração e conservar a 4°C

3.2 Estirpe de referência e estirpes receptoras

E.coli ATCC 25922

E.coli K802N

E.coli K12

E.coli HB101

3.3 Detecção de estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado

3.3.1 Determinação do fenótipo de resistência

O antibiograma foi executado pelo método de difusão em agar, em agar Muller Hinton II, de acordo com as indicações do NCCLS (NCCLS, 1995) usando os seguintes discos de antibiótico: ampicilina (10 μg), amoxicilina-ácido clavulânico (20-10 μg), ticarcilina (75 μg), piperacilina (100 μg), mecilinamo (30 μg), cefalotina (30 μg), cefamandol (30 μg), cefoxitina (30 μg), cefotaxima (30 μg), ceftazidima (30 μg), ceftriaxona (30 μg), aztreonamo (30 μg), moxalactamo (30 μg), imipenemo (10 μg), gentamicina (10 μg), netilmicina (30 μg), neomicina (30 μg), tobramicina (10 μg), canamicina (30 μg), amicacina (30 μg), estreptomicina (30 μg), tetraciclina (30 μg), cloranfenicol (30 μg), trimetoprim-sulfametoxazol (25/23,75), ácido nalidíxico (30 μg), ciprofloxacina (30 μg), fornecidos por Biomérieux ou Oxoid.

Preparam-se suspensões de turvação equivalente a 0,5 Mac Farland que são inoculadas em agar Muller Hinton por pincelamento com zaragatoa embebida na suspensão bacteriana e espremida do excesso. Os discos são aplicados na superfície do meio de cultura após secagem do inóculo, as placas são incubadas 18 horas a 37°C e lido o diâmetro dos halos de inibição de crescimento provocados por cada antibiótico.

3.3.1.1 Detecção do sinergismo de oxiimino-β-lactâmicos com ácido clavulânico

3.3.1.1.1 Teste da acção de sinérgica de dois discos

Os discos são aplicados, em posições que permitam a detecção de fenómenos de sinergismo entre os discos da associação amoxicilina/ácido clavulânico e as cefalosporinas da 3ª geração e aztreonamo, característicos das estirpes produtoras de β-lactamase de espectro alargado (figura 10).

A posição adequada dos discos é fundamental para a detecção do fenómeno de sinergismo, principalmente no que se refere às situações extremas. Ou seja, situações em que as estirpes codificam β-lactamases que condicionam um nível baixo de resistência, como é o caso das estirpes produtoras de SHV-2, em que o afastamento dos discos de cefalosporina de terceira geração e associação de amoxicilina com inibidor, deverá ser de pelo menos 30 mm, de forma a permitir a observação do alongamento do halo de inibição provocado pelo fenómeno (Jarlier, 1988) o inóculo deverá ser um pouco mais pesado em casos de dúvida. Nas estirpes que apresentam um elevado grau de resistência, o afastamento de 30 mm poderá ser excessivo não se verificando o fenómeno de sinergismo devido ao facto de o inibidor e a cefalosporina não se encontrarem em concentrações adequadas à produção do fenómeno em nenhum ponto entre os dois discos, (daí que a presença de β-lactamases de espectro alargado possa ser subavaliada, principalmente nos casos das estirpes produtoras de β-lactamases que condicionam um nível de resistência baixo).

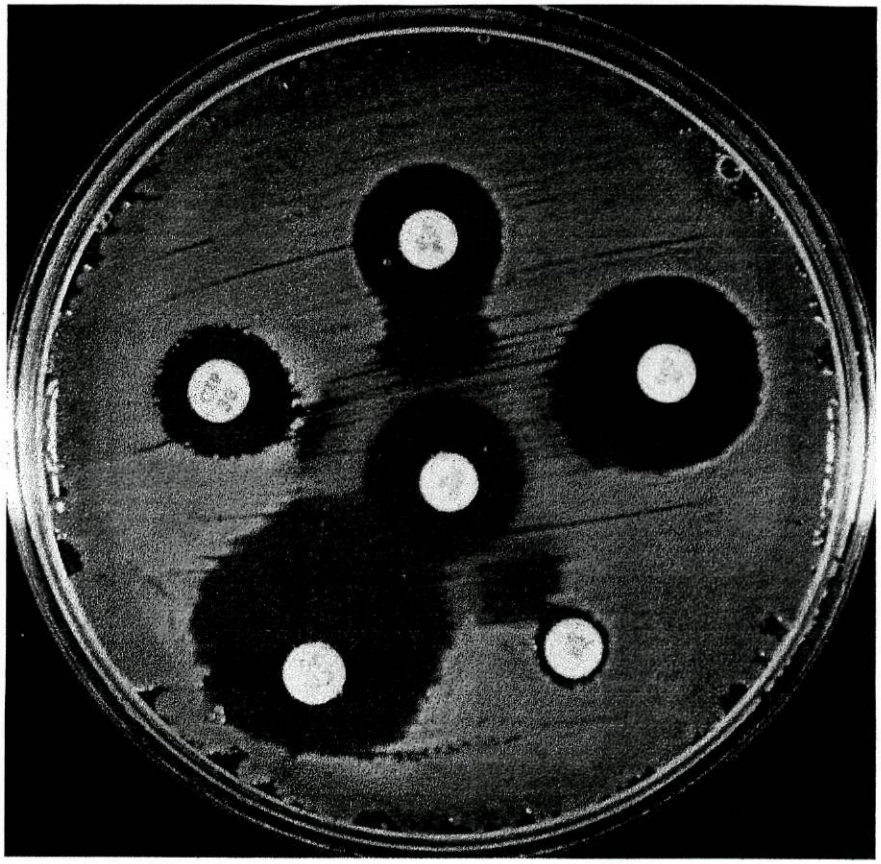


Figura 10 - Sinergismo de cefalosporinas de terceira geração e aztreonamo com ácido clavulânico, detectado pelo teste de dois discos sendo um da associação de amoxicilina com ácido clavulânico (no centro da placa) e os restantes dos antibióticos a que se pretende verificar a acção sinérgica com o ácido clavulânico.

3.3.1.1.2 Determinação do sinergismo por adição de ácido clavulânico

Para a confirmação da presença de β-lactamase de espectro alargado, procedeu-se ao estudo do sinergismo do ácido clavulânico com cefalosporinas da terceira geração e aztreonamo aplicando 10 μg de ácido clavulânico a discos contendo antibiótico. Este teste foi usado para confirmação do sinergismo, em situações em que era dificilmente detectado pelo sinergismo entre os discos de oxiimino-β-lactâmicos e associação amoxicilina+ácido clavulânico.

3.3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória - CMI

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada por E test (AB Biodisk, Sweden), em agar Muller Hinton II (Brown & Brown, 1991), utilizando metodologia, para a produção de inóculo e inoculação das placas, idêntica à utilizada para a determinação do fenótipo de resistência com discos.

3.4 Caracterização das β-lactamases

3.4.1 Focagem isoeléctrica

A determinação do ponto isoeléctrico é fundamental para a caracterização de β-lactamases (Bush,& Sykes, 1986, Bush, 1989, Bush et al.,1995).

O ponto isoeléctrico das β-lactamases a caracterizar foi determinado pelo sistema fornecido pela Pharmacia - Phast System (Huovinen,1988) e pelo método macro (Mathew et al., 1975), com placas preparadas por nós, de acordo com as instruções fornecidas por Antone Medeiros - Miriam Hospital - Providence - Rhode Island. Resumidamente, a focagem isoeléctria é levada a cabo em placas de gele de poliacrilamida produzidas num molde de vidro. A composição do gele é a seguinte: acrilamida (70 mg/ml), NN'-metilenebisacrilamida (2mg/ml), NNN'N'-tetrametiletilene-diamina - TEMED - (0,25 µg/ml), riboflavina (0,002 mg/ml), Pharmalyte 3-9 10 mg/ml - Pharmacia). Os componentes são todos juntos excepto a riboflavina e a mistura é desgaseificada. Após a adição da solução de riboflavina a mistura é homogeneizada cuidadosamente colocada de imediato no molde de vidro e posta a polimerizar em presença de luz do dia ou artificial u.v., durante 2 horas.

As amostras dos extractos a testar são aplicadas na superfície do gele e é aplicado campo eléctrico de 1000 volt, 10 W durante 2 horas a "power" constante. Foi usado sistema com refrigeração do gele, multiphor II- Pharmacia - LKB - Upsala - Sweeden. Usou-se como soluções de eléctrodo 5% acido fosfórico e 5% etanolamina.

Usaram-se como padrões de ponto isoeléctrico, extractos brutos de estirpes padrão produtoras de β-lactamases (Quadro 2).

A revelação do gele foi feita por sobreposição de papel de filtro embebido em solução 0,5 mg/ml de nitrocefin.

Estirpe *E.coli*	plasmídeo	β-lactamase	pI
UCB1	pBR322	TEM-1	5,4
C600	pCFF 14	CAZ-1	5,6
K12 J53	pUD16	TEM-4	5,9
C600	pCFF 34	CAZ-2	6,0
C600	pCFF 84	CAZ-7	6,3
C600	pCFF 74	CAZ-6	6,5
K12 J53	pK504	OHIO-1	7,0
K12 J53	p453	SHV-1	7,6
TG1	pMM1	SHV-5	8,2
C600	pMLC28	MIR-1	8,4

Quadro 2- Estirpes produtoras de β-lactamase usadas como referência para focagem isoeléctrica

Proteínas que parecem idênticas relativamente às propriedades bioquímicas e imunológicas podem ser caracterizadas por focagem isoeléctrica. Este método foi aplicado às β-lactamases, aproveitando a vantagem da revelação diferencial com cefalosporina cromogénica, não implicando purificação prévia do extracto bacteriano a analisar (Mathew et al., 1975).

Preparação do extracto

Produz-se uma cultura exponencial em TSB a partir de uma diluição 1/10 de uma cultura de 18 horas em TSB, por incubação com agitação cerca de 3 a 4 horas. As células desta cultura são sedimentadas por centrifugação a 5000 rpm a 4°C, e lavadas com água destilada refrigerada. O sedimento é suspenso em 2 ml de água e tratado com ultra-sons com 4 ciclos de 30 segundos, com 30 segundos de intervalo, mantendo o extracto em banho de gelo fundente. Este extracto sonicado é centrifugado a 10 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante é filtrado por membrana esterilizante. Este extracto é verificado previamente quanto à presença de β-lactamase por incubação com solução de nitrocefin 0,5 mg/ml, e congelado a -20 °C até utilização.

3.4.2 Cinética enzimática

O estudo das enzimas em acção, cinética enzimática, reveste-se de grande importância na caracterização das β-lactamases pois representa a verdadeira atitude catalítica da enzima, mostrando as preferências de substrato de cada tipo.

Nas reacções enzimáticas que seguem a lei de Michaelis-Menten, à medida que a reacção enzimática progride a concentração de substrato diminui e a velocidade diminui aproximando-se de zero para um tempo infinito e normalmente os produtos de reacção acumulam-se no meio reaccional. No caso particular do tipo de ensaio utilizado os produtos de reacção são neutralizados, não influenciando o percurso da mesma.

A velocidade de reacção corresponde ao declive da tangente da curva de concentração de produto em função do tempo, neste caso concreto corresponde ao consumo de titulante (variação de volume de titulante) em função do tempo. A maioria dos ensaios enzimáticos na sua generalidade baseia-se numa estimativa da velocidade inicial, extrapolada a partir do declive da tangente da curva no tempo zero.

Para permitir a comparação entre experiências, as velocidades absolutas deverão ser convertidas em velocidades relativas, neste caso concreto a comparação é feita considerando a velocidade da enzima relativamente à penicilina como 100.

A cinética enzimática das β-lactamases poderá ser estudada por potenciometria, tirando vantagem das especificidades do tipo de reacção que estas enzimas catalizam.
Esta determinação baseia-se no facto de as β-lactamases catalizarem a hidrólise do anel β-lactâmico formando-se o ácido correspondente (penicilóico ou cefalosporóico) que será quantitativamente neutralizado por uma base titulada.
Através de titulação em pHstat promove-se a adição de titulante, mantendo o pH constante.

Na reacção catalisada pelas β-lactamases, o substrato β-lactâmico é hidrolisado levando à abertura do anel e à produção de um ácido correspondente ao agente inicial. Esta alteração da molécula do substrato pela enzima, é específica e condicionada, em determinadas condições experimentais, exclusivamente pela acção da enzima. A alteração química no meio reaccional manifestar-se-á pela alteração do pH do meio, em função da progressão da reacção, até determinados limites em que esta alteração poderá comprometer a própria actuação da enzima e progressão da reacção. Desta forma, a progressão da reacção poderá ser seguida por potenciometria, uma vez que o seguimento da reacção poderá ser feito por eléctrodo sensível a protão. Contudo a manutenção das condições experimentais necessárias ao bom funcionamento enzimático implicam que se trabalhe em condições de pH e temperatura que forneçam boas condições do meio reaccional para a actuação da enzima. Estas condições experimentais podem conseguir-se trabalhando a pHstat em cuba termostatada.

O interesse deste método, embora descrito há vários anos (Hou & Poole, 1972, Labia, Andrillon & Le Goffic, 1973 e Kazmierczak, et al., 1973), é demonstrado por publicações recentes na área, em que a caracterização enzimática de uma nova enzima é feita pelo método microacidimétrico automatizado (Chanal-Claris et al., 1997).
Devido à especificidade da reacção enzimática, e à especificidade do sistema de detecção, este método permite a utilização do extracto enzimático bruto uma vez que está livre das interferências introduzidas em outros métodos (Hou & Poole, 1972).

A determinação da cinética enzimática foi executada no laboratório de Química Física da Faculdade de Farmácia do Porto tendo contado com a preciosa colaboração do Prof. Dr. Rui Lapa na montagem e automatização do processo.

Os ensaios foram levados a cabo em cuba termostatada, em condições constantes de temperatura 37°C e pH 7. O meio reaccional é neutralizado com uma solução de hidróxido de sódio 10^{-3} M dispensada por bureta accionada automaticamente de forma a manter o pH constante ao longo da reacção - pHstat. A aquisição de sinal do potencial é feita por um conversor analógico digital ligado ao potenciómetro que permite um melhor seguimento da reacção, reduzindo as variações de pH temporárias ao longo da mesma.

No meio de reacção temos um eléctrodo de vidro, um eléctrodo de referência, um agitador e um "dispenser" de titulante.

A solução de reacção contendo o antibiótico em concentração adequada é preparada em solução de cloreto de sódio 5 g/l.

As soluções de antibiótico são preparadas em solução de cloreto de sódio 5 g/l e mantidas refrigeradas.

A reacção é iniciada por adição da quantidade adequada de extracto enzimático, de forma a obter uma reacção de duração entre 6 e 10 minutos após prévia neutralização da solução de antibiótico em estudo (figura 11).

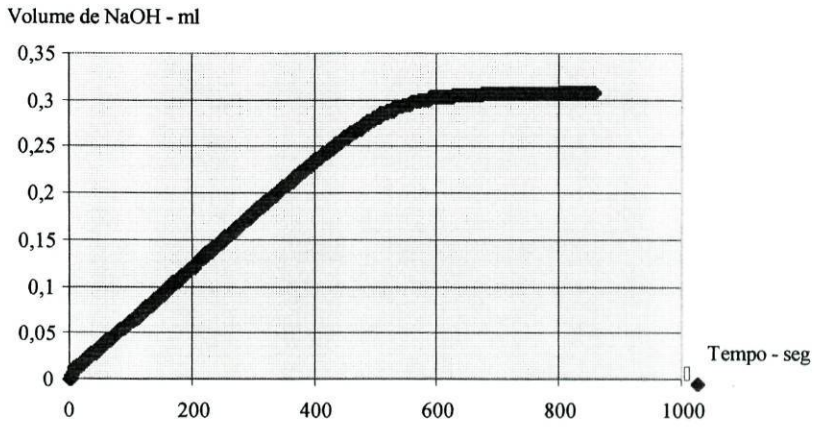


Figura 11 - Exemplo do gráfico resultante da totalidade do ensaio para uma concentração de substrato de 100 μM em que se pode observar o final da reacção

A cinética da reacção é determinada pelo consumo de titulante com o tempo em condições de pH constante, sendo analisados os primeiros 330 segundos (dando 30 segundos de homogeneização e estabilização do meio reaccional) (figura 12).

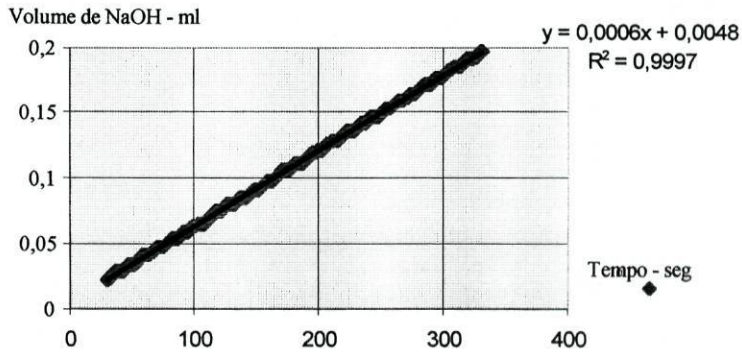


Figura 12 - Exemplo do gráfico resultante de um ensaio típico, apresentando a correlação do ensaio para os 300 segundos de seguimento da reacção considerados para a determinação da velocidade

Como normalmente as determinações são apresentadas relativamente a um antibiótico considerado como referência e usado como 100%, neste caso a penicilina, a variação do volume de titulante por unidade de tempo, por unidade de volume do extracto enzimático, está correlacionada com a velocidade relativa da enzima em relação a cada substrato para determinada concentração do mesmo. Desta forma, permite-nos determinar as velocidades de hidrólise relativas da enzima em relação a cada substrato usando a mesma concentração, permitindo ver quais as preferências de substrato da enzima. Fazendo o estudo para diferentes concentrações de substrato permite ter ideia acerca da afinidade da enzima para cada substrato.

Trabalhando a concentrações próximas da saturação - 10 Km - poderemos ter uma ideia da velocidade máxima real da enzima, obviando os erros introduzidos por extrapolações produzidas, por vezes, a partir de estudos em condições de concentração de substrato muito abaixo do Km para determinadas enzimas e determinados substratos, o que poderá não representar a atitude catalítica da enzima real. Este fenómeno é comum em enzimas

que apresentam uma baixa afinidade (Km elevado) para determinados substratos, apresentando contudo uma eficiência hidrolítica apreciável, à custa de uma velocidade máxima elevada, comum nas enzimas mutantes derivadas das ancestrais TEM e SHV.
Foi verificado experimentalmente que, entre determinados limites, a velocidade de reacção era proporcional à quantidade de enzima para a mesma concentração de substrato e que a velocidade variava com a concentração de substrato para a mesma quantidade de enzima.

Preparação do extracto

O extracto bruto é preparado a partir de uma cultura de 18 horas com agitação, em 200 ml de TSB, centrifugada a 5000 r.p.m. a 4°C e lavada com solução de cloreto de sódio 0,9%, suspensa em 3ml de solução de cloreto de sódio 5g/l, tratada com ultra-sons com 4 ciclos de 30 segundos com 30 segundos de intervalo, em gelo fundente. Após centrifugação a 10000 rpm a 4 °C o sobrenadante é filtrado por membrana esterilizante constituindo o extracto enzimático bruto. Este extracto é sujeito à confirmação da presença da β-lactamase esperada, bem como da presença de uma única banda com actividade β-lactamásica, por focagem isoeléctrica e revelação com solução de nitrocefin.

Material utilizado na montagem

Bureta automática 2,5 ml
Computador
Potenciómetro
Conversor analógico digital
Eléctrodo de vidro Russel
Eléctrodo de referência
Cuba de termostatação
Banho termostatado com circulação

Determinámos a hidrólise de substrato para concentrações de 100 μM e 500 μM, no intuito de termos alguma informação acerca da velocidade máxima da enzima para determinado substrato, considerando que para a maioria dos casos esta seria uma situação em que estaríamos próximo da saturação e em que portanto a velocidade de hidrólise deveria ser representativa da velocidade máxima, ou pelo menos daria uma informação próxima da realidade.

Para algumas enzimas e alguns substratos o estado de saturação da enzima é muito improvável em condições fisiológicas. A utilização destas concentrações de substrato dá-nos uma ideia do comportamento da enzima em diferentes condições.

Em situações em que o Km é elevado a velocidade de hidrólise relativa para determinada concentração de substrato poderá fornecer dados mais de acordo com o que se passa *in vivo*, uma vez que as concentrações de substrato que se atingem nessas condições poderão estar longe das de saturação da enzima e como tal a velocidade de hidrólise poderá ser significativamente diferente da máxima. Contudo, esta é uma abordagem sugerida, com o objectivo de comparar enzimas nas suas características catalíticas. Apesar de a eficiência catalítica da enzima ser melhor representada pela razão V_{max}/K_m, as velocidades de hidrólise relativa continuam a ser usadas para descriminar entre grupos (Bush, Jacoby & Medeiros, 1995).

3.5 Caracterização genómica dos isolados clínicos

3.5.1 Perfil de restrição do DNA genómico por pulsed-field gel electrophoresis - PFGE

A análise dos perfis de restrição do DNA genómico por PFGE é uma das técnicas recentes de tipagem de estirpes no sentido de relacionar um grupo de isolados bacterianos (Tenover, et al., 1995). Esta técnica constitui uma variante de RFLP (restriction fragment length polymorphism) que consiste na separação electroforética de fragmentos de DNA

de elevado peso molecular gerados por enzima de baixa frequência de corte usada na restrição do DNA genómico.

Estudos comparativos têm demonstrado para a maioria das espécies, que isolados indistinguíveis por PFGE não demonstraram diferenças significativas por outros métodos de tipagem.

O DNA genómico foi preparado em blocos de agarose de baixo ponto de fusão e gelificação (Seaplaque - FMC) a 1,5%. As estirpes inoculadas em agar Muller-Hinton, foram suspensas em tampão (10 mM Tris, 1 M NaCl, pH 7,6) até uma densidade óptica de cerca de 1,25 a 650 nm. As suspensões bacterianas foram incorporadas em igual volume de agar a 1%, e preparados blocos de agarose em moldes adequados, trabalhando em gelo fundente. Esta mistura, após gelificação, foi tratada com uma solução de lise constituída por 6 mM Tris, 1 M NaCl, 100 mM EDTA (pH 7,6), com 20 μg/ml de RNAse, 1 mg/ml de lisozima, 0,5% de Sarcosyl e 100 μg/ml de proteínase K, durante 48 horas a 37°C. Os blocos de agarose são lavados 4 vezes, com tampão TE (10 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,6), durante 2 horas a 37°C.

Os blocos assim tratados serão sujeitos à digestão com enzima de restrição de baixa frequência de corte , Xba I, e concentração adequada, de acordo com as indicações do fornecedor, em tampão adequado, incubados durante 18 horas a 37°C. Os blocos são lavados com TBE durante 30 minutos e os fragmentos de DNA obtidos, são separados em gele de agarose a 1% em tampão 0,5 x TBE (Tris borato EDTA) no sistema CHEF-DrII Bio-Rad - (contour-clamped homogeneous electric field), com pulsos de 40 a 1 segundos durante 22 horas a 200 volt. Os geles são posteriormente corados durante 30 minutos com solução de brometo de etídeo (0,5 μg/ml) e fotografados.

3.6 Outros mecanismos que condicionam a resistência aos β-lactâmicos

3.6.1 Análise de proteínas da membrana externa

A caracterização das proteínas da membrana externa de alguns isolados clínicos resistentes à cefoxitina, foi feita por electroforese em gele de poliacrilamida desnaturante com SDS, SDS-PAGE, após extracção das proteínas da membrana externa por um processo que envolve a eliminação das proteínas da membrana citoplasmática. As proteínas da membrana externa foram isoladas como material não solubilizado por laurilsarcosinato de sódio.

A caracterização das proteínas da membrana externa contou com a colaboração da Drª Olga Cardoso da Faculdade de Farmácia de Coimbra.

As proteínas da membrana externa foram preparadas, segundo Lynch e colaboradores (Lynch, Drusano & Mobley, 1987), a partir da inoculação de 500 ml de caldo, TSB com um pré-inóculo produzido por cultura de 18 horas com agitação igualmente em TSB, até D.O. a 650 nm de 1 (cultura exponencial). As células foram centrifugadas a 10000 rpm, durante 20 minutos a 4°C e lavadas em tampão PBS 10 mM pH 7,2. O sedimento foi suspenso em 5 ml de tampão fosfato 10 mM pH 7,0 contendo 140 mM de 2mercaptoetanol e tratado com ultra-sonscom 2 ciclos de 30 segundos com 30 de intervalo. As células intactas foram removidas por centrifugação a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C e as membranas foram sedimentadas por ultracentrifugação a 180000 g, durante 60 minutos a 4°C. O sedimento das membranas foi lavado com tampão fosfato 10 mM pH 7,0, e suspenso em 5 ml tampão fosfato com 1% de Sarkosyl e incubado 20 minutos à temperatura ambiente, sendo posteriormente ultracentrifugado a 180000 g, durante 30 minutos à temperatura ambiente e lavado com solução a 1% de Sarkosyl em PBS pH 7,2. Após ultracentrifugação a 180000 g, durante 30 minutos à temperatura ambiente o sedimento é suspenso em 150 µl de água destilada. Esta suspensão constitui a

amostra de proteínas da membrana externa que será sujeita a electroforese em gele de poliacrilamida com SDS, após determinação da concentração proteica.
A determinação da concentração proteica, foi feita pelo método de Bradford (Bradford, 1976) usando como padrão solução de albumina bovina a 1 mg/ml.

A electroforese das proteínas da membrana externa foi feita em condições desnaturantes, permitindo desta forma comparar a masssa das moléculas de acordo com a sua mobilidade electroforética (Laemmli,1970). Foi usado um gele de concentração de 5% e um gele de separação de 14%. A revelação foi feita com azul Coomassie. Foi usada uma intensidade de corrente de 3 mA/cm de gele. Usando para a preparação do gele de concentração o tampão Tris/HCl, 0,25 M, pH 7,1, para o gele de separação Tris/HCl, 1 M, pH 8,8 e para a tina de electroforese Tris 0,125 M, glicina 0,96 M, pH8,3.
Foi usado como marcador de peso molecular, MW-SDS-70L Sigma, com fracções de 14,2, 20,1, 24,0, 29,0, 36,09, 45,0, 66,0.

3.7 Resistências associadas

O comportamento face a quinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, SXT, foi determinado pelo método de difusão em agar e em alguns casos pela CMI.

3.8 Caracterização de enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos

Este estudo foi feito em colaboração com Schering-Plough Research Institute, no âmbito de estudos internacionais alargados das resistências aos aminoglicosídeos (Miller, et al. 1997, Miller & Aminoglycoside Resistance Study Groups, 1994, The Aminoglycoside Resistance Study Groups 1995, 1995a, 1995b, The Aminoglycoside Resistance Study Groups, and Miller et al.,1995, Miller et al.,1995, Ferreira et al. 1993, Ferreira et al. 1994).

Resumidamente, o estudo envolveu a determinação do fenótipo de resistência pelo método de difusão em agar, a um conjunto de 12 aminoglicosídeos: apramicina (100), fortimicina (100), 6'-Netilmicina (100), 2'-Netilmicina (100), Gentamicina (10), Tobramicina (10), Amicacina (30), Isepamicina (30), Netilmicina (30), 5-episisomicina (10), Canamicina (30), Neomicina (30), (entre parêntesis está indicada a concentração de antibiótico do disco) - fornecidos por Schering-Plough Research Institute, o qual permite prever qual o tipo de enzima responsável pela resistência a estes agentes. Posteriormente foi feita a verificação da presença do gene codificador das enzimas nos isolados clínicos por hibridização de DNA com várias sondas específicas para cada gene. Os mecanismos de resistência foram determinados de acordo com a correlação entre os dois métodos.

Procedeu-se à fixação do DNA em "Dot blot" em papel Gene Screen plus, de cerca de 20 µl das culturas em caldo TSB usadas para a determinação do fenótipo de resistência, enriquecidas com mais 18 horas de incubação, para que o inóculo seja adequado ao processo de detecção. Os filtros foram tratados com solução de NAOH, 0,5 N, durante 5 minutos, com tampão Tris 1 M pH 7 durante 5 minutos, de novo com tampão Tris 1 M pH 7 durante 3 minutos e secos à temperatura ambiente. Foi repetido este procedimento para tantos filtros quantas as sondas a aplicar. Foi feita pré-hibridização durante 4 horas a a 42°C com solução constituída por 50% formamida, 1% SDS, 1M NaCl, 10% sulfato de dextrano, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão sonicado. Foi feita a hibridização durante 18 horas a 42°C com 106 dpm (desintegrations per minute)/ml de sonda marcada com P^{32} em 5 ml da mesma solução. Após lavagem a 55° C, com solução 0,3 M NaCl,

0,03 M citrato de sódio e 0,1% SDS - 30 minutos, e com solução 0,015 M NaCl, 0,0015 M citrato de sódio e 0,1% SDS - 30 minutos, os filtros são secos à temperatura ambiente e expostos à película de Raios X (XAR-5 - Kodak), durante 2 dias a -70°C com écran intensificador. O aparecimento de um mancha negra na película de autoradiografia, no local de aplicação, implica a presença do gene pesquisado especificamente por esta sonda, no isolado clínico.

A hibridização dos isolados clínicos, foi executada nas instalações de Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, New Jersey, USA.

3.9 Transferência do determinante genético das β-lactamases

A capacidade de transferência do determinante genético que condicionava a resistência foi testada por conjugação. Transformação foi usada para as estirpes que pelo facto de serem multiresistentes não apresentavam possibilidade de usar marcador de resistência adequado à contra selecção.

3.9.1 Conjugação

Foram usadas como estirpes receptoras *E. coli* K802N, Nal R, K12, Nal R, HB101, Strepto R.

O "matting" foi feito a partir de culturas em fase exponencial de crescimento , D.O. a 650nm 0,5, juntando iguais volumes da receptora e da dadora à superfície de uma placa de agar Muller-Hinton e incubadas 18 horas a 37°C. O crescimento obtido foi suspenso na sua totalidade em 1 ml de soro fisiológico estéril e 100 µl desta suspensão foram plaqueados em placas de meio selectivo adequado e incubadas durante 24 a 48 horas a 37°C.

A selecção foi feita em placas de MacConckey, contendo ácido nalidíxico na concentração de 100 μg/ml e ceftazidima, ou aztreonam na concentração de 10 μg/ml, ampicilina 100 μg/ml, cefotaxima 0,5 μg/ml e cefoxitina 50 μg/ml.

A selecção foi feita paralelamente em meio contendo ceftazidima (10 μg/ml) e em meio contendo ampicilina para tentar a separação de TEM-1 da β-lactamase de espectro alargado. Relativamente às estirpes produtoras de enzima condicionando nível de resistência baixo, foi feita selecção paralela em meio contendo cefotaxima (0,5 μg/ml) e em meio contendo ampicilina.

As colónias obtidas foram verificadas através de nova inoculação em meio selectivo, seguida de verificação da transferência da resistência por antibiograma, e confirmação da presença da ou das β-lactamases por focagem isoeléctrica.

O aparecimento de colónias de *Klebsiella pneumoniae* que adquiriam resistência ao ácido nalidíxico em alguns casos atesta da capacidade de mutação espontânea induzida pelo ácido nalidíxico nestas estirpes, dificultando por vezes a selecção e sendo necessário aumentar a concentração de contra selecção do ácido nalidíxico relativamente à sugerida para *E.coli* (Courvalin et al., 1985). Este facto atesta a facilidade de desenvolvimento de mutantes resistentes em *Klebsiella pneumoniae* (Sanders et al., 1984). O mesmo acontecia nos casos de selecção com cefoxitina em que as colónias que apareciam no meio de selecção eram colónias de *Klebsiella* e não de transconjugantes, que haviam adquirido resistência ao antibiótico de contra selecção.

3.9.2 Transformação

Os transformantes foram obtidos por incubação de 200 μl de células competentes durante 60 minutos em gelo fundente com 10 μl de solução de DNA em água estéril. Procedeu-se ao choque térmico durante 2 minutos a 42°C, após o que as células foram incubadas com 1 ml de TSB pré-aquecido a 37°C durante 2 horas. As células foram sedimentadas por centrifugação e o pellet foi suspenso em 200 μl de soro fisiológico estéril e foram

plaqueados 100 µl desta suspensão em meio selectivo contendo ceftazidima e 50 µl desta suspensão foram plaqueados em meio selectivo contendo ampicilina.
A selecção foi feita em placas de ceftazidima ou aztreonam com concentração de 10 µg/ml, cefotaxima 0,5 µg/ml e cefoxitina 50 µg/ml. As colónias obtidas foram verificadas através de nova inoculação em meio selectivo, seguida de verificação da transferência da resistência por antibiograma, e confirmação da presença da ou das β-lactamases por focagem isoeléctrica.

Preparação das células competentes

As células competentes foram preparadas a partir da estirpe HB101 de acordo com a seguinte metodologia (Sambrook et al. 1989).
A partir de uma cultura de 18 horas em meio SOB suplementado com 0,01 M de cloreto de magnésio, inocula-se 100 ml de meio SOB + Mg^{2+} com 1 ml de pré-inóculo com agitação a 37°C até D.O. a 660nm de 0,48. Pára-se o crescimento em gelo fundente. Centrifuga-se a 4 rpm, durante 5 minutos a 4°C. Retira-se o sobrenadante e suspende-se em 30 ml de TfB1, centrifuga-se nas mesmas condições referidas e retira-se o sobrenadante. Ressuspende-se em 4 ml de Tfb2 e separam-se alíquotas de 200 µl em tubos de Eppendorf estéreis, congela-se de imediato com mistura de gelo seco e etanol e conservam-se a -70°C.

O estado de competência é verificado por transformação com DNA de PBR322 extraído pelo mesmo método dos isolados clínicos e seleccionados os transformantes em placas de meio selectivo contendo 100 µg/ml de ampicilina.

3.10 Análise do DNA plasmídico

A extracção do DNA plasmídico foi executada pelo método de Kado e Liu (Kado & Liu, 1981) tanto nos isolados clínicos como nos transconjugantes e transformantes e foi igualmente a técnica usada para a extracção de DNA plasmídico para a transformação. Resumidamente, 1 ml de cultura exponencial obtida em presença do antibiótico, da estirpe a estudar é lisado com uma mistura de 1% SDS, 0,2 N NaOH e 100 mM tris, durante cerca de 10 minutos, procedendo-se posteriormente extracção do DNA plasmídico através de agitação suave com mistura de fenol/clorofórmio 1:1 seguida de centrifugação a 1300 rpm. A fase aquosa é recolhida cuidadosamente para outro tubo de Eppendorf e repetida a extracção com fenol/clorofórmio. O DNA plasmídico é precipitado por tratamento desta fase aquosa com 2,5 volumes de etanol absoluto arrefecido a -20°C em presença de 1/10 do volume da fase aquosa de Acetato de sódio a pH 4,8. A precipitação é favorecida por incubação a -20°C de pelo menos 15 minutos. Separa-se o DNA por centrifugação a 13000 rpm durante 4 minutos, rejeita-se o sobrenadante e o sedimento é lavado com etanol a 70%, seco e dissolvido em água destilada estéril.

A análise do DNA plasmídico foi feita por electroforese em gele de agarose de concentração entre 0,6 e 0,7%, a cerca de 4V/cm em TAE. A observação do DNA plasmídico foi feita após coloração com solução 0,5 μg/ml de brometo de etídeo durante 30 minutos e observação sob fonte de luz ultra-violeta e fotografado com película polaroid 667.

Os tamanhos aproximados dos plasmídeos referidos foram determinados por comparação com estirpes que apresentam plasmídeos de peso molecular conhecido e plasmídeos conhecidos em estirpes padrão
Estirpes - *E.coli* VR1 e V517
Plasmídeos - pCFF14 de 150 Kb e pCFF34 de 85 Kb

Estas técnicas, contaram com a colaboração da Prof.ª Dr.ª Luísa Peixe, com valiosas sugestões relativamente ao acerto das condições experimentais.

3.11 Verificação "in vitro" do efeito de pressão antibiótica exercida em isolado produtor de enzima que condiciona nível baixo de resistência aos oxiimino-β-lactâmicos

Um isolado tipo produtor de β-lactamases de pI 5,4 e 7,6 e apresentando perfil de resistência característico dos isolados que apresentam nível de resistência baixo, foi cultivado em meio líquido (TSB) com concentrações crescentes de ceftazidima ou aztreonamo. As culturas foram subcultivadas várias vezes até se atingir uma concentração de antibiótico de 120 μg/ml. Da última cultura foi avaliado o comportamento da estirpe frente a amoxicilina, cefuroxima, ceftazidima, aztreonamo, cefotaxima, ceftriaxona, cefoxitina e amoxicilina+ácido clavulânico por determinação da CMI. Paralelamente foram verificadas por focagem isoeléctrica as β-lactamases presentes no extracto bruto produzido a partir desta cultura.

A obtenção deste mutante, foi baseada em trabalhos em que a pressão selectiva directa selecciona estirpes com resistência aumentada permitindo o isolamento de mutantes produtores de enzimas cujas características se alteraram no sentido previsto (Hall & Knowles, 1976, Du Bois, Marriot & Amyes, 1993).

Resultados

4. Resultados

A análise dos fenótipos de resistência das estirpes seleccionadas demonstra comportamentos definidos de acordo com o Hospital e a data do isolamento da estirpe.

O comportamento das estirpes será apresentado por ordem cronológica dos isolados obtidos em cada hospital, referindo as características genotípicas e fenotípicas de cada uma.
A comparação do comportamento das várias estirpes é apresentado referindo o tipo de perfil de restrição do DNA genómico obtido por PFGE, ponto isoeléctrico das β-lactamases presentes, genes que codificam enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos detectados por hibridização e resistência a outros agentes antibacterianos.

Nos casos em que foi possível obter informação, é indicado o produto de que a estirpe foi isolada, bem como a unidade hospitalar.

Os perfis de restrição de DNA genómico obtidos por PFGE, foram referenciados da seguinte forma:
os perfis principais foram referenciados por letras, e os subtipos por numeração romana anexa à letra do tipo principal, por exemplo A I - estirpes relacionadas com o tipo principal A, diferindo em um acontecimento genético, AII - estirpes relacionadas com o tipo principal A, diferindo em dois acontecimentos genéticos.

4.1 Relações genotípicas e fenotípicas dos isolados clínicos por ordem cronológica do isolamento

Quadro 3 - Hospital de S. João

Isolado clínico	Produto	PFGE	ponto isoeléctrico	Enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos	Resistências associadas
9	urina	N	5,4+5,9+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C
13	urina	O	5,4+5,9+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C Fox
800	urina	E	5,4+7,6	APH(3')-I	C SXT
999	urina	P	5,9+7,6	AAC(3)-II	Te
1887	urina	P I	5,4+5,9+6,8+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I+AAC(6')-I	Te C
1899	pús	B	5,4+7,6+8,2	AAC(6')-IV*+APH(3')-I	Te C SXT
1900	exsud.	A	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	SXT
1901	urina	C	5,4+7,6+8,2	AAC(6')-IV*	Te C SXT
1905	pús	K	7,6	Normal	Normal
1915	urina	F	5,4+7,6	APH(3')-I	Te C SXT
1920	urina	B	5,4+7,6+8,2	AAC(6')-IV*+APH(3')-I	Te C SXT Fox
1923	Sec. bron.	G	5,4+5,9+6,8+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I+AAC(6')-I	Te C
1941	urina	U	5,4+7,6+8,2	AAC(6')-IV*+APH(3')-I	Te C SXT
1984	expect.	U	5,4+7,6+8,2	AAC(6')-IV*+APH(3')-I	Te C SXT
2239	urina	U I	5,4+7,6+8,2		Te C SXT
2429	urina	V	7,6	Normal	Te
2430	urina	X	5,4+7,6+8,2	AAC(6')-IV*+APH(3')-I	Te C SXT Fox
2493	expect.	A I.	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C
2519	sangue	D	8,2	Normal	Normal
2549	urina	D	8,2	Normal	Normal
2953	urina	A I:	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT

* determinado fenotipicamente e de acordo com resultados de hibridização com sondas para outros genes, aguarda confirmação por hibridização com sonda para gene AAC(6')-IV

Estirpes de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no Hospital de S.João de 1989 a 1991

Quadro 4 - Centro Hospitalar Vale de Sousa

Isolado clínico	Unidade hospitalar / Idade	Produto	PFGE	ponto isoeléctrico	Enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos	Resistências associadas
2990		urina	A I	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	C SXT
2998		urina	A	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT
2999		expect.	A	5,4+7,6		Te C SXT
3049		urina	A	5,4+7,6		Te C SXT
3050		urina	A	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT
3076		expect.	A	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	
3078		gástrico	A	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT
3091		urina	A	5,4+7,6		Te C SXT
3202		urina	A	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT
3268		urina	A	5,4+7,6		Te C SXT
3387	Med / 67	expect.	A	5,4+8,2	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT
3389	Gastro/ 82	expect.	A	5,4+8,2	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT
3390		expect.	A	5,4+8,2	AAC(3)-II+APH(3')-I	
3391		urina	A I	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	
3392		urina	A	5,4+8,2	AAC(3)-II+APH(3')-I	
3424	Med / 66	expect.	A	5,4+8,2		Te C SXT
3471		urina	A I+	5,4+8,2		
3473		urina	A	5,4+8,2	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT
3493		expect.	A I+.	5,4+7,6		
3608	Ped/ 1 ano	urina	A I	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT
3631	Ped/9 mes	urina	A I	5,4+7,6		Te C SXT
3632	Ped/ 1 ano	urina	A I	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	
3634	Cir/13anos	pús	A I	5,4+7,6		
3671		urina	A I	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	
3673		urina	A I	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT
3674		urina	A I.	5,4+7,6		
3675		urina	A I	5,4+7,6		
3715		expect.	Q	7,6+8,2	Normal	Te SXT

Estirpes de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no Centro Hospitalar Vale de Sousa 1991/1996

Quadro 5 - Hospital da Prelada

Isolado clínico	Doente	PFGE	ponto isoeléctrico	Enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos	Resistências associadas
3166	A	A	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT
3146	B	A	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT
3149	B	A	5,4+8,2	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT
3150	C	A	5,4+8,2		Te C SXT
3153	B	A	5,4+8,2	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT Fox
3155	B	A	5,4+82		Te C SXT
3154	B	A I.	8,2	Normal	Te
3147	D	A	5,4+8,2	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT
3160	C	A	5,4+8,2	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT

Estirpes de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no Hospital da Prelada em 1991

Quadro 6 - Hospital de S.- Paio de Oleiros

Isolado clínico	Produto	PFGE	ponto isoeléctrico	Enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos	Resistências associadas
2954	pús	A	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT
3075	urina	A	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT

Estirpes de *Klebsiella pneumoniae* isoladas do Hospital de S. Paio de Oleiros

Quadro 7 - Hospital de Ovar

Isolado clínico	Produto	PFGE	ponto isoeléctrico	Enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos	Resistências associadas
3103	urina	A I.	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT

Estirpe de *Klebsiella pneumoniae* isolada do Hospital de Ovar em 1991

Quadro 8 - Hospital Geral de S^{to}. António

Isolado clínico	Unidade hospitalar	Produto	PFGE	ponto isoeléctrico	Enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos	Resistências associadas
3685	Medicina I	expect.	A	5,4+8,2		
3689	Neonatol.	catéter	I I.	5,4+8,2		Fox (outras ND)
3682	Medicina II	sangue	I	5,4+8,2	AAC(3)-II+AAC(6')-I+ANT(2")+AAC(6')-III+APH(3')-I	Te C SXT Nal Cip Fox
3691	UCIP	expect.	W	8,2		
3688	Obs.	urina	I I	8,2	ANT(2")	Te C SXT Nal Cip Fox
3677	Pediat.- Int	urina	R	8,2	Normal	Te C SXT
3678	Neonatol.	sangue	S	5,3	Normal	
3683	Neonatol.	urina	J	5,6	AAC(3)-II	
3681*	Pedat.-cons	urina	A I.	5,4+8,2		
3690	UCIP	expect.	A	5,4+8,2	AAC(3)-II+APH(3')-I	
3686	UCIP	expect.	A	5,4+8,2		
3694	SCI	expect.	A	5,4+8,2	AAC(3)-II+APH(3')-I	C SXT
3687	C.I.	expect.	T	5,3+7,6	Normal	
3684*	Pediat.-cons	urina	A I.	5,4+8,2		C SXT
3693	Pediat.-Int	urina	A I	5,4+7,6	AAC(3)-II+APH(3')-I	Te C SXT
3692	UCIP	expect.	A	5,4+8,2		Fox (outras ND)
3695	Obs	urina	A II	5,4+7,6	Normal	
3679		expect.	A	5,4+8,2	AAC(3)-II+APH(3')-I	Fox (outras ND)
3680		urina	H	5,4	Normal	

* Isolados de datas diferentes do mesmo doente

Estirpes isoladas no Hospital Geral de S^{to}. António entre Fevereiro e Agosto de 1995

I e II - subtipos de um tipo de perfil de DNA genómico, quando acrescentados de outros sinais referem-se a subtipos diferentes, de um mesmo tipo principal

ND - não determinado

Para a confirmação da presença de uma β-lactamase de espectro alargado nestas estirpes, principalmente nas que apresentam nível de resistência baixo, procedeu-se ao estudo do sinergismo do ácido clavulânico com cefalosporinas da terceira geração e aztreonamo por adição de ácido clavulânico a discos contendo antibiótico, para isolados clínicos tipo (são apresentados dois exemplos dos de nível baixo de resistência para demonstrar a variação, embora mantendo o fenótipo típico (quadro 9)).

Antibióticos discos	**5,4+8,2**		**5,4+7,6**		**5,4+7,6**	
	(3387) sem clavul.	clavulânico 10 μg	(3147) sem clavul.	clavulânico 10 μg	(3493) sem clavul.	clavulânico 10 μg
Amoxicilina (10 μg)	6	9	6	9	6	10
Cefotaxima (30 μg)	19	25	19	22	15	24
Ceftriaxona (30 μg)	16	26	19	23	16	26
Ceftazidima (30 μg)	9	21	22	23	19	21
Aztreonamo (30 μg)	6	22	21	25	22	28

Quadro 9 - Influência de ácido clavulânico em isolados clínicos produtores de β-lactamases de espectro alargado diferentes

Para as estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado do tipo SHV, foi possível de acordo com o comportamento face aos vários antibióticos β-lactâmicos, distribuir as estirpes em dois grandes grupos, apresentando dois tipos de comportamento distintos relacionados com o tipo de β-lactamase de espectro alargado presente, que condicionavam diferentes níveis de resistência aos oxiimino-β-lactâmicos (quadro 10). Dentro dos sub-grupos os resultados do estudo do perfil de resistência, apresentam um padrão homogéneo com ligeiras variações (quadro 11).

Antibiótico	Nível de resistência baixo		Nível de resistência elevado	
	7,6 (T2429)	**5,4+7,6** (T1915)	**8,2** (T3677)	**5,4+8,2** (T1920)
Amoxicilina	>256	>256	>256	>256
Piperacilina	96	>256	>256	>256
Amox+clavulânico	4	12	6	12
Cefuroxima	16	16	48	64
Cefoxitina	1,5	6	6	6
Cefotaxima	3	3	12	12
Ceftazidima	3	3	96	96
Ceftriaxona	4	4	4	3
Aztreonamo	0,75	1,5	>256	128
Imipenemo	0,125	0,125	0,125	0,125

Quadro 10 - CMIs dos transconjugantes representantes dos dois níveis de resistência condicionados pela produção de β-lactamases de espectro alargado de pI 8,2 e pI 7,6 e da associação com β-lactamase de pI 5,4, produzidas em sistema isogénico (K802N)

A ausência de correlação entre a velocidade de hidrólise, a constante de afinidade, a quantidade de enzima e a CMI, torna necessário conhecer o comportamento real dos β-lactâmicos na própria bactéria (Phillipon et al., 1988). A transferência das β-lactamases para uma estirpe receptora permite eliminar o efeito de outros mecanismos de resistência associados como é por exemplo o da impermeabilização, permitindo a comparação da acção da β-lactamase num sistema isogénico.

A resistência por vezes é de nível baixo, tendo em conta a CMI, por exemplo 1 a 4 mg/l, o que poderia levar a interpretar o comportamento da estirpe como sensível, contudo impõe-se a detecção destas estirpes (normalmente apresentam halos de inibição para ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona inferiores a 28 mm e CMI inferiores a 4 mg/l por vezes 1 a 2 mg/l) (quadro 10). O efeito destas enzimas poderá ser mascarado por outro mecanismo de resistência, ou pela presença associada de TEM-1(Phillipon et al., 1988). Existem comportamentos típicos em que a razão entre a CMI de ceftazidima e cefotaxima é inferior a 1 e as enzimas conferem nível de resistência baixo (tipo CTX-1, TEM-4, SHV-2, SHV-3), e outros em que essa razão é muito superior a 1 e o nível de resistência para a ceftazidima é elevado (TEM-7, SHV-5).

Factores como número de cópias do plasmídeo, eficiência do promotor e permeabilidade, podem diferir substancialmente entre os isolados clínicos e os transconjugantes obtidos

laboratorialmente, podendo influenciar a resistência mediada pela enzima (Jett et al., 1995).

Valores de halo para cefotaxima inferiores a 30 mm foram considerados como redução da susceptibilidade e a presença de sinergismo com o ácido clavulânico foi considerada evidência de presença de β-lactamase de espectro alargado (Boisivon, et al., 1992).

4.2 Resultados representativos dos isolados clínicos que apresentam nível baixo de resistência aos oxiimino-β-lactâmicos - caracterização da enzima responsável por este fenótipo de resistência

Antibiótico	**Nível baixo de resistência**			
	5,4+7,6		**7,6**	
	Diâmetro halo (mm)	CMI (μg/ml)	Diâmetro halo (mm)	CMI (μg/ml)
Amoxicilina	6	>256	6	>256
Ticarcilina	6		6	
Piperacilina	6	>256	6	96
Amox+clavulânico	10	24	14	4
Cefalotina	6		6	
Cefuroxima	15	16	19	6
Cefoxitina	20-24	4-12	24	1,5
Cefotaxima	18-25	3	22	3
Ceftazidima	20-26	3	25	3
Ceftriaxona	18-23	3	19	4
Aztreonamo	23-27	0,75	29	0,25
Imipenemo	30	0,125	31	0,125

Quadro 11 - Fenótipos típicos dos isolados clínicos que apresentam nível de resistência baixo

O fenótipo de nível baixo de resistência às cefalosporinas de terceira geração e aztreonamo é caracterizado pelos halos médios de inibição de crescimento referidos no quadro 11 e 12, apresentando sinergismo com o ácido clavulânico.

Nos casos em que há diferenças nos resultados, optou-se pela apresentação dos valores extremos dos halos de inibição de crescimento que este fenótipo pode apresentar,

mostrando que por vezes a detecção seria dificultada por valores de sensibilidade ou apenas ligeira redução da sensibilidade, senão fosse dada atenção especial ao sinergismo (quadro 11). A relevância da detecção destas estirpes de nível de resistência baixo é confirmada pela multi-resistência associada e pela correlação genotípica e epidemiológica com estirpes de nível de resistência elevado. Demonstra-se a variedade de comportamentos que as estirpes podem apresentar, embora próximos, que poderão ser devidos a: efeito de inóculo, nível de expressão que pode condicionar maior ou menor resistência e associação de outros mecanismos de resistência.

Antibiótico	**Nível baixo de resistência**			
	7,6 (T2429)		**5,4+7,6** (T1915)	
	Diâmetro halo (mm)	CIM (μg/ml)	Diâmetro halo (mm)	CIM (μg/ml)
Amoxicilina	6	>256	6	>256
Piperacilina	6	>256	6	192
Amox+clavulânico	18	4	13	12
Cefuroxima	16	16	12	24
Cefoxitina	26	6	23	4
Cefotaxima	23	3	18	3
Ceftazidima	24	3	20	3
Ceftriaxona	22	4	19	4
Aztreonamo	29	1,5	28	1,5
Imipenemo	32	0,125	31	0,25

Quadro 12 - Fenótipo condicionado pela produção de β-lactamase de pI 7,6 e pela associação com β-lactamase de pI 5,4 em *E.coli* K802N

De acordo com as últimas sugestões de Bush, Jacoby e Medeiros (Bush, Jacoby & Medeiros, 1995) a caracterização de β-lactamases deverá incluir a determinação de ponto isoeléctrico e perfil de substrato, que representa a atitude catalítica da enzima, demonstrando a sua preferência pelos vários substratos. Assim, o perfil de substrato é obtido por determinação das velocidades de hidrólise relativa para concentrações fixas de substrato. Uma vez que esta será a forma de verificar a eficácia de hidrólise de cada substrato pela enzima. As enzimas de espectro alargado deverão apresentar graus de hidrólise das cefalosporinas da terceira geração relativamente à penicilina superiores a 10% o grau de hidrólise desta (Bush, Jacoby & Medeiros, 1995).

pI 7,6 T2429	Velocidade de hidrólise relativa			
Concentração Substrato	**Penicilina**	**Cefaloridina**	**Cefotaxima**	**Ceftazidima**
100 μM	100	245	45	3,5
500 μM	100	260	47	5,6

Quadro 13 - Resultados de velocidade de hidrólise relativa da enzima de pI 7,6 produzida pelo extracto do transconjugante do isolado 2429, considerando como 100 o valor para penicilina

A análise do perfil de resistência de estirpes que apresentavam um baixo nível de resistência ou apenas de redução da susceptibilidade à cefotaxima e ceftriaxona, apresentando sinergismo com as cefalosporinas de terceira geração e aztreoanmo, associada à presença de uma β-lactamase de pI 7,6 nos extractos das estirpes em questão, fazia-nos suspeitar de SHV-2. As estirpes que apresentam esta enzima apresentam alguma variabilidade relativamente ao nível de resistência, podendo em alguns casos, a sua presença ser sub-avaliada (Podbielski, et al., 1991).

Esta hipótese foi confirmada pelos resultados de velocidade de hidrólise relativa referidos no quadro 13 (Kliebe, et al., 1985, Paul, et al., 1989, Gutmann, et al., 1989, Bush et al., 1995)

4.3 Resultados representativos dos isolados clínicos que apresentam nível elevado de resistência aos oxiimino-β-lactâmicos - caracterização da enzima responsável por este fenótipo de resistência

Antibiótico	**Nível elevado de resistência**			
	5,4+8,2		**8,2**	
	Diâmetro halo (mm)	CMI (μg/ml)	Diâmetro halo (mm)	CMI (μg/ml)
Amoxicilina	6	>256	6	>256
Ticarcilina	6		6	
Piperacilina	6	>256	6	>256
Amox+clavulânico	10	24	20	6
Cefalotina	6		6	
Cefuroxima	6-12	24-256	9	48
Cefoxitina	13-23	4-64	15-25	2-32
Cefotaxima	20	3	20-25	3-16
Ceftazidima	8	>256	6-10	96->256
Ceftriaxona	17	4	17-24	3-12
Aztreonamo	8	>256	6	>256
Imipenemo	30	0,125	34	0,094

Quadro 14 - Fenótipos típicos dos isolados clínicos que apresentam nível de resistência elevado

Antibiótico	**Nível elevado de resistência**			
	8,2 (T3677)		**5,4+8,2** (T1920)	
Amoxicilina	6	>256	6	>256
Piperacilina	6	>256	6	>256
Amox+clavulânico	20	6	14	12
Cefuroxima	7	48	15	64
Cefoxitina	26	6	25	6
Cefotaxima	20	12	18	12
Ceftazidima	6	96	10	96
Ceftriaxona	20	4	18	3
Aztreonamo	6	>256	8	128
Imipenemo	37	0,125	32	0,125

Quadro 15 - Relação entre diâmetro dos halos de inibição e CMIs dos transconjugantes produtores de β-lactamase de pI 8,2 e influência da associação com β-lactamase de pI 5,4 em *E.coli* K802 N

pI 8,2 T3677	Velocidade de hidrólise relativa			
Concentração Substrato	**Penicilina**	**Cefaloridina**	**Cefotaxima**	**Ceftazidima**
100 μM	100	265	111	39
500 μM	100	278	112	40

Quadro 16 - Resultados de velocidade de hidrólise relativa da enzima de pI 8,2 produzida pelo extracto do transconjugante do isolado 3677, considerando como 100 o valor para penicilina

O aparecimento de um fenótipo de resistência caracterizado por uma resistência superior ao aztreonamo do que à ceftazidima associado à presença de uma β-lactamase de pI 8,2 (quadro 14 e 15), fez-nos suspeitar da presença de SHV-5, hipótese que foi confirmada pelos resultados da determinação da velocidade de hidrólise relativa para substratos tipo referidos no quadro 16 (Gutmann et al., 1989, Vatapoulos et al., 1990, Bush et al. 1995).

A redução da susceptibilidade da maioria das estirpes à associação amoxicilina ácido clavulânico, não era explicada pela presença de β-lactamase de espectro alargado que havia sido detectada por sinergismo com este inibidor. A análise por focagem isoeléctrica demonstrou nestes casos, a presença, em associação à β-lactamase de espectro alargado, de uma β-lactamase com ponto isoeléctrico 5,4, cujo comportamento, quando transferida isoladamente, está de acordo com a produção de TEM-1, que deverá ser responsável por este comportamento (quadro 17). Nos casos em que esta redução da susceptibilidade é mais acentuada, poderemos suspeitar de hiperprodução de TEM-1 ou da associação do efeito redução da permeabilidade da membrana que condiciona igualmente o nível de resistência a esta associação (Jacoby, 1994).

Antibiótico	Isolado 3473	Transconjugante T3473*/ K802N	TEM-1 padrão
	5,4+8,2	**5,4**	**5,4**
	Diâmetro (mm)	Diâmetro (mm)	Diâmetro (mm)
Amoxicilina	6	6	6
Piperacilina	6	6	6
Amox+clavulânico	12	15	13
Cefamandole	13	27	20
Cefoxitina	25	21	21
Cefotaxima	25	34	30
Ceftazidima	13	32	29
Ceftriaxona	22	35	31
Aztreonamo	12	33	33
Imipenemo	32	32	30

*O transconjugante T3473 produtor de β-lactamase 5,4 isolada, foi seleccionado com ampicilina/ácido nalidíxico e apresenta plasmídeo de cerca de 20 Kb, não apresentando resistências associadas

Quadro 17 - Influência da β-lactamase 5,4, no fenótipo de resistência

O facto de a estirpe padrão produtora de TEM-1 e o transconjugante produtor de β-lactamase de pI 5,4 isolada, apresentarem comportamento sobreponível, leva-nos a crer que a β-lactamase de pI 5,4 presente em associação com a β-lactamase de espectro alargado, seja do tipo TEM-1, que em alguns isolados em associação com a β-lactamase de espectro alargado, poderá condicionar resistência ou redução da susceptibilidade à associação amoxicilina/ácido clavulânico.

Em algumas estirpes, a redução da susceptibilidade à cefoxitina não transferível (quadro 18), fez-nos suspeitar de alterações da membrana externa que possam justificar este comportamento. Esta hipótese foi estudada através da caracterização do perfil de proteínas da membrana externa, de algumas estirpes tipo, por SDS-PAGE (figura 13).

Antibiótico	Isolado clínico		Transconjugante
	3389 (5,4+8,2)	2430 (5,4+7,6+8,2)	T2430 (K802N) (5,4+8,2)
Amoxicilina	>256	>256	>256
Piperacilina	>256	>256	>256
Amox+clavulânico	24	12	12
Cefuroxima	24	96	64
Cefoxitina	4	32	6
Cefotaxima	3	12	12
Ceftazidima	>256	>256	96
Ceftriaxona	4	12	6
Aztreonamo	>256	>256	128
Imipenemo	0,125	0,125	0,125

Quadro 18 - Influência da produção das enzimas 5,4 e 8,2 e de factores condicionados pelo isolado clínico - influência de alterações da permeabilidade de membrana (exemplo, isolado 2430)

4.4 Resultados de isolados clínicos do Hospital de S. João produtores de β-lactamase de espectro alargado do tipo TEM - caracterização da enzima

No início do estudo foi detectado um tipo diferente de β-lactamase de espectro alargado do tipo TEM, responsável por nível elevado de resistência à ceftazidima, causando surto no Hospital de S. João, posteriormente erradicado.

Antibiótico	**Diâmetro**			
	Isolado 999 **5,9**+7,6	Isolado 1887 5,4+**5,9**+6,8+7,6	Transconjugante 1887 5,4+**5,9**+6,8	Transformante 1887 **5,9**
Amoxicilina	6	6	6	6
Piperacilina	6	6	6	6
Amox +clavulânico	18	13	11	18
Cefuroxima	21	20	24	25
Cefoxitina	22	22	24	29
Cefotaxima	23	30	35	35
Ceftazidima	7	12	13	14
Ceftriaxona	22	28	30	35
Aztreonamo	16	19	25	25
Imipenemo	29	32	37	37

Quadro 19 - Fenótipos de resistência dos isolados clínicos tipo, produtores de β-lactamase de pI 5,9, transconjugantes e transformantes

O aparecimento de β-lactamase de pI 6,8, em estirpes não resistentes a cefalosporinas de terceira geração mas resistentes aos aminoglicosídeos faz-nos pensar que AAC(6')-I neste possa trazer associado o gene que codifica esta β-lactamase embora ela não confira resistência superior aos β-lactâmicos que a TEM-6 isolada, como se pode verificar pela comparação do perfil de resistência e nível de resistência de 999 e 1887.

Antibiótico	**CMI** Isolado 999 5,9	Transformante 1887 5,9
Amoxicilina	>256	>256
Piperacilina	>256	>256
Amox+clavulânico	1	2
Cefuroxima	2	2
Cefoxitina	1,5	1,5
Cefotaxima	0,7	0,25
Ceftazidima	>256	256
Ceftriaxona	0,5	0,5
Aztreonamo	8	6
Imipenemo	0,19	0,094

Quadro 20 - CMIs de isolado clínico e transformante que apresentam β-lactamase de pI 5,9 isolada

pI **5,9** F1887	**Velocidade de hidrólise relativa**			
Concentração Substrato	Penicilina	Cefaloridina	Cefotaxima	Ceftazidima
100 μM	100	80	4,5	33
500 μM	100	130	5,7	97

Quadro 21 - Velocidade de hidrólise relativa da enzima de pI 5,9 produzida pelo extracto do transformante do isolado 1887 considerando o valor para a penicilina como 100

A análise do conjunto dos resultados relativos à β-lactamase de pI 5,9 (quadros 19, 20 e 21) levou-nos a considerá-la TEM-6 (Papanicolaou, Medeiros & Jacoby, 1990, Bush, et al., 1995, Paul et al., 1989).

4.5 Análise de comportamentos específicos de cada Hospital

4.5.1 Hospital de S.João

Isolado clínico	Transconjugante /K802 N			Transformante/ HB101		
	β-lactamase pI	Amino glicosídeos	outras resistências	β-lactamase pI	Amino glicosídeos	outras resistências
9	5,4+5,9		Te C	5,9		Normal
999	5,9	AAC(3)-II	Te	5,9		Te
1887	5,4+5,9+6,8	AAC(3)-II+AAC(6')-I	Te C	5,9	AAC(3)-II	Te
2430	5,4+8,2	AAC(6')-IV+APH(3')-I	Te C	5,4+8,2		

Quadro 22 - Resultados de conjugação e transformação em estirpes tipo, do Hospital de S. João

Isolado clínico	Transconjugante / K802 N ou K12 β-lactamase - pI	Aminoglicosídeos	outras resistências
1899	5,4+8,2	AAC(6')-IV+APH(3')-I	C
1901	5,4+8,2	AAC(6')-IV+APH(3')-I	C
1905	7,6	Normal	
1915	5,4+7,6		
1920	5,4+8,2	AAC(6')-IV+APH(3')-I	C
1984	5,4+8,2	AAC(6')-IV+APH(3')-I	C
2429	7,6	Normal	Te
2430	5,4+8,2	AAC(6')-IV+APH(3')-I	C

Quadro 23 - Resultados de conjugação com estirpes tipo do Hospital de S. João

A determinação do perfil de plasmídeos de isolados clínicos escolhidos, transconjugantes e transformantes demonstrou a presença de um único plasmídeo de cerca de 150 Kb nos isolados clínicos e transconjugantes das estirpes do Hospital de S.João, responsável pela codificação de β-lactamases de pI 5,4 e 8,2.

4.5.2 Hospital de S^{to}. António

Antibiótico	Diâmetro	
	Isolado 3682 5,4+8,2	Transformante 3682 /HB101 8,2
Amoxicilina	6	6
Piperacilina	6	9
Amox+clavulânico	10	17
Cefuroxima	10	14
Cefoxitina	15	27
Cefotaxima	22	22
Ceftazidima	9	14
Ceftriaxona	21	21
Aztreonamo	8	14
Imipenemo	32	32
Ciprofloxacina	13	34
Nalidíxico	6	24
Cloranfenicol	6	25
Thrimetropim sulfametoxazol	6	26

Quadro 24 - Fenótipo de resistência do isolado 3682, típico dos de perfil de restrição de DNA genómico I, do Hospital de S^{to}. António, e do transconjugante, apresentando β-lactamase de pI 8,2

No Hospital Geral de S^{to} António (quadro 8), encontrámos um grupo de seis isolados clínicos (3677, 3682, 3685, 3688, 3689 e 3691) que apresentam um comportamento diferente do das estirpes prevalentes, embora se mantenha o mesmo tipo de β-lactamase de espectro alargado, SHV-5, associada ou não, a TEM-1. Estes isolados pertencem a

tipos diferentes de perfil de restrição do DNA genómico relativamente à estirpe predominante e entre si, indicando a sua não relação com a estirpe prevalente e a sua não interligação o que está de acordo com o facto de neste caso se verificar a transferência do determinante genético da β-lactamase de espectro alargado (quadro 24). Em duas destas estirpes, 3682 e 3688, do mesmo tipo de perfil de DNA genómico, pertencendo a subtipos diferentes (concordante com o facto de serem diferentes em apenas um acontecimento genético relacionado com a perda da enzima de pI 5,4), encontrámos a mesma β-lactamase de espectro alargado mas as resistências aos aminoglicosídeos associadas são diferentes, mantendo-se a resistência às fluoroquinolonas, o que estará de acordo com o facto de serem características codificadas pelo cromossoma relacionado com o facto de serem a mesma estirpe que varia apenas no comportamento codificado por elementos genéticos móveis. O facto de esta β-lactamase ser transferível está concordante com o facto de aparecer isolada em estirpes diferentes. Neste caso teremos de considerar para a disseminação da resistência a disseminação da estirpe e a disseminação do determinante genético da β-lactamase de espectro alargado. Este fenómeno merece especial atenção quanto à sua evolução, devido à sua complexidade e relevância quanto às consequências terapêuticas que pode condicionar, devido ao facto de serem estirpes resistentes à maioria dos antibióticos, excepto imipenemo.

O aparecimento de estirpes resistentes à ciprofloxacina, poderá representar mutações cromossómicas que condicionam a sensibilidade a estes agentes quer por alteração dos alvos de acção, preferencialmente na subunidade A da DNA girase e/ou na subunidade ParC da topoisomerase IV (Deguchi et al., 1997), quer por alterações da permeabilidade, como foi também verificado por Bauernfeind e colaboradores (Bauernfeind, et al., 1993).

Durante este estudo foram encontradas algumas estirpes aparentemente responsáveis por casos esporádicos de infecções por estirpes produtoras de β-lactamase de espectro alargado não relacionadas com as estirpes responsáveis pelo surto pois não apresentam relação genotípica e/ou fenotípica com as estirpes do surto (quadro 25). Nestes casos foi conseguida a transferência da β-lactamase, por conjugação para *E.coli* K802N demonstrando a sua codificação por plasmídeo conjugativo.

Antibiótico	CMI			
	pI 5,3	pI 5,3	pI 5,4	pI 5,6
	3678	3687	3680	3683
Amox+clavulânico	6	8	8	4
Cefotaxima	0,19	0,125	0,19	0,38
Ceftazidima	16	64	48	192
Aztreonamo	1	1,5	1,5	6

Quadro 25 - Fenótipos de isolados clínicos esporádicos

Foram encontradas estirpes produtoras de β-lactamases do tipo TEM que de acordo com o seu ponto isoeléctrico e fenótipo de resistência, determinado pela CMI, nos parecem ser dos seguintes tipos:

A β-lactamase de espectro alargado de pI 5,3, presente nos isolados 3678 e 3687, codificada por plasmídeo de cerca de 150 Kb, foi considerada TEM-12 (CAZ-3) (Chanal et al., 1989).

A β-lactamase de pI 5,4 presente na estirpe 3680, codificada por plasmídeo de cerca de 60 Kb, foi considerada TEM-7 (Gutmann et al., 1988) ou TEM-20 (Bush, Jacoby & Medeiros, 1995).

A β-lactamase de pI 5,6, presente na estirpe 3683, codificada por plasmídeo de cerca de 90 Kb, foi considerada TEM-26 (Hibbert-Rogers et al., 1994).

A estirpe 3683 apresenta a enzima inactivadora de aminoglicosídeos AAC(3)-II, tal como as estirpes produtoras de β-lactamase do mesmo ponto isoeléctrico originárias de Lisboa.

As restantes estirpes deste grupo apresentam um comportamento normal face aos aminoglicosídeos.

4.5.3 **Hospital de S^{ta}. Maria**

As estirpes do Hospital de S^{ta}. Maria apresentam um predomínio de dois tipos de perfil de restrição do DNA genómico.

Foram analisadas 133 estirpes, por determinação do comportamento face aos antibióticos β-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas e em 67 escolhidas aleatoriamente, foram detectadas β-lactamases por focagem isoeléctrica.

A análise dos resultados de focagem isoeléctrica destas estirpes, permitiu verificar o aparecimento de uma β-lactamase de pI 5,6 em todas as estirpes excepto 2 (que foram considerados como casos esporádicos) e de vários agrupamentos de β-lactamases incluindo a β-lactamase de pI 5,6, pelo que foi considerada a β-lactamase de espectro alargado epidémica, neste surto.

A resistência à ceftazidima e aztreonam, condicionada por esta β-lactamase é transferida por conjugação, justificando o seu aparecimento em estirpes de perfil de DNA genómico diferente. Obtiveram-se transconjugantes que apresentam o mesmo fenótipo de resistência, associado à presença desta β-lactamase, verificada por focagem isoeléctrica de extractos dos transconjugantes. Associada a esta β-lactamase, encontrámos a enzima que degrada os aminoglicosídeos AAC(3)-II (quadro 26).

O gene que codifica a β-lactamase de pI 5,6, em algumas estirpes parece estar associado a um outro que codifica a resistência a aminoglicosídeos pela produção da enzima AAC(6')-I e uma outra β-lactamase de pI 6,8 que poderá estar associada a esta enzima inactivadora dos aminoglicosídeos (quadro 26).

Antibiótico	**Diâmetro mm**	
	Perfil **Y**	Perfil **Z**
	β-lactamases **5,6** **5,6**+7,6	β-lactamases **5,6**+6,8 **5,6**+6,8+7,6
Amox+clavulânico	13	12
Cefuroxima	22	20
Cefoxitina	21	20
Cefotaxima	22	21
Ceftazidima	6	6
Aztreonamo	10	10
Imipenemo	28	28
Gentamicina	6	6
Netilmicina	13	6
Amicacina	28	13
Enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos	AAC(3)-II	AAC(3)-II+AAC(6')-I

Quadro 26 - Exemplo dos perfis predominantes das estirpes do Hospital de Sta. Maria

pI 5,6	**Velocidade de hidrólise relativa**			
Substrato	**Penicilina**	**Cefaloridina**	**Cefotaxima**	**Ceftazidima**	**Aztreonam**
100 μM	100	87		107	
1000 μM	100	170	6	500	30

Quadro 27 - Velocidade de hidrólise relativa da β-lactamase de pI 5,6, produzida por extracto de transconjugante produtor desta β-lactamase isolada

Estudos de perfil de substrato, por determinação de velocidades de hidrólise relativa (quadro 27), permitiram considerar esta β-lactamase como sendo do tipo TEM-26 (Soilleux, et al., 1996, Bush et al., 1995, Hibbert-Rogers, et al., 1994).

Esta β-lactamase que já havia aparecido num surto anterior no mesmo Hospital (Duarte A., comunicação pessoal), parece ter-se mantido.

Neste caso, parece haver uma disseminação de 2 estirpes principais, de PFGE tipo Y - 53 e PFGE tipo Z - 35 (com o aparecimento mais frequente do tipo Y no Serviço de Neonatologia), por várias unidades do hospital bem como disseminação do plasmídeo ou gene por outras estirpes.

4.6 Verificação "in vitro" da evolução da resistência em função da pressão selectiva imposta a isolado clínico tipo

Antibiótico	**CMI** Isolado 3166 pI 5,4+7,6	 Mutante 3166 pI 5,4+8,2
Amoxicilina	> 256	> 256
Amox+clavulânico	16	16
Cefuroxima	12	12
Cefoxitina	4	4
Cefotaxima	3	3
Ceftazidima	4	32
Aztreonamo	1	64
Imipenemo	0,125	0,125

Quadro 28 - CMIs de isolado clínico tipo produtor de enzima de pI 7,6 que condiciona nível de resistência baixo e do seu mutante produtor de enzima de pI 8,2

Um isolado clínico tipo, produtor de β-lactamases 5,4 e 7,6 (3166), apresentando nível baixo de resistência, foi sujeito *in vitro* à pressão selectiva de ceftazidima ou aztreonamo, apresentando uma alteração do fenótipo de resistência passando a apresentar maior resistência a ceftazidima e aztreonamo do que a cefotaxima e os extractos passaram a apresentar β-lactamases de pI 5,4 e 8,2 (quadro 28).

Este ensaio foi executado para verificação das alterações de comportamento face aos antibióticos quando estes isolados clínicos são sujeitos a pressão, no intuito de mimetizar a pressão selectiva do tratamento antibiótico a nível hospitalar, tentando explicar o facto anteriormente observado, em que isolados clínicos com o mesmo perfil de restrição de

DNA genómico, apresentam o mesmo perfil plasmídico e apresentam fenótipos de resistência diferentes e β-lactamases diferentes embora da mesma família. Este facto demonstra a capacidade de adaptação das estirpes que apresentam nível baixo de resistência que poderão sofrer mutação responsável pelo aumento da resistência. Este fenómeno deverá ser estudado por técnicas que permitam a detecção de mutações em apenas um aminoácido que poderão ser responsáveis por estas alterações.

4.7 Fenótipo de resistência condicionado pelas enzimas inactivadoras de aminoglicosídeos detectadas nos isolados estudados

Os genes codificadores das enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos detectados por hibridização de DNA com sondas específicas, referidos no quadro geral de comportamento das estirpes, manifestam-se fenotipicamente condicionando resistência aos vários aminoglicosídeos de acordo com o tipo de enzima ou associação de enzimas presente no isolado (quadro 29).

Fenótipo de resistência aos aminoglicosídeos usados para detecção das enzimas inactivadoras	Enzimas presentes nos isolados testados detectadas por hibridização de DNA
6'-Net 2'-Net Gm Tm Net 5-epi K	AAC(3)-II
2'-Net *Gm* Tm Net 5-epi K Am *I*	AAC(6')-I
K N	APH(3')-I
Gm Tm K	ANT(2")-I
2'-Net 5-epi Tm Net K Gm Am *I*	AAC(6')-IV

Para os compostos sublinhados há redução da susceptibilidade, para os sublinhados e apresentados em itálico a redução de susceptibilidade é ligeira

Quadro 29- Relação entre o fenótipo de resistência e as enzimas detectadas por hibridização de DNA

Resultados anteriormente publicados (Ferreira, et al., 1994), em que a um fenótipo de resistência típico da produção de ANT-(2") não correspondia hibridização com o gene da enzima, foi posteriormente justificado pela descoberta de um gene que difere em apenas 4 aminoácidos do gene AAC(6')-Ib (com o qual os isolados hibridizavam) e que acetila gentamicina e amicacina, actividade correspondente à associação AAC(6')-I+ANT-(2") pelo que foi considerado que estes isolados apresentariam este novo gene AAC(6')-IV (Miller, comunicação pessoal). Deverá proceder-se a confirmação por hibridização com sonda específica para este gene.

Fenótipo de resistência aos aminoglicosídeos mais usados na clínica	Enzimas detectadas por hibridização de DNA, nos isolados clínicos
Gm Tm Net K	AAC(3)-II
Gm Tm Net K Am	AAC(3)-II + AAC(6')-I
Gm Tm Net K N Am	AAC(3)-II + AAC(6')-I + APH(3')-I
Gm Tm K N Net	AAC(3)-II + APH(3')-I
Gm Tm K	ANT(2")-I
Gm Tm Net K Am	AAC(6')-IV
Gm Tm Net K N Am	AAC(6')-IV + APH(3')-I
K N	APH(3')-I
Tm Net K Am	AAC(6')-I

Quadro 30 - Relação entre a presença de diferentes enzimas inactivadoras de aminoglicosídeos e suas combinações e resistência aos aminoglicosídeos mais usados na clínica.

4.8 Perfil de plasmídeos de isolados tipo

A maioria dos isolados clínicos testados, apresenta um conjunto de plasmídeos de baixo peso molecular, que deverão estar relacionados com plasmídeos de *Klebsiella pneumoniae* nativa (Bauernfeind et al., 1993).

As estirpes de perfil de DNA genómico do tipo A, apresentam um perfil de plasmídeos de elevado peso molecular que se repete, independentemente do hospital em que as estirpes foram isoladas e independentemente da β-lactamase que codificam, apresentando 3 plasmídeos de tamanho aproximadamente 100, 60, 20 Kb.

A maioria das estirpes estirpes do Hospital da Prelada apresentam um perfil com 5 plasmídeos, de cerca de 100, 80, 60, 30 e 20 Kb, contudo uma das estirpes, 3154, produtora apenas de SHV-5, apresenta um perfil diferente com três plasmídeos, de cerca de 80, 60 e 20 Kb, coexiste uma estirpe, 3166, com um perfil igual ao dos outros hospitais com apenas três plasmídeos que foi a 1ª estirpe isolada neste Hospital.

A estirpe 3682, do Hospital de S^{to}. António apresenta apenas um plasmídeo de elevado peso molecular de cerca de 180 Kb.

4.9 Transferência de resistência

Neste tipo de surtos hospitalares, poderá haver combinação de disseminação de estirpes plasmídeos e genes (Champs, et al., 1991).
Procedeu-se ao estudo da transferibilidade dos factores de resistência por conjugação e dos plasmídeos presentes em alguns isolados clínicos tipo e transconjugantes, de forma a verificar se era fundamental a disseminação de estirpes, plasmídeos ou genes em cada tipo de situação.



Para as estirpes de perfil de restrição de DNA genómico do tipo A, produtoras de enzimas de pI 5,4+7,6 ou 5,4+8,2, foi conseguida transferência da β-lactamase de pI 5,4 isolada, a partir do isolado 3473 que origina no transconjugante, um fenótipo de resistência relacionado com a produção de TEM-1, tendo sido detectado um plasmídeo de cerca de 20 Kb.

Não foi conseguida transferência das β-lactamases de espectro alargado quer de pI 7,6 quer de pI 8,2, a partir de estirpes que apresentam este tipo de perfil de restrição de DNA genómico, nas condições experimentais referidas e para as estirpes protótipo consideradas (3153, 3166, 3387, 3473, 3608, 3673, 3684, 3694).

Foi conseguida a transferência de resistência à ceftazidima e aztreonamo por conjugação, relacionada com a produção de SHV-5 isolada, na estirpe 3715 do Centro Hospitalar Vale de Sousa, detectando-se um plasmídeo de cerca de 90 Kb no transconjugante.

Nas estirpes do Hospital de S. João, deveremos individualizar dois casos de surtos distintos um por estirpes produtoras de β-lactamase de espectro alargado do tipo TEM, e um surto por estirpes produtoras de β-lactamase do tipo SHV. Em qualquer dos casos foi conseguida transferência por conjugação da β-lactamase de espectro alargado (quadros 22 e 23). No caso das estirpes produtoras de enzimas do tipo TEM-6, obteve-se por transformação, a enzima responsável pela resistência à ceftazidima, isolada, nos casos em que aparecia associada a outras enzimas, permitindo desta forma associar a resistência à produção dessa enzima, que era comum aos vários isolados clínicos que apresentavam este comportamento comum, inclusivamente um que apresentava esta como única enzima. Parece existir relação genotípica entre as estirpes 999 e 1887, pelo que a estirpe 1887 poderá ter adquirido mais um gene responsável pela codificação de 5,4+6,8 e de APH(3')-I+AAC(6')-I o que lhe trará vantagem em ambiente hospitalar, não havendo relação entre as restantes estirpes produtoras desta enzima. A estirpe 999 apresenta plasmídeo de cerca de 60 Kb e 1887 apresenta plasmídeo de peso molecular superior, de cerca de 100 Kb.

Os transconjugantes em *E.coli* K802N, produtores de TEM-1 e SHV-5, apresentam plasmídeo de cerca de 150 Kb, obtidos a partir de isolados clínicos produtores destas enzima (Quadro 22) .

A β-lactamase SHV-2, foi transferida a partir dos isolados 1905 e 2429, conferindo ao transconjugante um fenótipo que condiciona maior resistência a cefotaxima que a

ceftazidima (quadro 10). O transconjugante do isolado 1915, apresenta as β-lactamases TEM-1 e SHV-2 (quadro 22).

Relativamente aos isolados do Hospital de S^{to}. António, conseguiu-se a transferência, por transformação (não foi possível testar a conjugação, por falta de marcador de contra seleção, dada a resistência múltipla destes isolados) a partir da estirpe 3682, da β-lactamase SHV-5, isolada (quadro 24). Em relação à estirpe 3688 foi conseguida a transferência de SHV-5, por conjugação com a estirpe receptora HB101 (strepto R) detectando-se um plasmídeo de cerca de 150 Kb no transconjugante.

Foi conseguida a transferência de resistência à ceftazidima e aztreonamo por conjugação com *E.coli* K802N, relacionada com a produção de SHV-5 isolada, na estirpe 3677 (quadro 10), detectando-se um plasmídeo de cerca de 90 Kb, no transconjugante.

4.10 Resistência não enzimática aos β-lactâmicos

4.10.1 Análise das proteínas da membrana externa

A análise das proteínas da membrana externa por SDS-PAGE, demonstrou alterações quantitativas no perfil das proteínas da membrana externa quando comparadas com as de estirpe sensível à cefoxitina. Verificou-se uma redução da proporção da proteína da membrana externa de cerca de 39 KDa de peso molecular, habitualmente considerada com características de porina.

A estirpe 1920 apresenta uma redução da percentagem relativa da banda de 39 KDa (detectada por "scanning" do electroforegrama) relativamente à estirpe sensível à cefoxitina, de acordo com o referido por outros investigadores (Sanders et al., 1984, Gutmann, et al., 1989, Vatapoulos et al., 1990), sendo nítida esta alteração nas restantes estirpes.

A estirpe sensível, 3677, apresenta uma CMI para cefoxitina de 2 e as estirpes que apresentam redução da susceptibilidade à cefoxitina, apresentam CMIs entre 24 e 64.

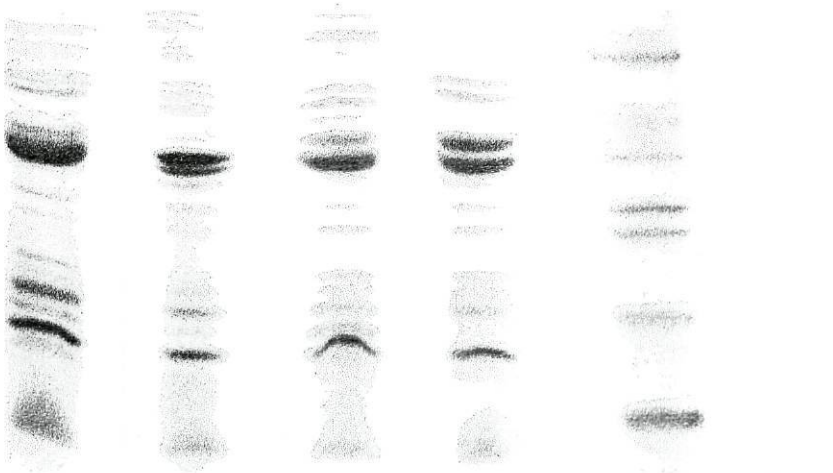


Figura 13 - Perfil de SDS-PAGE das proteínas da membrana externa extraídas das estirpes referidas na legenda e de padrão de peso molecular

Marcador de peso molecular com fragmentos de:

14,2 KDa
20,1
24,0
29,0
36,0
45,0
66,0

4.11 Perfis de restrição de DNA genómico obtidos por PFGE

A interpretação dos perfis obtidos após separação dos fragmentos de DNA genómico, obtidos por digestão com XbaI, enzima de baixa frequência de corte, por electroforese em gele de agarose em campo eléctrico de orientação variável, permitiu distinguir vários perfis de restrição que estão referidos no quadro geral de comportamento das estirpes estudadas.

A interpretação da relação entre estirpes foi feita de acordo com Tenover e colaboradores (Tenover, et al., 1995) e Goering (Goering, 1994) que consideram quatro classes para a definição da relação entre estirpes analisadas por PFGE:

Classe I - idênticas - isolados que são geneticamente não distinguíveis, que apresentam o mesmo perfil de restrição, representam a mesma estirpe

Classe II - intimamente relacionadas - isolados que diferem em apenas um acontecimento genético que poderá resultar em diferenças de duas ou três bandas.

Classe III - possivelmente relacionadas - isolados que apresentam diferenças consistentes com 2 acontecimentos genéticos independentes, apresentam diferenças de quatro a seis bandas. Isto pode acontecer em isolados colhidos ao longo de grandes períodos ou em surtos extensos.

Classe IV - diferentes - isolados que apresentam diferenças relacionadas com mais de três acontecimentos genéticos, com alterações em sete ou mais bandas.

As classes II e III são referidas como subtipos do perfil principal.

Relativamente aos nosssos resultados os perfis principais foram referenciados por letras, e os subtipos por numeração romana referenciando o subtipo de classe II, por exemplo, por AI - estirpes relacionadas com o tipo principal A diferindo em um acontecimento genético e o subtipo de classe III, por exemplo, por AII - estirpes relacionadas com o tipo principal A diferindo em dois acontecimentos genéticos.

Estirpes geneticamente relacionadas ou clones, são isolados que são indistinguíveis por testes genéticos como é o caso do perfil de restrição do DNA genómico por PFGE, ou que são tão semelhantes que se consideram derivados de um ancestral comum.

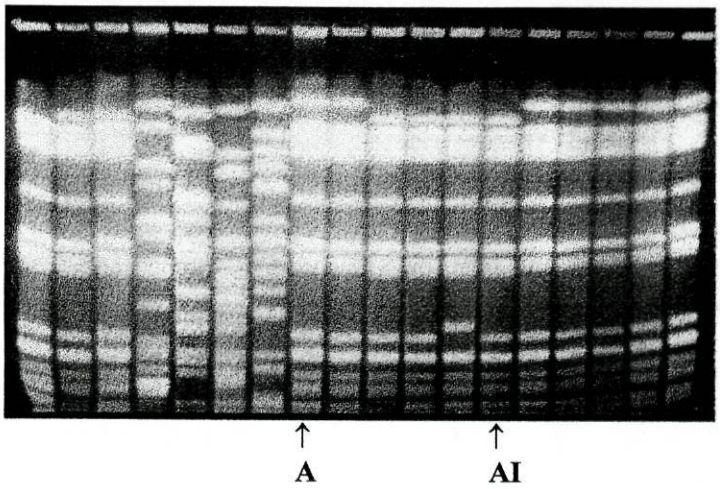


Figura 14 - Perfil de restrição prevalente nos isolados clínicos estudados, tipo A e subtipo AI

Discussão

5. Discussão

5.1 Análise dos surtos

O estudo recaiu em estirpes recolhidas num intervalo de tempo de sete anos, de 1989 a 1996, o que permitiu observar uma evolução dos comportamentos de acordo com a cronologia dos isolados e dos surtos estudados, exibindo padrões relacionados com a altura em que os isolados foram obtidos.

Foi observada uma uniformidade de comportamentos, em determinado período, relativamente longo, o que sugere a manutenção de uma estirpe epidémica durante um período alargado.

Para esta análise iremos referir-nos a cada hospital separadamente, fazendo posteriormente uma análise de conjunto, uma vez que nos parece haver inter-relações em algumas situações.

Da análise cronológica dos resultados parece-nos que poderemos distinguir dois grupos diferentes de situações que se observam no Hospital de S.João (Quadro 3). No início do estudo, entre 1989 e 1990, parece ter sido preponderante o isolamento de estirpes multi-resistentes produtoras de TEM-6 (Quadros 19, 20 e 21), caso que terá sido resolvido e a estirpe e o plasmídeo erradicados, uma vez que não voltaram a ser detectadas estirpes com este comportamento. Durante o mesmo período esta enzima foi também detectada em estirpes de *Escherichia coli* (Sousa et al., 1991) o que parece atestar da capacidade de disseminação do determinante de resistência entre estirpes e entre espécies diferentes. Esta enzima detectada em *Escherichia coli* foi considerada derivada de TEM-1b (Tn*2*) (Peixe et al., 1997).

A partir de 1990 foi preponderante o isolamento de estirpes produtoras de SHV-5, tendo havido um período em que podem ter coexistido as duas situações. A enzima SHV-5 foi detectada em estirpes de *Escherichia coli* originárias do mesmo hospital durante o mesmo período, o que atesta da capacidade de transferência da entidade genética codificadora desta enzima entre espécies diferentes (Peixe, 1996). Este facto poderá relacionar-se com a

introdução no ambiente hospitalar de uma outra estirpe e/ou plasmídeo que tenham substituído os anteriores codificadores de TEM-6, tendo havido também uma modificação quanto ao tipo de enzimas que degradam os aminoglicosídeos. A prevalência de uma estirpe durante um determinado período e a sua substituição por outra com características diferentes, foi também referida por Duarte e colaboradores, em Hospitais Portugueses (Duarte, Correia da Silva & Pereira, 1988).

Este fenómeno parece apresentar alguma semelhança com o verificado em França, em que a partir dos surtos de infecções por *Klebsiella pneumoniae* produtora de CTX-1/TEM-3 (Sirot et al., 1987), se observou o aparecimento de novas β-lactamases do tipo SHV com maior resistência à ceftazidima e aztreonamo, CAZ-5/SHV-4 e CAZ-4/SHV-5 (Sirot et al., 1989) havendo uma substituição do fenótipo do tipo CTX predominante em 1985, por outro do tipo CAZ.

Este surto por estirpes produtoras de SHV-5, apresenta características diferentes dos detectados posteriormente noutros Hospitais, uma vez que neste caso está presente um plasmídeo conjugativo que codifica TEM-1 e SHV-5 e que é transferido para estirpes diferentes, sendo neste caso preponderante para o surto, a disseminação do plasmídeo responsável pela codificação das duas β-lactamases, TEM-1 e SHV-5, não tendo sido conseguida a sua transferência isoladamente, mesmo por transformação (Quadro 22).

Aparecem ainda estirpes produtoras de SHV-2 (Quadro 3) que apresentam um perfil de restrição do DNA genómico relacionado com as que apareceram posteriormente noutros Hospitais.

Neste caso a transferência de β-lactamases por plasmídeos conjugativos parece ser mais relevante para o surto uma vez que existem estirpes não relacionadas genotipicamente produtoras das mesmas β-lactamases.

Relativamente aos outros Hospitais, os resultados são mais recentes, pelo que deverão estar mais próximos da realidade actual. Nestes casos, parece ser mais relevante a dissseminação de uma estirpe comum aos vários Hospitais, parecendo ser neste caso um surto clonal, podendo haver casos esporádicos em que há disseminação de plasmídeos.

No Centro Hospitalar de Vale de Sousa (Quadro 4), verifica-se que o fenómeno que parece contribuir de forma mais relevante para o surto é a disseminação de uma estirpe que se

mantém ao longo de todo o surto, apresentando dois fenótipos de resistência distintos em que a estirpe se apresenta como produtora de SHV-2 ou de SHV-5 e em que o facto de as estirpes isoladas inicialmente, produzirem preferencialmente SHV-2 nos faz pensar que a pressão selectiva possa ter promovido a evolução no sentido da produção de SHV-5 que condiciona um nível de resistência superior. A possibilidade da subavaliação da β-lactamase de espectro alargado que condiciona nível de resistência baixo, nestas estirpes e a consequente não detecção precoce do surto, pode ter facilitado a evolução no sentido da mutação do gene para codificação de SHV-5. As estirpes isoladas inicialmente produtoras de SHV-2, poderiam constituir o reservatório para a evolução da β-lactamase no sentido de SHV-5. O fenómeno descrito demonstra a importância da vigilância epidemiológica das alterações de comportamentos típicos das estirpes, mesmo quando as variações são subtis. Neste caso seria mais notória a resistência a outros agentes antibacterianos, que analisada mais em pormenor poderia fazer suspeitar da presença de uma β-lactamase de espectro alargado. Este facto demonstra a importância da pesquisa por rotina de β-lactamases de espectro alargado como marcador de resistência, mesmo quando condicionam apenas ligeira redução da susceptibilidade. Estes resultados atestam da importância dos estudos prospectivos na epidemiologia da resistência aos antibióticos.

A última estirpe isolada em Agosto de 1996, parece não estar relacionada com o surto pelo que deverá ser responsável por uma situação pontual.

O aparecimento de dois subtipos, A e AI, do mesmo perfil de DNA genómico, diferindo em apenas uma banda, neste Hospital, com distribuição preferencial do subtipo AI pela Unidade de Pediatria, causando preferencialmente infecção urinária, apresentando o fenótipo de nível baixo de resistência às cefalosporinas de terceira geração e resistência às associações de amoxicilina com ácido clavulânico, condicionado pela produção de β-lactamases TEM-1 e SHV-2 e do aparecimento preferencial do tipo A em Unidades de Medicina, exibindo os dois tipos de fenótipos de resistência típicos, de nível baixo de resistência condicionado pela produção de TEM-1 e SHV-2 e de nível elevado de resistência, condicionado pela produção de TEM-1 e SHV-5, alerta-nos para a possibilidade de as terapêuticas estabelecidas sendo diferentes em Unidades de adultos e de Pediatria condicionarem a evolução da resistência destas estirpes.

Neste caso, parece haver uma disseminação clonal na Unidade de Pediatria que poderá estar relacionada com infecção cruzada. Parecendo verificar-se o mesmo fenómeno relativamente à Unidade de Medicina.

O aparecimento no Hospital de S^{to}. António (Quadro 8) de estirpe (3693) com as mesmas características destas, em Pediatria, alerta-nos para a possibilidade de disseminação inter-hospitalar, por transferência de doentes entre Hospitais.

O facto de aparecerem estirpes produtoras de SHV-2 e outras de SHV-5 com o mesmo perfil de DNA genómico, sugere que tenha havido evolução por mutação do gene da SHV-2 para SHV-5 na mesma estirpe, uma vez que estas mutações num número reduzido de aminoácidos poderão não ser detectadas por enzimas de baixa frequência de corte como é a Xba1, usada na restrição do DNA genómico. Um fenómeno semelhante foi detectado por Nüesch-Inderbinen e colaboradores, em que estirpes do mesmo ribotipo apresentam β-lactamases diferentes da mesma família, SHV-2 e SHV-5 (Nüesch-Inderbinen, Kayser & Hächler, 1997). Estes factos demonstram que as mutações que originam β-lactamases de espectro alargado podem ocorrer sequencialmente no mesmo organismo (Bradford et al., 1994, Hibbert-Rogers et al., 1995).

Este facto é corroborado pelo que acontece no Hospital da Prelada, em que estirpes do mesmo tipo de perfil de restrição de DNA genómico, apresentam SHV-2 e posteriormente SHV-5. Uma destas estirpes produtora de SHV-2, quando pressionada *in vitro* com ceftazidima ou aztreonamo, aumenta o nível de resistência passando a apresentar uma banda que co-foca com SHV-5 (Quadro 28).

Relativamente ao Hospital da Prelada (Quadro 5), verifica-se a presença de uma única estirpe em quatro doentes mantendo-se o mesmo quadro de aparecimento inicial de estirpe produtora de SHV-2 que possivelmente terá evoluído para SHV-5. Ao longo do estudo foi-se verificando, tal como referem outros estudos (Bauernfeind, et al., 1993) a influência de outros mecanismos de resistência detectados pela redução de susceptibilidade à cefoxitina (estirpe 3153) o que nos faz pensar na associação com alterações da permeabilidade da membrana externa.

A evolução da resistência *in vivo*, como resposta à pressão selectiva do tratamento antibiótico é uma realidade documentada por outros autores (Rasheed et al., 1997 e Chanal-Claris, et al., 1997) e corroborada pelos nossos resultados, em que se observa num mesmo doente do Hospital da Prelada a evolução SHV-2 →SHV-5 (Quadro 5).

O aparecimento da mesma estirpe com o mesmo comportamento das dos outros Hospitais, no Hospital de S. Paio de Oleiros (Quadro 6) e de Ovar (Quadro 7), poderá compreender-se pela transferência de doentes de Hospitais Distritais para Centrais e vice-versa.

Relativamente ao Hospital Geral de S^{to}. António (Quadro 8), observa-se o mesmo tipo de perfil do DNA genómico encontrado nos outros Hospitais, a prevalecer entre os isolados estudados, mantendo o mesmo comportamento fenotípico com elevado nível de resistência a ceftazidima e aztreonamo. Tal como nos casos dos Hospitais anteriormente descritos, parece existir um surto em que é relevante a transferência da mesma estirpe produtora de TEM-1 e SHV-5, do mesmo tipo de perfil de DNA genómico dos outros Hospitais, tipo A, que foi responsável por infecções em sete doentes de unidades diferentes, demonstrando a disseminação intra-hospitalar entre unidades diferentes. Concomitantemente aparece, uma estirpe do subtipo AI, produtora de SHV-2.

No caso deste Hospital, parece-nos relevante o facto de aparecerem estirpes de um outro tipo de perfil de restrição de DNA genómico, tipo I, diferente do prevalente, tipo A, que apresentam uma maior multi-resistência incluindo fluoroquinolonas e um maior número de enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos, associadas. Algumas destas estirpes também produzem TEM-1 e parecem ter associado outro mecanismo de resistência de origem cromossómica que condiciona a resistência a outros grupos de agentes antibacterianos, como demonstra o facto de apresentarem redução da susceptibilidade à cefoxitina e resistência à ciprofloxacina. Uma outra estirpe de um subtipo do mesmo perfil de restrição de DNA genómico, I I, que produz apenas SHV-5 e só um tipo de enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos, mantém a resistência à ciprofloxacina, o que está de acordo com o facto de pertencerem ao mesmo tipo de perfil principal de DNA genómico, havendo diferença apenas na resistência codificada por plasmídeos. A diferença verificada na resistência aos aminoglicosídeos nas estirpes 3688 e 3682 e o facto de ter havido transferência de SHV-5 isolada, a partir da estirpe 3682, por transformação, alerta-nos para a possibilidade da localização do gene em transposão (Quadro 24).

Neste Hospital, observam-se alguns casos esporádicos de infecções por estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado aparentemente não relacionadas com as prevalentes (Quadro 25) que apresentam vários tipos de β-lactamases mediadas por plasmídeos

conjugativos. Estas estirpes não parecem ser responsáveis por situações epidémicas, mas será necessária uma vigilância futura no sentido de verificar a sua evolução. Estão neste caso dois isolados clínicos produtores de enzima de pI 5,3 considerada CAZ-3/TEM-12 em duas unidades diferentes (Neonatologia e Cuidados Intensivos). Um isolado produtor de β-lactamase 5,4 que de acordo com as CMI foi considerado TEM-7 e ainda um isolado produtor de enzima de pI 5,6, considerada TEM-26.

O facto de em 1993 (Machado & Costa, 1993) existir um predomínio de 30% de um serótipo nas estirpes de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β-lactamase de espectro alargado no Hospital de S^{to}. António, havendo um outro tipo que apresentava cerca de 9% de incidência, alerta-nos para alguma relação que parece existir com os resultados que obtivemos na actualidade.
Já em 1994 (Cristino et al., 1994) era referida no Hospital de S^{to}. António, uma resistência às fuoroquinolonas superior a 10%, alertando-nos para a importância deste fenómeno que deverá merecer uma atenção e vigilância especiais relativamente à sua evolução. O facto de na mesma altura, este Hospital ser aquele que apresentava maior resistência a ceftazidima e cefotaxima associado ao facto de ser o que apresentava maior resistência às fluoroquinolonas, parece estar de acordo com o que detectámos em 1996, alertando para a possibilidade da persistência das estirpes, neste hospital.

Neste estudo, verifica-se que estamos perante um surto clonal com disseminação intra e inter-hospitalar.

A disseminação inter-hospitalar de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* é um fenómeno referido a nível internacional (Monnet et al., 1994) podendo envolver vários Hospitais num mesmo surto, como o caso descrito em França em que uma mesma estirpe de *Klebsiella pneumoniae* produtora de SHV-4, foi responsável por surtos infecciosos em catorze Hospitais da zona de Paris (Buré et al., 1988, Arlet et al., 1994).

Com o intuito de verificar se havia variações geográficas do comportamento predominante na zona Norte do País, foram analisadas estirpes responsáveis por surto de infecções nosocomiais no Hospital de S.ta Maria, resultantes de um estudo em colaboração com a Faculdade de Farmácia de Lisboa (em colaboração com o Serviço de Bacteriologia do Hospital de Sta. Maria por intermédio da Dra. Maria José Salgado) através da Profª Dr.ª Aida Duarte que prestou preciosa colaboração para este estudo, com a caracterização genómica das estirpes do Norte do País.

Neste Hospital, encontraram-se resultados distintos dos observados no Norte. Predominam estirpes produtoras de uma enzima de pI 5,6 (Quadro 26) que de acordo com resultados de cinética enzimática, serão do tipo TEM-26 (Quadro 27) (Urban et al., 1994, Soilleux et al., 1996, Bush, Jacoby & Medeiros, 1995), (estão em curso estudos de sequenciação do gene que codifica esta β-lactamase). Os isolados apresentam dois tipos predominantes de perfil de DNA genómico, mas em que a mesma β-lactamase aparece em estirpes diferentes, e até em espécies diferentes, o que parece indicar que neste caso será mais relevante a disseminação do plasmídeo do que da estirpe, ao contrário do que acontece no Norte. O aparecimento da mesma β-lactamase em *Proteus* (Duarte, A., comunicação pessoal) resultante de uma infecção mista com *Klebsiella pneumoniae*, atesta da capacidade de transferência de determinantes genéticos de resistência *in vivo*, confirmando a capacidade da disseminação de resistência para outras espécies.

Este surto, parece apresentar algumas características semelhantes ao referido em Nova Iorque (Urban et al., 1994), em que a β-lactamase de pI 5,6 era codificada num plasmídeo conjugativo apresentando multi-resistência e os isolados clínicos apresentavam várias bandas de β-lactamases com pI 5,4, 6,4, 7,2 e 7,6 sendo contudo a de pI 5,6 a responsável pela resistência à ceftazidima. O surto referido por estes autores, parece ter constituído uma resposta ao uso aumentado de ceftazidima e todos os isolados resistentes à ceftazidima apresentavam a β-lactamase de pI 5,6, que era perdida espontaneamente quando os isolados eram conservados sem pressão selectiva, parecendo corresponder à redução do número de isolados resistentes do Hospital, quando o antibiótico foi colocado em uso restrito.

O aparecimento de várias β-lactamases nos isolados clínicos referidos por Urban e colaboradores, parece um fenómeno semelhante ao verificado neste surto de Lisboa, semelhante a casos pontuais que se haviam verificado também no Hospital de S. João (Quadro 3) e que deverá merecer alguma atenção futura, pois essas β-lactamases aparecem associadas a enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos responsáveis por alargamento da

resistência dos isolados que as produzem, constituindo uma vantagem competitiva destas estirpes. Este facto poderá constituir uma resposta a uma alteração da pressão selectiva pelo uso de antibióticos não β-lactâmicos, por exemplo aminoglicosídeos (caso de amicacina que justificará o aparecimento de AAC(6')-I (Quadro 30)), na tentativa da resolução da resistência à ceftazidima. Esta situação alerta-nos para a importância destes isolados multi-resistentes e para a capacidade de aquisição de novos determinantes de resistência pela aquisição de genes presentes em integrões e daí o facto de a nova enzima inactivadora dos aminoglicosídeos poder vir associada a uma β-lactamase que poderia existir associada ao gene da enzima inactivadora do aminoglicosídeo e que parece ter sido transferida em bloco.
O aparecimento recente de TEM-26 em França (Soilleux et al,, 1996) alerta-nos para uma maior probabilidade do seu aparecimento em Portugal, embora as referências mais comuns desta enzima apareçam nos Estados Unidos (Rice et al., 1990, Naumovsky et al., 1992, Meyer et al., 1993, Urban et al., 1994) onde é responsável por surtos importantes e onde parece manter-se até à actualidade (Bradford et al., 1997) observando-se um alargamento da resistência das estirpes que as albergam, originando isolados resistentes à maioria dos antibióticos incluindo imipenemo, alertando para as características especiais destas estirpes e entidades genéticas que possam justificar este fenómeno.
Um dos tipos de perfil de restrição do DNA genómico predominantes no Hospital de S^{ta}. Maria parece apresentar semelhança com o tipo predominante no Norte do País, o que nos alerta para características especiais desta estirpe que possam condicionar a sua prevalência.
Estudos anteriores, levados a cabo no mesmo Hospital, confirmam a importância da resistência múltipla em estirpes nosocomiais de *Klebsiella pneumoniae* e quando comparados com os nossos resultados, permitem verificar que a alteração da pressão selectiva ao longo do tempo condiciona uma cada vez maior multi-resistência (Duarte, Correia da Silva & Pereira, 1988 a).

São numerosos os casos referidos internacionalmente de surtos de infecções nosocomiais por estirpes de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β-lactamases de espectro alargado. No nosso País esta situação verificada no dia a dia dos clínicos hospitalares quando enfrentam a dificuldade do tratamento das infecções por estas estirpes multi-resistentes, deverá merecer estudo, como demonstra este trabalho, dada a relevância da resistência apresentada e das situações epidemiologicamente relacionadas, sendo necessário estudos prospectivos no

sentido de prever a evolução destes comportamentos, de forma a prevenir-mos situações de maior gravidade como as verificadas nos Estados Unidos, na actualidade (Bradford et al., 1997).

A ocorrência em várias áreas afastadas do globo - Chile (Gutmann et al., 1989), Grécia (Vatapoulos et al, 1990, Legakis et al., 1995), Alemanha (Bauernfeind et al., 1993), França (Sirot et al., 1989), Itália (Pagani et al., 1994), Estados Unidos (Jacoby, 1993) e Portugal (presente trabalho) - de β-lactamases de espectro alargado do tipo SHV-5, alerta-nos para a importância do estudo da epidemiologia das β-lactamases de espectro alargado a nível internacional (Vatapoulos et al. 1990).

O facto de ter-mos dois tipos de casos distintos, em que estirpes de *Klebsiella pneumoniae* apresentam produção de SHV-5 mas em que num dos casos o determinante genético é transferível, caso do Hospital de S.João, e outro em que não foi conseguida transferência de SHV-5, isolados de perfil de DNA genómico A, demonstram que a localização genética do determinante de resistência pode variar, podendo condicionar o tipo de situação e sua interpretação epidemiológica. A prevalência de uma estirpe epidémica responsável por surto inter-hospitalar, está de acordo com a não transferibilidade do determinante genético de SHV-5, sendo fundamental a disseminação da própria estirpe.

A não transferibilidade do gene da β-lactamase de espectro alargado faz-nos pensar que a sua localização possa ser cromossómica, através de estrutura tipo transposão que poderá apresentar integrão em que estejam associados os vários genes responsáveis pela multi-resistência destas estirpes.

O facto de o gene da mesma β-lactamase, SHV-5, aparecer também em plasmídeos conjugativos (isolados do Hospital de S. João), sugere-nos a presença do gene numa estrutura móvel que justifique as suas localizações variadas.

O gene responsável pela produção de β-lactamase não transferível, poderá estar localizado no cromossoma ou em plasmídeo não transferível (Jacoby& Han, 1996) e a sua localização tem implicações epidemiológicas e terapêuticas (Bauernfeind et al., 1993). Os replicões que codificam a β-lactamase de espectro alargado, poderão ser demasiado grandes para completarem eficazmente o processo de transformação, podendo justificar a ausência de transformantes verificada nestes casos (Hibbert-Rogers et al., 1995).

Estas hipóteses deverão ser estudadas com uma abordagem genética que permita localizar os determinantes genéticos das resistências detectadas.

A associação de genes codificadores de β-lactamase de espectro alargado, enzimas que inactivam os aminoglicosídeos e de resistência à tetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazol, pode indicar que pertençam a um transposão, tal como sugerido para SHV-3 (Nicolas et al, 1989).

O facto de a β-lactamase SHV-5, detectada no Chile, ser transferida para *Klebsiella pneumoniae* e não para *E.coli*, justificaria a não disseminação por outras espécies e a prevalência em *Klebsiella pneumoniae* (Gutmann et al., 1989).

Características destas β-lactamases, são CMIs superiores para aztreonamo que para ceftazidima e cefotaxima, fenótipo típico das estirpes produtoras de SHV-5. Estas são enzimas normalmente referenciadas por ceftazidimases por apresentarem maior resistência a ceftazidima que a cefotaxima embora não esteja relacionado com velocidade de hidrólise relativa.

O facto de em relação a estas enzimas a velocidade de hidrólise da cefotaxima ser superior à da ceftazidima e as CMIs não estarem de acordo com esta observação, poderá ser explicado pelo facto de a velocidade de penetração da cefotaxima através da membrana externa ser superior, o que torna a capacidade de hidrólise insuficiente para ultrapassar a actividade antibacteriana da droga (Du Bois, Marriot & Amyes, 1995).

As enzimas que apresentam nível baixo de resistência, SHV-2, são cefotaximases pois apresentam nível de resistência superior para a cefotaxima que para a ceftazidima (Sirot et al., 1989) relacionado com a velocidade de hidrólise relativa maior para cefotaxima que para ceftazidima.

O nível de resistência condicionado por SHV-2, depende da força do seu promotor (Podbielsky et al., 1991) o que poderá estar relacionado com a posição que o gene codificador desta enzima possa ocupar em estruturas tipo integrão (Collis & Hall, 1995).

No surto descrito na Alemanha (Bauernfeind et al., 1993), os isolados clínicos produtores de SHV-5, pertencem a um número limitado de estirpes, sugerindo origem clonal, ao contrário do que se passa na Grécia (Legakis et al., 1995) em que as estirpes pertencem a vários tipos, sugerindo uma maior importância da disseminação do plasmídeo. No caso alemão a

disseminação do plasmídeo parece ser irrelevante para o surto. O facto de no estudo grego (Legakis et al., 1995), cerca de 35% das estirpes, não terem transferido a resistência, faz-nos pensar em alguma semelhança como o nosso caso podendo justificar uma localização diferente do determinante genético relativamente às estirpes que transferiram a resistência. O que poderá confirmar a hipótese de disseminação por elementos transposáveis ora localizados em plasmídeos ora integrados no cromossoma ou em plasmídeos não conjugativos.

O aparecimento de diferentes plasmídeos codificando a β-lactamase SHV-5 descrita internacionalmente, sugere-nos a sua presença em elementos transposáveis, o que permitirá variadas localizações do gene (Vatapoulos et al., 1990), originando situações epidemiologicamente distintas, como as detectadas no nosso País (presente trabalho).

Será necessário analisar cada situação individualmente, pois os factores que condicionam estes surtos são variados, dependendo da ecologia do ambiente hospitalar e dos reservatórios de resistência, bem como da pressão selectiva em cada momento e ainda da ecologia bacteriana da população saudável, pois a colonização poderá condicionar a evolução da resistência em ambiente hospitalar.

A multi-resistência destas estirpes demonstra o elevado número de genes de resistência existente nos elementos genéticos que albergam (O'Brien et al.,1977). A maioria dos genes de resistência localiza-se em plasmídeos e alguns são transposados de uns plasmídeos para outros e os plasmídeos disseminam-se entre as estirpes bacterianas. As estirpes bacterianas e as próprias espécies movem-se num ecossistema global complexo, que é a flora humana. Os antibióticos exercem pressão selectiva a vários níveis, concentrando os genes de resistência nos plasmídeos, plasmídeos nas bactérias, e estirpes resistentes na flora bacteriana.

A produção concomitante de TEM-1 na maioria dos isolados clínicos estudados (Quadros 3,4,5,6,7,8), parece condicionar a resistência à associação de amoxicilina com inibidor de β-lactamase (Quadros 17 e 10,11,12,14,15,19,24). Também a alteração da permeabilidade da membrana (Quadro 18, Figura 13), poderá condicionar a resistência a esta associação, principalmente quando associada à produção de TEM-1 (Sawai, Yamaguchi & Hiruma, 1988). Neste caso a resistência clínica a cefalosporinas de terceira geração e associação de β-lactâmico com inibidor de β-lactamase é conseguida à custa da produção de duas enzimas em que uma apresenta espectro de actividade alargado.

5.2 Características epidemiológicas das estirpes de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β-lactamases de espectro alargado estudadas

A colonização hospitalar e disseminação de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β-lactamases de espectro alargado poder ser de dois tipos, disseminação de plasmídeos e genes de resistência e disseminação de estirpes epidémicas, como documenta o caso do Hospital de S^{to}. António (Quadro 8) e está referido internacionalmente (Gouby, et al., 1994, Legakis et al., 1995), demonstrando a necessidade de uma vigilância epidemiológica contínua.

Um ponto fundamental na análise de surtos infecciosos, constitui a determinação da origem da infecção. A identificação da origem de diferentes isolados clínicos, necessita de evidenciar se existe ou não relação entre as estirpes, pelo que necessitamos de uma técnica que nos permita determinar a "impressão digital" da estirpe.
Na investigação de surtos hospitalares de estirpes multi-resistentes, é necessário avaliar a contribuição da disseminação de plasmídeos e da disseminação de estirpes (Nouvellon et al., 1994).
O objectivo da tipagem de estirpes é o de fornecer evidência laboratorial de que isolados relacionados epidemiologicamente, são também geneticamente relacionados e portanto representam a mesma estirpe. Esta informação é útil para interpretar e controlar a disseminação de doenças infecciosas, nos Hospitais e na comunidade (Tenover, et al., 1995).
A complexidade e variabilidade dos surtos infecciosos por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β-lactamases de espectro alargado, implica que para a investigação dos surtos seja necessária uma caracterização precisa das estirpes para além da espécie.

O nosso estudo demonstra a disseminação de uma mesma estirpe de *Klebsiella pneumoniae* produtora de SHV-5 ou SHV-2 por diferentes Hospitais da área Metropolitana do Porto. O perfil de restrição do DNA genómico comum a vários isolados clínicos - tipo A, indica a disseminação de uma única estirpe.

Este predomínio, de um tipo de perfil de restrição do DNA genómico obtido por PFGE nas estirpes estudadas, com excepção dos casos pontuais e de surto antigo no Hospital de S.João, indica uma relação genotípica das estirpes de diferentes Hospitais o que sugere um surto clonal com disseminação inter-hospitalar.

O aparecimento do mesmo tipo de perfil, para as estirpes que apresentam baixo e alto nível de resistência e o facto de o perfil se manter nos vários Hospitais analisados, poderão fazer pensar na existência de uma estirpe endémica na população (Tenover et al., 1995). Esta hipótese, deverá ser futuramente analisada com estudos da flora intestinal de indivíduos hospitalizados e da comunidade, bem como do pessoal dos cuidados de saúde.
A presença de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* endémicas e a ocorrência de infecções cruzadas, foram detectadas por Duarte e colaboradores, num Hospital Português (Duarte, Correia da Silva & Pereira, 1988).

Relativamente a estas estirpes que apresentam perfil comum, não parece haver transferência dos genes que codificam as β-lactamases de espectro alargado, para outras estirpes. Estirpes com um perfil diferente serão responsáveis por casos esporádicos, mas o surto é causado pela estirpe predominante, o que poderá explicar-se por características da própria estirpe, uma vez que foi detectada em variadas situações em que não parece haver relação com o tipo de situação clínica do doente (idade, tipo de doença ou tipo de infecção). Possivelmente características da estirpe que lhe confiram uma maior capacidade de colonização, ou uma estabilidade particular do elemento genético que codifica a resistência, ou ainda uma sobrevivência superior que facilite a infecção cruzada, permitem a selecção desta estirpe, quando sujeita a pressão.
Nestes casos, a fonte de contaminação poderá ser a flora intestinal endógena dos pacientes, uma vez que *Klebsiella pneumoniae* pode existir no tracto intestinal de 30 a 40% dos humanos (Legakis et al., 1995), o que justificaria a prevalência de uma estirpe endémica na população, podendo ser responsável pelo surto.
A distribuição alargada de *Klebsiella pneumoniae* no ambiente, pode contribuir para a colonização dos pacientes hospitalizados, justificando a manutenção de uma mesma estirpe a nível hospitalar responsável por surtos clonais. Para o efeito, deverão contribuir as características de resistência aos antibióticos que a mesma apresenta. A incidência destas

estirpes multi-resistentes poderá explicar-se pela disseminação facilitada pela pressão antibiótica e pela baixa eficácia das medidas de controle de infecção.

A epidemiologia de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamase de espectro alargado é complexa (Gouby et al., 1994). Os determinantes genéticos que codificam as diferentes β-lactamases comportam-se de formas diferentes. No caso desta epidemia as estirpes que produzem a β-lactamase, são idênticas, sugerindo uma origem clonal das estirpes e uma estabilidade dos genes que codificam a resistência.

Nos casos de surtos curtos, como o do Hospital Geral de S^{to}. António, de perfil de DNA genómico I, de estirpes produtoras de SHV-5 transferível, (Quadro 8 e 24) e o surto do Hospital S.João de TEM-6 e SHV-5 transferíveis (Quadros 22 e 23), a transferência de resistência parece estar relacionada com plasmídeos conjugativos ou com a transposição de genes de resistência entre plasmídeos diferentes por elementos transposáveis. Como exemplo, podemos considerar o caso dos isolados 999 e 1887, pertencentes ao mesmo perfil de restrição de DNA genómico, em que o gene que codifica TEM-6 existente em 999, parece ter sido associado a genes que codificam uma outra β-lactamase e uma outra enzima inactivadora dos aminoglicosídeos em 1887, como demonstra o facto de se ter obtido um transconjugante que apresenta estas várias características e o facto de se ter conseguido, por transformação, obter a β-lactamase TEM-6 separada dos outros factores de resistência (Quadro 22).

Podemos encontrar genes de resistência idênticos em plasmídeos diferentes nas outras propriedades biológicas (Elwell & Falcow, 1980). Os transposões podem saltar de cromossoma para plasmídeo, por exemplo a β-lactamase SHV-1 cromossómica ou plasmídica de *Klebsiella pneumoniae*, de plasmídeo para plasmídeo, por exemplo os isolados 999 e 1887 que apresentam plasmídeos diferentes que deverão apresentar o mesmo gene que codifica TEM-6, ou de plasmídeo para cromossoma como poderá ser o caso relativamente a esta estirpe predominante, produtora de SHV-2 ou SHV-5.

No caso do Hospital de S^{to}. António, este fenómeno pode exemplificar-se pelos casos em que em isolados clínicos pertencentes a subtipos do mesmo perfil de DNA genómico I, a β-lactamase SHV-5 aparece isolada ou associada a TEM-1 e várias enzimas que inactivam os aminoglicosídeos e em que o facto de se ter obtido por transformação a β-lactamase SHV-5 isolada, a partir do isolado 3682 que apresenta vários outros factores de resistência

associados, parece comprovar que o gene que codifica a SHV-5 esteja associado aos outros genes de resistência na estirpe isolada da clínica.

O aparecimento da mesma enzima em estirpes genomicamente distintas (Quadro 8), de perfis I, W e R, parece sugerir a capacidade de disseminação do determinante genético da β-lactamase de espectro alargado para outras estirpes, possivelmente por conjugação, de acordo com o facto de se ter conseguido transferência por conjugação nas estirpes 3688 e 3677.

No caso da disseminação de uma estirpe produtora de SHV-5 na Grécia (Bauernfeind et al., 1993) a transferiblidade da resistência foi provada *in vitro*, mas não foram encontradas outras estirpes ou outras espécies com o mesmo tipo de resistência, pelo que foi sugerido que *in vivo* a transferência desse plasmídeo seria irrelevante. Esta estirpe persistiu no hospital por um período de um ano e nove meses. O mesmo fenómeno foi verificado num surto num hospital Universitário de Paris por uma estirpe de *Klebsiella pneumoniae* produtora de SHV-4 que durou oito meses (Arlet et al., 1990). Em Portugal, essa persistência parece ter sido ainda mais prolongada, mantendo-se pelo menos, desde 1991, até à actualidade, pelo que nos parece relevante alertar as unidades hospitalares para esta situação.

A estirpe, poderá colonizar o intestino dos pacientes, disseminar-se a partir deste reservatório, e evoluir no sentido de maior nível de resistência quando pressionada selectivamente (Brun-Buisson, et al., 1987).

Estirpes com estas características, podem constituir graves problemas terapêuticos e epidemiológicos ao invadirem os Hospitais e se disseminarem por pacientes, unidades e até diferentes Hospitais. Para este fenómeno decerto que não será irrelevante a transferência de doentes de Hospitais Distritais para Hospitais Centrais ou o inverso, prática comum no nosso país, em que determinadas valências só existem em Hospitais Centrais e que após uma intervenção no hospital Central o paciente poderá terminar a sua recuperação no Hospital Distrital. Ou inversamente, pacientes em que se verifique agravamento do estado clínico, poderão ser transferidos para Hospitais Centrais para intervenções mais eficazes para a resolução da situação clínica, ou ainda para a realização de determinados tipos de intervenções de diagnóstico, por vezes só realizadas em Hospitais Centrais.

Outra questão que poderá também apresentar a sua importância, para a justificação deste fenómeno, prende-se com o facto de o pessoal de cuidados de saúde principalmente o

pessoal de enfermagem, poder constituir um veículo para estas estirpes, considerando a sua mobilidade entre vários Hospitais e a possibilidade, de pelo menos pontualmente, poder verificar-se uma inobservância dos cuidados de controlo de infecção.

5.3 Subavaliação de β-lactamases de espectro alargado - consequências clínicas

A vigilância da alteração do comportamento aos antibióticos implica uma atenção constante aos desvios de comportamentos repetitivos para cada espécie bacteriana e cada família de antibióticos, sendo fundamental a atenção para o aparecimento de subpopulações que apresentem comportamentos distintos que indiciem o aparecimento de novos factores de resistência. O aparecimento de respostas bimodais das populações, é um indicador de comportamentos diferentes relativamente à população considerada normal. Esta é base da descoberta do desenvolvimento de resistência, sendo cada vez mais necessária uma monitorização para o conhecimento da realidade de cada Hospital, Zona e País de forma a que seja possível detectar e controlar o desenvolvimento e evolução de resistência.
A detecção precoce destes fenómenos, mesmo quando subtis, é fundamental para evitar a sua evolução no sentido do desenvolvimento de nível de resistência superior e disseminação do determinante de resistência, pelo que é fundamental a detecção de marcadores que condicionam a resistência, embora a sua manifestação possa parecer irrelevante em determinada altura da evolução do fenómeno.

A detecção de estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado merece cada vez maior atenção, devido ao facto de ser frequente a sua subavaliação devido ao facto de as estirpes que as albergam se comportarem como sensíveis de acordo com os critérios correntemente indicados pelo NCCLS para a avaliação da resistência aos antibióticos. Esta não detecção tem consequências importantes, pois *in vivo* estas estirpes comportam-se como resistentes devido principalmente ao efeito de inóculo , em que o nível de resistência

aumenta considerável com o aumento da concentração dos microorganismos o que acontece em muitas das infecções causadas por estes agentes patogénicos. A importância desta questão e a rápida evolução deste fenómeno nos últimos tempos, é justificada pela falência terapêutica que pode condicionar e pela hipótese de contribuir para a evolução para níveis de resistência superiores (Jacoby & Han, 1996, Katsanis et al., 1994).

5.4 Influência das resistências associadas à produção de β-lactamase de espectro alargado

5.4.1 Resistência aos aminoglicosídeos aminociclitóis

Devido ao facto de estas estirpes apresentarem multi-resistência foram sujeitas paralelamente ao estudo de determinantes de resistência a outras famílias de agentes antibacterianos, entre eles, devido à sua importância no tratamento das infecções hospitalares, os aminoglicosídeos.

Os principiais mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos incluem: resistência intrínseca, alterações da permeabilidade da membrana externa, alterações do alvo de acção e inactivação enzimática que constitui o factor mais relevante, normalmente devido a enzimas que podem ser codificadas por plasmídeos e transposões (Sousa e Prista, 1990).

O aparecimento de resistências associadas aos aminoglicosídeos e aos β-lactâmicos nestas estirpes hospitalares pode estar relacionado com o facto de a terapia de combinação com estes grupos de agentes antibacterianos ser uma prática comum a este nível, principalmente em tratamento de infecções por estirpes multi-resistentes (Siegenthaler, Bonetti & Luthy, 1986).

A determinação do fenótipo de resistência a um conjunto de agentes desta família já anteriormente referidos, conjugados com resultados de hibridização de DNA, com várias sondas que detectam genes responsáveis pela codificação de várias enzimas que degradam os aminoglicosídeos, permitiu-nos concluir acerca da presença de vários tipos de enzimas e de associações de enzimas, relacionadas com o tipo de β-lactamase produzida e que atestam da multi-resistência destas estirpes e das suas características hospitalares.

As β-lactamases de espectro alargado, SHV-5 e SHV-2, aparecem normalmente associadas a AAC(3)-II e APH(3')-I.

A β-lactamase TEM-6 aparece associada a AAC(3)-II e APH(3')-I mas em alguns casos aparece ainda associada a AAC(6')-I parecendo indicar que a pressão selectiva pelos aminoglicosídeos (principalmente amicacina) tenha levado ao aparecimento de estirpes que apresentam estas 3 enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos, reduzindo as opções terapêuticas. O aparecimento de AAC(6')-IV isolada ou associada a APH(3')-I em estirpes produtoras de TEM-1 e SHV-5, parece representar um fenómeno semelhante, verificado apenas em estirpes do Hospital de S.João (Quadro 3).

As estirpes que apresentam β-lactamase de pI 5,3 e 5,4, apresentam sensibilidade aos aminoglicosídeos o que poderá relacionar-se com o facto de se apresentarem esporadicamente pois apresentam desvantagem competitiva relativamente às restantes.

O facto de encontrar-mos associados, nos isolados clínicos estudados, determinados tipos de β-lactamase de espectro alargado e de enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos que transferem em bloco (Quadro 22,23), poderá relacionar-se com a sua presença em estruturas tipo integrão, com promotor híbrido, criando um unidade transcricional dos dois genes de resistência (Lee, Hopkins & Syvanen, 1990).

5.5 *Influência de outros mecanismos de resistência*

Um factor que pode influenciar a expressão da resistência são as alterações da permeabilidade da membrana externa, que podem aumentar a resistência actuando sinergicamente com a produção de β-lactamase (Pangon et al., 1989).
A perda de porinas como causa de resistência tem sido demonstrada em mutantes laboratoriais e isolados clínicos (Nikaido, 1989) verificando-se também *em Klebsiella pneumoniae* (Gutmann, et al., 1985, Sanders et al., 1984).

Tem sido referido o aparecimento de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes à cefoxitina durante o estudo de surtos por estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado (Martínez-Martínez, et al., 1996, Pangon, et al., 1989), nomeadamente por estirpes produtoras de SHV-5 (Vatapoulos, et al., 1990, Gutmann, et al., 1989).
O facto de algumas estirpes por nós estudadas, apresentarem redução da susceptibilidade à cefoxitina, levou-nos a pensar que poderia haver associação de mecanismos de resistência nomeadamente alterações das proteínas da membrana externa que possam condicionar resistência por alterações da permeabilidade (Quadros 14 e 18).

A observação dos perfis electroforéticos gerados por SDS-PAGE, de estirpes usadas como exemplo, cujo comportamento aos antibióticos fariam suspeitar de alterações das proteínas da membrana externa, permite-nos por comparação com estirpe sensível à cefoxitina, concluir acerca da redução de uma proteína de peso molecular de cerca de 39 KD com características de porina (Gutmann, 1985), que deverá ser responsável por este comportamento, mantendo-se a proteína de cerca de 36 KD (Figura 13).

5.6 Consequências terapêuticas

Klebsiella pneumoniae resistente a múltiplos antibióticos, é um problema de resistência crescente nos Hospitais, principalmente nas Unidades de Cuidados Intensivos e outras áreas em que as infecções nosocomiais são comuns.

A terapêutica empírica das infecções nosocomiais graves é iniciada normalmente por uma combinação de cefalosporina de terceira geração e aminoglicosídeo (Colardyn et al., 1991). Um regime terapêutico deste tipo poderá falhar em casos de multi-resistência das estirpes a cefalosporinas da terceira geração e aminoglicosídeos como se verificou neste estudo, e como se verifica na bibliografia, por exemplo em surtos por *Klebsiella pneumoniae* produtora de SHV-5 e AAC(3)-I (Bauernfeind, et al. 1993).
Este tipo de combinação pode levar ao aparecimento de mutantes com resistência aumentada aos β-lactâmicos devido a alterações de permeabilidade da membrana externa, seleccionados por doses não bactericidas do aminoglicosídeo (Mainardi, et al., 1994).

A ceftazidima começou a ser usada preferencialmente devido à sua actividade contra um largo espectro de patogénicos Gram negativo incluindo *Pseudomonas aeruginosa* (Rice et al., 1990) mas a monoterapia empírica com ceftazidima, parece não ser uma boa opção terapêutica em doentes neutropénicos devido à possibilidade de selecção de estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado (Naumovski et al., 1992).

Apesar do nível de resistência condicionado por algumas das estirpes produtoras de SHV-2 ser baixo, podendo as estirpes ser consideradas como sensíveis segundo dos critérios do NCCLS, a terapêutica com cefalosporinas de terceira geração falha na maioria dos casos, excepto em tratamento de infecções urinárias (Brun.Buisson, et al., 1987). O uso concomitante de aminoglicosídeos poderá contribuir para a emergência desta resistência.
O facto de haver um aumento da CMI com o inóculo está de acordo com o facto de haver um baixo poder bactericida nestas situações em que há apenas redução da susceptibilidade *in vitro* e em que a terapêutica falha (Meyer, et al., 1993).

O facto de os plasmídeos que codificam β-lactamases de espectro alargado co-transferirem resistência a outros antibióticos não relacionados, origina situações epidemiologicamente complexas em que a emergência e disseminação das β-lactamases de espectro alargado não estão relacionadas apenas com a pressão selectiva das cefalosporinas de terceira geração, mas também com a pressão selectiva de outras drogas, como os aminoglicosídeos (Vatapoulos et al., 1990).

A multi-resistência das estirpes estudadas, pode dificultar a erradicação do surto pela restrição de um único antibiótico (por exemplo as cefalosporinas de terceira geração) uma vez que a pressão selectiva pode manter-se usando outros antibióticos, por exemplo aminoglicosídeos, aos quais a estirpes são co-resistentes, devido a genes próximos codificados pelo mesmo plasmídeo, tal como verificado num estudo prospectivo em Nova Iorque (Meyer et al., 1993).

Uma hipótese para o tratamento de infecções por estirpes de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β-lactamase de espectro alargado, poderá ser uma associação de cefalosporinas da terceira geração ou aztreonamo com inibidores de β-lactamase como o ácido clavulânico (Martínez-Martínez, 1996, Roussel-Delvallez, et al., 1995). Contudo, a presença de TEM-1 nestas estirpes, pode dificultar o tratamento com associação de β-lactâmico com inibidores de β-lactamases (Jarlier et al., 1988, Jacoby, 1984). A nível internacional são comuns as referências de SHV-5 associada a TEM-1, dificultando a terapêutica com associação de β-lactâmico com inibidores de β-lactamases (Gutmann et al., 1989, Vatapoulos et al., 1990).

Roussel-Delvallez e colaboradores, demonstraram que em tratamentos com cefalosporinas de terceira geração, para concentrações iguais às CMI havia recuperação do crescimento após um período em que havia actividade do antibiótico. Este fenómeno poderá explicar a emergência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamases de espectro alargado em pacientes tratados com estes antibióticos, uma vez que para determinados locais de infecção, a concentração obtida *in vivo* poderá ser próxima da CMI. Demonstraram ainda que a associação de amoxicilina+clavulânico com cefotaxima era mais eficaz do que a associação de cefotaxima com sulbactamo (uma vez que o sulbactamo existe isolado, enquanto que o ácido clavulânico só existe comercializado associado a amoxicilina). Para concentrações

obtidas clinicamente demonstraram *in vitro* que o regime de cefotaxima+amoxicilina+ácido clavulânico era tão eficaz como imipenemo. Sugerem que a associação de cefotaxima com amoxicilina+ácido clavulânico seja uma alternativa ao imipenemo, para o tratamento de infecções por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β-lactamases de espectro alargado, devendo previamente estes dados ser confirmados *in vivo* (Roussel-Delvallez, et al., 1995). A eficácia deste regime, poderá contudo ser reduzida em estirpes que produzam concomitantemente TEM-1 em níveis elevados.

Casos de septicemia nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* produtora de TEM-3, foram tratados com sucesso com a associação de cefotaxima com sulbactamo, contudo esta associação poderá não ser eficaz para estirpes produtoras de outras β-lactamases de espectro alargado como por exemplo SHV-5 em que a CMI da associação é demasiado elevada. A associação com ácido clavulânico parece ser a mais eficaz destas associações com inibidores (Sirot, 1995).

A selecção de β-lactâmicos para o tratamento de infecções por estirpes produtoras de β-lactamases de espectro alargado deverá ser criteriosa, uma vez que a presença da enzima não impede o aparecimento de outros mecanismos de resistência, como seja a redução da permeabilidade às cefamicinas. As cefamicinas deverão ser usadas com cuidado no tratamento de infecções por *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamases de espectro alargado devido ao facto de as estirpes clínicas poderem apresentar com facilidade uma redução da expressão das proteínas da membrana externa (Sirot, 1995). As referências de outros autores, ao facto de algumas das estirpes produtoras de SHV-5, apresentarem concomitante alterações da permeabilidade da membrana, responsáveis por resistência a cefamicinas alerta-nos para a necessidade de cuidado na prescrição. Este facto é corroborado pela selecção *in vivo* de estirpes que apresentam alterações de membrana responsáveis por resistência a estes agentes (Pangon et al., 1989, Martínez-Martínez et al., 1996).

A perda de porinas poderá também condicionar a redução da susceptibilidade às fluoroquinolonas (hidrofílicas).

O imipenemo mantém a sua actividade nestes mutantes com porinas reduzidas, devido ao pequeno tamanho e configuração da sua molécula que facilita a difusão através da membrana externa (Martínez-Martínez, 1996).

A emergência de resistência aos carbapenemos, nas enterobacteriáceas, pode envolver alterações na permeabilidade da membrana externa associadas a produção aumentada de cefalosporinase cromossómica (Sirot, 1995), podendo verificar-se um fenómeno semelhante relativamente à associação de produção de β-lactamase tipo Amp C plasmídica e alterações da permeabilidade em *Klebsiella pneumoniae* (Bradford et al., 1997).

O uso restrito do imipenemo para infecções nosocomiais graves parece influenciar positivamente a distribuição das enzimas que hidrolisam os carbapenemos em comparação com outras β-lactamases. Contudo, o aparecimento de metalo-β-lactamases mediadas por plasmídeos na família *Enterobacteriaceae* no Japão, nomeadamente em *Klebsiella pneumoniae*, demonstra a capacidade destas serem transferidas, alertando para a necessidade de uso criterioso destes agentes para evitar a selecção de novas enzimas que hidrolisam os carbapenemos (Rasmussen & Bush, 1997).

O aparecimento de estirpes resistentes às fluoroquinolonas, no Hospital Geral de S^{to}. António poderá estar relacionado com a utilização mais frequente destes agentes nas infecções da comunidade, nos últimos tempos.

As cefalosporinas de quarta geração, começam a constituir uma opção promissora para estas situações, dada a elevada estabilidade às β-lactamases e a boa permeabilidade da membrana externa (Jones, 1997).

5.7 Consequências económicas das infecções nosocomiais

Medidas que reduzam o grau de infecções adquiridas a nível hospitalar e promovam o sucesso da terapia inicial, com redução do tempo de internamento, terão um impacto significativo nos custos dos cuidados de saúde e no número de camas disponíveis (Halls, 1993).

A prevenção dos surtos de infecções nosocomiais será muito importante se considerar-mos as consequências nefastas destas situações que no limite, poderão contribuir para a morte dos doentes em estado grave que contraem estas infecções (Cookson et al., 1995).
As consequências económicas são consideráveis, considerando o tempo de interrupção de funcionamento das unidades, necessário para a erradicação do surto como foi determinado num estudo em Hospitais ingleses, considerando os vários factores necessários para a erradicação e as inconveniências no funcionamento daí decorrentes, como seja a não utilização da Unidade de Cuidados intensivos, alteração da cirurgias programadas e a necessidade do isolamento dos pacientes com pessoal de enfermagem exclusivo para o seu tratamento (Cookson et al., 1995). Estes autores, sugerem a verificação prévia da presença de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* multi-resistentes em pacientes que tenham sido hospitalizados em outros países nos 6 meses anteriores.

A disseminação inter-hospitalar destas estirpes multi-resistentes deverá alertar para as consequências do esbatimento de fronteiras, nos cuidados de Saúde (Cookson, 1995).

5.8 Controle de surtos de infecções nosocomiais

As medidas sugeridas por alguns autores para controle de surtos de infecções nosocomiais, incluem um melhor controle da transmissão pelos procedimentos e pelo pessoal de saúde com ênfase nas medidas de barreira, luvas e desinfecção eficaz, bem como descontaminação digestiva selectiva dos portadores (Arlet et al., 1990).

Num estudo a partir de estirpes isoladas na comunidade, Goldstein e colaboradores, concluíram que as infecções adquiridas na comunidade não deverão ser consideradas completamente susceptíveis a todos os β-lactâmicos. Mais concretamente encontraram estirpes de *Klebsiella pneumoniae* multi-resistentes com características nosocomiais, num lar

de terceira idade, possivelmente devido a transporte de estirpes adquiridas em ambiente hospitalar, ou devido a pressão selectiva dos antibióticos usados (Goldstein, et al., 1995). Em Portugal, verifica-se que a resistência dos isolados hospitalares de *Klebsiella pneumoniae* é mais elevada do que os da comunidade, o que estará relacionado com a resposta à pressão selectiva dos antibióticos usados a nível hospitalar (Neto et al., 1992).

A terapêutica com cefalosporinas da terceira geração pode condicionar resistência de baixo nível nas estirpes da comunidade principalmente em casos de pessoas de idade sujeitas a tratamentos de antibióticos repetidos. Daí a importância de um uso criterioso das cefalosporinas da terceira geração orais.

A utilização de luvas pelo pessoal de enfermagem como forma de protecção pessoal, principalmente a partir da altura em que a transmissão do HIV começou a ser mais preocupante, poderá constituir um factor de contaminação cruzada, uma vez que se as luvas não forem substituídas ou pelo menos descontaminadas entre as várias acções, podem funcionar como veículo de microorganismos, facilitando a infecção cruzada de vários doentes (Cohen, 1992). A observação da actuação de profissionais de enfermagem, no Serviço de colheitas do Hospital de S^{to}. António, alertou-nos para esta questão. O profissional de saúde utiliza as mesmas luvas para todas as colheitas que efectua, por vezes, as luvas apresentam manchas de sangue de colheitas anteriores e a mera utilização de algodão embebido em álcool, num contacto rápido com a pele do paciente, poderá não ser suficiente para evitar alguma possível contaminação.

O aparecimento de estirpes do mesmo tipo de perfil de restrição do DNA genómico, sugere a contaminação por procedimentos e por transferência através das mãos do pessoal, de acordo com o sugerido por alguns autores (Gerding et al., 1979).

Procedimentos invasivos como cateterização vesical são factores predisponentes à colonização e infecção.

De acordo com a bibliografia internacional, o controle destes tipos de surtos deverá envolver medidas de restrição do uso de determinados antibióticos bem como a implementação de medidas de controle de infecção mais eficazes (Meyer et al., 1993). Deverá ter-se em

atenção que nem todos os procedimentos para lavagem de mãos do pessoal de saúde serão eficazes para a eliminação de estirpes de *Klebsiella* (Casewell & Phillips, 1977).

5.9 Hipóteses para justificação da clonalidade

A existência de uma estirpe endémica nesta zona do país que pelas suas características especiais, colonize a população e que quando pressionada evolua no sentido da produção de β-lactamases que condicionam nível de resistência elevado às cefalosporinas de terceira geração e aztreonamo, poderá contribuir para este quadro. A presença de TEM-1 que aparece associada à β-lactamase de espectro alargado, poderá justificar-se pela prevalência dos genes que a codificam, na generalidade da população (Thomson, Shanahan & Amyes, 1994).

Poderá existir uma estirpe nosocomial predominante, condicionando baixo nível de resistência que quando causa infecção e é pressionada selectivamente, evolui no sentido de nível de resistência mais elevado, justificando os surtos clonais .

Poderão existir casos índice que uma vez admitidos no Hospital, poderão transferir a estirpe para outros doentes por infecção cruzada.
Estes casos índice poderão ser devidos a doentes sujeitos a terapêuticas anti-infecciosas anteriores em internamentos hospitalares prévios, ou lares de terceira idade, como referido na bibliografia internacional. Estes são casos particulares de infecções na comunidade por estirpes que têm características comuns às estirpes hospitalares (Goldstein et al., 1995).

Referências internacionais de surtos clonais de infecções nosocomiais por *Klebsiella pneumoniae* com disseminação inter-hospitalar (Arlet et al, 1994, Sader, Pfaller & Jones, 1994), corroboram o que foi por nós detectado nesta zona do País e que poderá ser devido à transferência de doentes entre vários Hospitais da mesma zona, bem como devido à

sobrevivência das estirpes epidémicas nas mãos do pessoal que presta cuidados de saúde. A implementação de medidas de controle de infecção é fundamental para evitar a disseminação das estirpes, com especial ênfase nas medidas de lavagem de mãos do pessoal e isolamento dos doentes infectados e ou colonizados, bem como de uma vigilância epidemiológica para uma rápida detecção e controle destes surtos.

Conclusões

6. Conclusões

Os resutados demonstram que SHV-5 é o tipo de β-lactamase de espectro alargado prevalente em *Klebsiella pneumoniae* no Norte de Portugal, sendo responsável pela resistência às cefalosporinas da terceira geração e aztreonamo em surtos de infecções hospitalares.
As enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos prevalentes são AAC(3)-II e APH(3')-I, aparecendo normalmente associadas.

A incidência de SHV-2 poderá estar relacionada com o seu aparecimento na fase inicial dos surtos, sendo posteriormente substituída por SHV-5, contribuindo para este fenómeno, o nível baixo de resistência condicionado por esta enzima, nestas condições.

O aparecimento concomitante de TEM-1, na maioria dos isolados clínicos, confere vantagem competitiva a estas estirpes, dificultando a terapêutica com associações de β-lactâmicos com inibidores de β-lactamase. Este fenómeno poderá relacionar-se com a ubiquidade dos genes codificadores de TEM-1, na flora normal da comunidade saudável.

O aparecimento de TEM-6 no início do estudo e de TEM-26 como β-lactamase epidémica no Hospital de S^{ta}. Maria, associadas a AAC(3)-II, demonstra que as condições particulares em cada momento e em cada local, podem condicionar o tipo de resistência, alertando para a necessidade da avaliação molecular dos fenómenos de resistência e a vigilância da evolução dos mesmos. O aparecimento de AAC(6')-I associada à β-lactamase de espectro alargado, em associação a AAC(3)-II, em alguns dos isolados clínicos, poderá corresponder a uma resposta adaptativa a alterações da pressão pelos aminoglicosídeos.

A resistência múltipla dos isolados clínicos estudados, a antibióticos de várias famílias, alerta-nos para a dificuldade da terapêutica das infecções causadas por estes agentes nosocomiais.

A disseminação clonal, intra e inter-hospitalar, de estirpe com elevada resistência aos antibióticos, produtora de SHV-2 ou SHV-5, TEM-1, AAC(3)-II e APH(3')-I, demonstra a importância de medidas de controle de infecção para a redução deste fenómeno.

Situações epidémicas em que o fenómeno mais relevante para a disseminação da resistência será a transferência do determinante genético da mesma β-lactamase de espectro alargado, SHV-5, associada a enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos, por plasmídeo conjugativo, demonstra a variabilidade dos padrões de disseminação da resistência em *Klebsiella pneumoniae* a nível hospitalar.

Este é um estudo de características eminentemente aplicadas, esperando que esta intervenção venha alertar para algumas das características destes fenómenos e para a necessidade de uma monitorização da evolução dos fenómenos de resistência aos antibióticos, no ecossistema específico que o ambiente Hospitalar constitui.

É necessário um conhecimento da realidade do nosso País, relativamente à epidemiologia da resistência aos antibióticos, principalmente a nível hospitalar e para patogénicos considerados problemáticos, pela sua capacidade de adaptação à pressão selectiva nosocomial.

Bibliografia

7. Bibliografia

. **Ambler R. P. , A. F. W. Coulson; J.-M. Frère, J.-M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R. C. Levesque, G. Tiraby and S. G. Waley.** 1991. A standard numbering scheme for the class A β-lactamases. Biochem. J.. **276:** 269-272

. **Arakawa Y., M. Murakami, K. Suzuki, H. Ito, R. Wacharotayankun, S. Ohsuka, N. Kato and M. Ohta.** 1995. A novel integron-like element carrying the metallo-lactamase gene *bla* $_{IMP}$. Antimicrob. Agents Chemother.. **39:** 1612-1615

. **Archambaud M., G. Gerbaud, E. Labau, N. Marty and P. Courvalin.** 1991. Possible in-vivo transfer of β-lactamase TEM-3 from *Klebsiella pneumoniae* to *Salmonella kedougou*. J. Antimicrob. Chemother.. **27:** 427-436

. **Arlet G, M. Rouveau, I. Casin, P. J. M. Bouvet P. H. Lagrange, and A. Philippon.** 1994. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV_4 β-lactamase and wich were isolated in 14 french hospitals. J. Clin. Microbiol. **32:** 2553-2558

. **Arlet G., M. J. Sanson-le-Pors, M. Rouveau, G. Fournier, O. Marie, B. Schlemmer and A. Philippon.** 1990. Outbreak of nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-4 β-lactamase. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.. **9:** 797-803

. **Arlet G., M. Rouveau, D. Bengoufa; M. H. Nicolas and A. Philippon.** 1991. Novel transferable extended-spectrum β-lactamase (SHV-6) from *Klebsiella pneumoniae* conferring selective resistance to ceftazidime. FEMS Microbiol. Lett.. **81:** 57-62

. **Ascenzi J. M..** 1996 Antiseptics and their role in infection control. In: Handbook of disinfectants and antiseptics. : pgs 63- 72. Ed. Ascenzi J. M.. Eds Marcel Dekker, Inc.. New York

. **Baquero F. and J. Blázquez.** 1993. The evolution of β-lactamases. In: 6th European Congress of Chemotherapy - Seville - Spain - April 1993

. **Barthélémy M., J. Péduzzi and R. Labia.** 1988. Complete aminoacid sequence of p453-plasmid-mediated PIT-2 β-lactamase (SHV-1). Biochem. J.. **251:** 73-79

. **Bauernfeind A., Y. Chong and S. Schweighart.** 1989. Extended broad spectrum β_lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. Infection. **17:** 316-321

. **Bauernfeind, A., E. Rosenthal, E. Eberlein, M. Holley, S. Schweighart.** 1993. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 β-lactamase among hsopitalized patients. Infection. **21:** 18-22

. **Beloborodova, N. V., A. V. Biryukov, V. A. Kurchavov and E. N. Krutskih.** 1994. Translocation of bacteria from intestine and its role in sepsis. In Abstracts of "2nd Scientific Meeting of the European Society of Chemotherapy" App. 1 - Coimbra - Portugal - 1994

. **Bermudes H., F. Jude, C. Arpin, C. Quentin, A. Morand and R. Labia.** 1997. Characterization of an inhibitor-resistant TEM (IRT) β-lactamase in a novel strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother.. **41:** 222

. **Bingen E. H., P. Desjardins, G. Arlet, F. Bourgeois, P. Mariani-Kurkdjian, N. Y. Lambert-Zechovsky, E. Denamur, A. Philippon, and J. Elion**. 1993. Molecular epidemiology of plasmid spread among extended-broad spectrum β-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hsopital. J. Clin. Microbiol. **31:** 179-184

. **Boisivon A., Y. Pean, M. P. Le Pennec, J. Bejot, L. Berardi-Grassias, A. Eme, J. Gertner, B. Hacquard, J. Morice, M. Rouchon.** 1992. β-lactam and aminoglycoside resistance among Enterobateriaceae. J. Antimicrob. Chemother.. **30:** 872-874

. **Bradford P. A., C. E. Cherubin, V. Idemyor, B. A. Rasmussen and K. Bush.** 1994. Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago Hospitals: identification of the extended-spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolysing β-lactamases in a single isolate. Antimicrob. Agents Chemother.. **38:** 761-766

. **Bradford P., C. Urban, N. Mariano, S. J. Projan, J. Rahal, and K. Bush**. 1997. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated Amp-C β-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. Antimicrob. agents Chemother. **41:** 563-569

. **Bradford, M.M..** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72:** 248-254

. **Brown F. J., and L. Brown.** 1991. Evaluation of the E test, a novel method of quantifying antimicrobial activity. J. Antmicrob. Chemother. **27:** 185-190

. **Brun-Buisson C, A. Philipon, M. Ansquer, P Legrtand, F. Montravers, J. Duval.** 1987. Transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. Lancet. **8:** 302-306

. **Brun-Buisson C., P. Legrand, A. Rauss, C. Richard, F. Montravers, M. Besbes, J. L. Meakins, C. J. Soussy anf F. Lemaire.** 1989. Intestinal decontamination for control of nosocomial multiresistant Gram-negative bacilli. Ann. Intern. Med.. **110:** 873-881

. **Bunny K. L., R. M. Hall and H. W. Stokes.** 1995. New mobile gene cassetes containing an aminoglycoside resistance gene, *aacA7*, and a chloramphenicol resistance gene, *catB3*, in an integron in pBWH301. Antimicrob. Agents Chemother.. **39:** 686-693

. **Buré A., P. Legrand, G. Arlet, V. Jarlier, G. Paul, and A. Philippon.** 1988. Dissemination in five french hospitals of *Klebsiella pneumoniae* serotype K25 harbouring a new transferable enzymatic resistance to third generation cephlosporins and aztreonam. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **7:** 780-782

. **Burwen D. R., S. N. Banerjee, R. P. Gaynes, and the National Nososcomial Surveillance System.** 1994. Ceftazidime resistance among selected nosocomial Gram-negative bacilli in the United States. J. Infect. Dis.. **170:** 1622-1625

. **Bush K.** 1996. Is it important to identify extended-spectrum β-lactamases producing isolates? Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.. **15:** 361-364

. **Bush K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros.** 1995. A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother.. **39:** 1211-1233

. **Bush, K.** 1989. Characterization of β-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother.. **33:** 259-263

. **Bush, K. and R. Sykes.** 1986. Methodology for the study of β-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. **30:** 6-10

. **Caniça M. M., M. Barthélémy, L. Gilly, R. Labia, R. Krishnamoorthy and G. Paul.** 1997. Properties of IRT-14 (TEM-45), a newly characterized mutant of TEM-type β-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother.. **41:** 374-378

. **Casewell M. and I. Phillips.** 1977. Hands as a route of transmission for Klebsiella species. Brit. Med. J.. **2:** 1315-1317

. **Cassel and Task Force on Antibiotic Resistance.** 1995. Report of The ASM Task Force on Antibiotic Resistance. Antimicrob. Agents Chemother.. **39:** Suppl. 1-23

. **Cassel G. H..** 1995. ASM task force urges broad program on antimicrobial resistance. ASM News **61:** 116-120

. **Caswell M. W. and N. Desai.** 1983. Survival of multiply-resistant *Klebsiella aerogenes* and other Gram-negative bacilli on finger-tips. **4:** 350-360

. **Chanal C. M., D. L. Sirot, A. Petit, R. Labia, A. Morand, J. L. sirot and R. Cluzel.** 1989. Multiplicity of TEM-derived β-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at the same Hospital and relationships between the responsible plasmids. Antimicrob. Agents Chemother.. **33:** 1915-1920

. **Chanal-Claris C., D. Sirot, L. Bret, P. Chatron, R. Labia, and J. Sirot.** 1997. Novel extended-spectrum TEM-type β-lactamase from an *Escherichia coli* isolate resistant to ceftazidime and susceptible to cephalotin. Antimicrob. Agents Chemother. **41:** 715-716

. **Chopra I., J. Hodgson, B. Metcalf, and G. Poste.** 1997. The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother.. **41:** 497-503

. **Cohen M. L..** 1992. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antibiotic era. Science. **257:** 1050-1055

. **Colardyn F, J. L. Gala, G. Verchraegen, G. Wauters, D. Vogelaers, A. Dive, G. Claeys, A. Magis, B. Vandercam and P. Mahieu.** 1991. Infections in patients in

intensive care units: can the combination of a monobactam and a penicillin replace the classic combination of a β-lactam agent and an aminoglycoside? Rev. Infect. Dis.. **13 (Suppl. 7):** 640-644

. **Collis C. M. and R. M. Hall.** 1995. Expression of antibiotic resistance gens in the integrated cassetes of integrons. Antimicrob. Agents Chemother.. **39:** 155-162

. **Cookson B., A. P. Johnson, B. Azdian, J. Paul, G. Hutchinson, M. Kaufmann, N. Woodford, M. Malde, B. Walsh, A. Yousif, and J. Selkon.** 1995. Inter and Intrahospital pacient spread of a multiple antibiotic-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. J. Infect. Dis. **171:** 511-513

. **Coovadia Y. M., A. P. Jonhson, R. H. Bhana, G. R. Hutchinson, R. C. George and I. E. Hafferjee.** 1992. Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal nursery: the importance of maintenance of infection control policies and procedures in the prevention of outbreaks. J. Hosp. Infect.. **22:** 197-205

. **Cormican M. G., S. A. Marshall and R. N. Jones.** 1996. Detection of extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. J. Clin. Microbiol.. **34:** 1880-1884

. **Costa, M.N., D. Costa, C. G. Ribeiro, J. S. Moreira, M. J. Salgado, M.V. V. Pato.** 1993. Padrões portugueses de resistência bacteriana aos antibióticos. Rev. Portug. Doenças Infecc. **16:** 63-71

. **Courvalin P., F. Goldstein, A. Philippon and A. Sirot.** 1985 L'Antibiogramme. MPC-Videom Eds. - Paris

. **Courvalin P..** 1991. Genotypic approach to the study of bacterial resistance to antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother.. **35:** 1019-1023

. **Craven D. E..** 1992. Use of selective decontamination of the digestive tract. Is the light at the end of the tunnel red or green? Ann. Intern. Med.. **117:** 609-611

. **Cristino J. M., A. F. Alves, E. Calado, D. Costa, M. N. Costa, L. Ferro, C. Fonseca, L. Lito, J. Marques, T. Marques, J. S. Moreira, M. H. Ramos, C. G. Ribeiro, G. Ribeiro and M. J. Salgado.** 1994. Microrganismos isolados em laboratórios hospitalares portugueses - Experiência de sete hospitais centrais. Rev. Portug. D. Infec.. **17:** 147-154

. **Darfeuille-Michaud, A., C. Jallat, D. Aubel, D. Sirot, C. Rich, J. Sirot, and B. Joly.** 1992. R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections. Infect. Immun. **60:** 44-55

. **De Champs C., D. Sirot, C. Chanal, M-C. Poupart, M-P. Dumas, and J. Sirot.** 1991: Concomitant dissemination of three extended spectrum β-lactamases among different *Enterobacteriaceae* isolated in a French hospital. J. Antimicrob. Chemother.. **27:** 441-457

. **DECO.** 1997. Antibióticos na carne? Pro Teste. **166:** 23-26

. **Deguchi T., A. Fuoka, M. Yasuda, M. Nakano, S. Ozeki, E. Kanematsu, Y. Nishino, S. Ishihara, Y. Ban, and Y. Kawada.** 1997. Alterations in the gyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents. Chemother. **41:** 699-701

. **Du Bois S. K., M. S. Marriot and S. G. B. Amyes.** 1993. Does clavulanic acid select extended-spectrum β-lactamases? In: European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Seville - Spain - Abstract 487

. **Du Bois S. K., M. S. Marriot and S. G. B. Amyes.** 1995. TEM and SHV-derived extended-spectrum β-lactamases: relationship between selection, structure and function. J. Antimicrob. Chemother.. **35:** 7-22

. **Duarte A., R. V. Correia da Silva and A. Pereira.** 1988 a. Estirpes multiresistentes de *Klebsiella pneumoniae* - seu estudo numa Unidade Hospitalar. Rev. Portug. Doenças Infecc. **11:** 227-233

. **Duarte A., R. V. Correia da Silva and A. Pereira.** 1988. Marcadores epidemiológicos de *Klebsiella pneumoniae*. Rev. Portug. Doenç. Infecc.. **11:** 217-225

. **Eisen D., E. G. Russel, M. Tymms, E. J. Roper, M. L. Grayson, and J. Turnidge.** 1995. Random amplified polymorphic DNA and plasmid analises used in investigation of an outbreakof multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. J. Clin. Microbiol.. **33:** 713-717

. **Elwell, L. P. and S. Falkow.** 1980. The characterization of plasmids that carry antibiotic resistance genes. In: Antibiotics in laboratory medicine. Lorian. Williams and Wilkins Eds.. Baltimore.

. **FDA.** 1997. New antimicrobial agents approved by the U. S. Food and Drug Administration in 1996 and new indications for previously approved agents. Antimicrob. Agents Chemother.. **41:** 878

. **Fernadez-Rodriguez, A., R. Canton, J. C. Perez-Diaz, J. Martinez-Beltran, J. J. Picazo, and F. Baquero.** 1992. Amminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates harboring extended-spectrum β-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. **36:** 2536-2538

. **Ferreira H. M. N., J. C. Sousa and L. M. Peixe.** 1992. Caracterização das β-lactamases responsáveis pela resistência de estirpes hospitalares de *Klebsiella pneumoniae* aos antibióticos β-lactâmicos. Rev. Portug. Doenças Infecc.. **15:** 207-209

. **Ferreira H. N., G. Miller, J. C. Sousa, M. J. M. Vaz, L. M. Peixe.** Enzimas inactivadoras dos aminoglicosídeos elaboradas por estirpes bacterianas do Norte de Portugal. 2° Congresso Nacional de Doenças Infecciosas - 1993

. **Ferreira, H. N. , G.H. Miller, M. J. M. Vaz, M. L. Queirós, L.M. V. Peixe, G. C. Silva, O. Cardoso, R. Leitão, J. C. Sousa.** 1994. Caracterização molecular da resistência bacteriana aos antibióticos aminoglicosídeos-aminociclitóis em isolados clínicos hospitalares. Arq. Med. **8:** 137-139

. **Fisher J., J. G. Belasco, S. Khosla and J. Knowles.** 1980. β-lactamase proceeds via an acyl-enzyme intermediate. Interaction of the *Escherichia coli* RTEM enzyme with cefoxitin. Biochemistry **19:** 2895-2901

. **Gerding D. N., A. E. Buxton, R. A. Hughes, P. P. Cleary, J. Arbaczawski, and W. E. Stamm.** 1979. Nosocomial multiply resistant *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology of an outbreak of apparent index case origin. Antimicrob. Agents Chemother. **15:** 608-615

. **Gerolymatos, C., E. Kouskouni, C. Kaliyannakis, S. Pactitis, and G. Kaparos.** 1994. Urinary tract infections in nursing home residents. In Abstracts of "2nd Scientific Meeting of the European Society of Chemotherapy" P 102 - Coimbra - Portugal - 1994

. **Ghuysen J.M..** 1991. Serine β-lactamases and penicillin-binding proteins. Annu. Rev. Microbiol.. **45:** 37-67

. **Goering and the molecular epidemiology study group.** Abstract of the Third International meeting on bacterial epidemiological markers - Cambridge - April - 1994

. **Goldstein, F. W., Y. Péan, A. Rsato, J. Gertner, L. Gutmann, and the Vigil'Roc study group.** 1993. Characterization of ceftriaxone-resistant *Enterobacteriaceae*: a multicentre study in 26 French hospitals. J. Antimicrob. Chemother.. **32:** 595-603

. **Goldstein, F. W., Y. Péan, J. Gertner, and The Vigil'Roc study group.** 1995 Resistance to ceftriaxone and other β-lactams in bacteria isolated in the community. Antimicrob. Agents Chemother.. **39:** 2516-2519

. **Gouby, A., C. Neuwirth, G. Bourg, N. Bouziges, M.J. Carles-Nurit, E. Despaux, and M. Ramuz.** 1994. Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital. J. Clin. Microbiol.. **32:** 301-305

. **Gould I. M..** 1994. Risk factors for acquisition of multiply drug-resistant Gram-negative bacteria. Eur. J. Clin. Micrbiol. Infect. Dis.. **13 (Suppl. 1):** 30-38

. **Goussard S., W. Sougakoff, C. Mabilat, A. Bauernfeind, and P. Courvalin.** 1991. An IS*1*-like element is responsible for high-level synthesis of extended-spectrum β-lactamase TEM-6 in *Enterobacteriaceae*. J. Gen. Microbiol.. **137:** 2681-2687

. **Gur D., T. L. Pitt, L. M. C. Hall,H. E. Akalin, D. M. Livermore.** 1992. Diversity of Klebsiellae with extended-spectrum β-lactamases at a Turkish University Hospital. J. Hosp. Infect.. **22:** 163-178

. **Gutmann L., M. D. Kitzis, D. Billot-Klein, F. Goldstein, G. Tran Van Nhieu, T. Lu, J. Carlet, E. Collatz and R. Williamson.** 1988. Plasmid-mediated β-lactamase (TEM-7) involved in resistance to ceftazidime and aztreonam. Rev. Infect. Dis.. **10:** 860-866

. **Gutmann L..** 1993. Mode of action of cephalosporins. In: 6th European Congress of Chemotherapy - Seville - Spain - March 1993 - The septic patient: Effect of plasmid-mediated cephalosporinases and endotoxins - Abstract 1

. **Gutmann, L., B. Ferré, F. W. Goldstein, N. Rizk, E. Pinto-Schuster, J.F. Acar, and E. Collatz.** 1989. SHV-5, a novel SHV-type β-lacatamse that hydroyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. Antimicrob. Agents Chemother. **33:** 951-956

. **Gutmann, L., R. Williamson, N. Moreaus, M-D. Kitzis, E. Collatz, J.F. Acar, and F. Goldstein.** 1985. Cross-resistance to nalidixic acid, thimethoprim, and chloramphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of *Klebsiella, Enterobacter*, and *Serratia.* J. Infect. Dis. **151:** 501-507

. **Hall A. and J. R. Knowles.** 1976. Direct selective pressure on a β-lactamase to analise molecular changes involved in development of enzyme function. Nature **264:** 803-804

. **Halls G. A..** 1993. The management of infections and antibiotic therapy: a European survey. J. Antimicrob. Chemother.. **31:** 985-1000

. **Hannecart-Pokorni E., F. Depuydt, L De Wit, E. V. Bossuyt, J. Content and R. Vanhoof.** 1997. Characterization of the 6'-*N*-aminoglycoside acetyltransferase gene *aac(6')-Il* associated witha a *sulI*-type integron. Antimicrob. Agents Chemother.. **41:** 314-318

. **Heritage J., P. M. Hawkey, N. Todd, and I. J. Lewis.** 1992. Transposition of the gene encoding a TEM-12 extended-spectrum β-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. **36:** 1981-1986

. **Hibbert-Rogers, L. C. F., J. Heritage, D. M. Gascoyne-Binzi, P. M. Hawkey, N. Todd, I. J. Lewis and C. Bailey.** 1995. Molecular epidemiology of ceftazidime resistant Enterobactaeriaceae from patints on a paediatric oncology ward. J. Antimicrob. Chemother.. **36:** 65-82

. **Hibbert-Rogers, L. C. F., J. Heritage, N. Todd, and P. M. Hawkey.** 1994. Convergent evolution of TEM-26, a β-lactamase with extended-spectrum activity. J. Antimicrob. Chemother.. **33:** 707-720

. **Horii T., Y. Arakawa, M. Ohta, S. Ichiyama, R. Wacharotayankun and N. Kato.** 1993. Plasmid-mediated AmpC-type β-lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* confers resistance to broad-spectrum β-lactams, including moxalactam. Antimicrob. Agents. Chemother.. **37:** 984-990

. **Hou, J. P., and J. W. Poole.** 1972. Measurement of β-lactamase activity and rate of inactivation of penicilins by a pH-stat alkalimetric titration method. **61:** 1594-1598

. **Huletsky A., J. R. Knox and R. C. Levesque.** 1993. Role of Ser-238 and lys-240 in the hydrolisis of third generation cephalosporins by SHV-type β-lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modelling. J. Biolog. Chem.. **268:** 3690-3697

. **Hunter J. E. B., J. E. Corkill, A. G. Mc.Lennan, J. N. Flectcher and C. A. Hart.** 1993. Plasmid encoded β-lactamases resistant to inhibition by clavulanic acid produced by calf fecal coliforms. Res. Veterin. Scie. **55:** 367-370

. **Huovinen, S.** 1988. Rapid isoelectric focusing of plasmid-mediated β-lactamases with Pharmacia phast system. Antimicrob. Agents Chemother. **32:** 1730-1732

. **Jacoby G. A. and P. Han.** 1996. Detection of extended-spectrum β-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol.. **34:** 908-911

. **Jacoby G. A. and A. A. Medeiros.** 1991. More extended-spectrum β-lactamases. Antimicrob. Agents. Chemother.. **35:** 1697-1704

. **Jacoby G. A. and L. Sutton.** 1991. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother.. **35:** 164-169

. **Jacoby G. A..** 1993. The epidemiology of extended-spectrum β-lactamases. In: 6th European Congress of Chemotherapy - Seville - Spain - March 1993 - The septic patient: Effect of plasmid-mediated cephalosporinases and endotoxins - Abstract 2

. **Jacoby G. A..** 1994. Genetics of extended-spectrum β-lactamases. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.. **13 (Suppl.1):** 2-11.

. **Jacoby, G. A., and A. A. Medeiros.** 1991. More extended spectrum β-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother.. **35:** 1697-1704

. **Jarlier V., M-H. Nicolas, G. Fournier and A. Philippon.** 1988. Extended-spectrum β-lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect. Dis.. **10:** 867-878

. **Jarlier, V., M-H. Nicolas, G. Fournier, and A. Philippon.** 1988. Extended broad-spectrum β-lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev. Infect. Dis., **10:** 867-878

. **Jett B. D., D. J. Ritchie, R. Reichley, T. C. Bailey and D. F. Sahm.** 1995. "In vitro" activities of various β-lactam antimicrobial agents against clinical isolates of *Escherichia coli* and Klebsiella spp. resistant to oxyimino cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. **39:** 1187-1190

. **Johnson A. P., M. J. Weibren, B. Ayling-Smith, S: K. Du Bois, S. G. B. Amyes and R. C. George.** 1992. Outbreak of infection in two UK hospitals caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* resistant to cefotaxime e ceftazidime. J. Hosp. Infect.. **20:** 97-103

. **Jones R. N..** 1997. β-lactamase mediated resistance in hospital pathogens. In: Abstracts of The 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. S77. Lausanne - Switzerland - May, 1997

. **Kado C. I., and S. T. Liu.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol. **145:** 1365-1373

. **Kadurugamuwa, J. L., H. Anwar, M. R. W. Brown, B. Hengstler, S. Kunz, and O. Zak.** 1988. Influence of cephalosporins and iron on surface protein antigens of *Klebsiella pneumoniae* "in vivo". Antimicrob. Agents Chemother. **32:** 364-368

. **Katsanis G. and G. Jacoby.** 1992. The frequency of extended-spectrum β-lactamases in isolates of *Klebsiella pneumoniae*. J. Antimicrob. Agents. Chemother.. **29:** 345-353

. **Katsanis, G. P., J. Spargo, M. J. Ferraro, L. Sutton, and G. Jacoby**. 1994. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β-lactamases. J. Clin. Microbiol. **32:** 691-696

. **Kazmierczak, A., A. Philippon, H. Chardon, R. Labia, et F. Le Goffic.** 1973. Constants enzymatics (Km et Vmax) des β-lactamases mesurées par une méthode micro-acidimétrique couplée a l'ordinateur. Ann.Microbiol. (Inst. Past.), **124 B:** 259-268

. **Kliebe, C., B. A. Nies, J. F. Meyer, R. M. Tolxdorff-Neutzling, and B. Wiedemann.** 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob. agents Chemother. **28:** 302-307

. **Knox J. R..** 1995. Extended spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β-lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. Antimicrob. Agents Chemother.. **39:** 2593-2601

. **Kresken M., D. Hafner, H. Mittermayer, L. Verbist, E. Bergogne-Berezin, H. Giamarellou, S. Esposito, B. van Klingeren, F. H. Kaiser, D. S. Reeves and Study group Paul-Erlich-Society for Chemoterapy, European Study Group " Bacterial Resistance".** 1993. Prevalence of antibiotic resistance in Europe, 1990. In: European Congress of Cllinical Microbiology and Infectious Diseases. Seville - Spain - Abstract 508

. **Kuzin A. P., H. Liu, J. A. Kelly and J. R. Knox.** 1995. Binding of cephalotin and cefotaxime to D-ala-D-ala-peptidase reveals a functional basis of a natural mutation in a low-affinity penicillin-binding protein and in extended-spectrum β-lactamases. Biochem. **34:** 9532-9540

. **Labia R., A. Morand, K. Tiwari, J. Sirot, D. Sirot and A. Petit.** 1988. Interactions of new plasmid-mediated β-lactamases with third-generation cephalosporins. Rev Infect. Dis.. **10:** 885-891

. **Labia, R., J. Andrillon, and F. Le Goffic.**1973. Computerized microacidimetric determination of the β-lactamase Michaelis-Menten constants. FEBS letters. **33:** 42-44

. **Laemmli, U.K..** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature **227:** 680-685

. **Lafond M., F. Couture, G. Vézina and R. C. Levesque.** 1989 Evolutionary perspectives on multiresistance β-lactamase transposons. J. Bacteriol.. **171:** 6423-6429

. **Lee K-Y., J. D. Hopkins, and M. Syvanen.** 1990. Direct involvement of IS*26* in an antibiotic resistance operon. J. Bacteriol. **172:** 3229-3236

. **Legakis, N. J., L. S. Tzouvelekis, G. Hatzoudis, E. Tzelepi, A. Gourkou, T.L.Pitt, and A. C. Vatapoulos.** 1995. *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals. dissemination of plasmids enconding an SHV-5 type β-lactamase J. Hosp. Infect. **31:** 177-178

. **Leiza M. G., J. C. P. Diaz, J. Ayala, J. M. Casellas, J. Martinez-Beltran, K. Bush and F. Baquero.** 1994. Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated β-lactamase with two molecular variants. Antimcrob. Agents Chemother. **38:** 2150-2157

. **Lemozy J., D. Sirot, C. Chanal, C. Huc, R. Labia, H. Dabernat and J. Sirot.** 1995. First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) β-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother.. **33:** 2580-2582

. **Levy S. B..** 1996. Microbial threats and the global society. Emerg. Infect. Dis. **2:** 62-63

. **Liu P. Y. F., D. Gur, L. M. C. Hall and D. M. Livermore**. 1992. Survey of the prevalence of β-lactamases amongst 1000 Gram-negative bacilli isolated conscutively at the Royal London Hospital. J. Antimicrob. Chemother.. **30:** 429-447

. **Livermore D. M..** 1993 Cellular location of β-lactamase in relation to antibiotic resistance. In: 6th European Congress of Chemotherapy - Seville - Spain - April 1993

. **Livermore D. M..** 1993. Carabapenemases: The next generation of β-lactamases? ASM News **59:** 129-135

. **Livermore D. M..** 1995. β-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev.. **8:** 557-584

. **Loupa, C., K. Papaefstathiou, D. Voyatzoglou, A. Karaitianou, M. Zouberi, Z. Zissopoulou and E. Sbarounis.** 1994. The pharyngeal flora in an internal medicine department and the susceptibility of isolates to antibiotics. In Abstracts of "2nd Scientific Meeting of the European Society of Chemotherapy" P 17 - Coimbra - Portugal - 1994

. **Lynch, M.J., G.L. Drusano, and H.L.T. Mobley.** 1987. Emergence of resistance to imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **31:** 1892-1896

. **M'Zali F.-H., D. M. Gascoyne-Binzi, J. Heritage and P. M. Hawkey.** 1996. Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV β-lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polimorphism. J. Antimicrob. Chemother. **37:** 797-802

. **Mabilat C. and P. Courvalin.** 1990. Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of TEM β-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. Antimicrob. Agents Chemother.. **34:** 2210-2216

. **Mabilat C., J. Lourenço-Vital, S. Goussard and P. Courvalin.** 1992. A new example of physical linkage between Tn1 and Tn21: the antibiotic multiple-resistance region of plasmid pCFF04 encoding extended-spectrum β-lactamase TEM-3. Mol. Gen. Genet.. **235:** 113-121

. **Mainardi J-L, X Y Zhou, F Goldstein, J. Mohler, R. Farinotti, L. Gutmann and C. Carbon.** 1994. Activity of isepamicin and selection of permeability mutants to β-lacatams during aminoglycoside therapy of experimental endocarditis due to *Klebsiella pneumoniae* CF104 producing an aminoglycoside acetyltransferase 6' modifying enzyme and a TEM-3 β-lactamase. J. Infect. Dis. **169:** 1318-1324

. **Maniatis, A. N., G. Katsanis, J. Trougakos, N. A. Maniatis, and N. J. Legakis.** 1994. Antimicrobial agents resistance patterns of Gram-negative bacilli in a general hospital from 1986 to 1992. In Abstracts of "2nd Scientific Meeting of the European Society of Chemotherapy" OC 15 - Coimbra - Portugal - 1994

. **Maniatis, A., J. Palermos, N. Maniatis, J. Palamidas, and N. J. Legakis.** 1994a. Trends in the microbial etiology of nosocomial infections in a general hospital. In Abstracts of "2nd Scientific Meeting of the European Society of Chemotherapy" OC 20 - Coimbra - Portugal - 1994

. **Martínez-Martínez, L., S. Hernández-Allés, S. Albertí, J. M. Tomás, V. J. Benedi, and G. Jacoby.** 1996. "In vivo" selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. **40:** 342-348

. **Matagne A. and J-M. Frère.** 1995. Contribution of mutant analysis to the understanding of enzyme catalysis: The class A β-lactamases. Biochim. Biophys. Acta. **1246:** 109-127

. **Mathew M..** 1979. Plasmid-mediated β-lactamases of Gram-negative bacteria: properties and distribution. J. Antimicrob. Chemother. **5:** 349-358

. **Mathew, M., A. M. Harris, M. J. Marshall, and G.W. Ross.** 1975. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β-lactamases . J. Gen. Microbiol. **88:** 169-178

. **Mathew, M., R.W. Hedges.** Analytical isoeletric focusing of R factor-determined β-lactamases: correlation with plasmid compatibility. J. Bacteriol. **125:** 713-718

. **Matsumoto H., T. Sawai, T. Tazaki, S. Yamagishi and S. Mitsuhashi.** 1972. Characterization of the chromossomaly mediated penicillinase in *Klebsiella pneumoniae*. Japan. J. Microbiol. **16:** 169-176

. **Medeiros A. A..** 1993 a). Update on plasmid-mediated extended-spectrum β-lactamases. In: 6th European Congress of Chemotherapy. Seville - Spain - April 1993

. **Medeiros A. A..** 1993. Nosocomial outbreaks of multiresistant bacteria: extended-spectrum β-lactamases have arrived in North America. Ann. Intern. Med.. **119:** 428- 430

. **Mercier J. and R. C. Lavesque.** 1990. Cloning of SHV-2, OHIO-1, and OXA-6 β-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother.. **34:** 1577-1583

. **Meyer K. S., C. Urban, J. A. Eagan, B. J. Berger, and J. J. Rahal.** 1993. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generatiuon cephalosporins. Ann. Intern. Med.. **119:** 353-358

. **Miller G.** 1996. Aminoglycoside resistance mechanisms study. Buçaco - Portugal

. **Miller, G. H., and The Aminoglycoside Resistance Study Groups.** 1994. Increasing complexity of aminoglycoside resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. APUA Newsletter **12:** 1,5-7

. **Miller, G. H., F. J. Sabatelli, L. Naples, R. S. Hare, K. J. Shaw, and the aminoglycoside study groups.** 1995. The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and the role of isepamicin - a new broad-spectrum aminoglycoside. J. Chemother. **7 (Suppl. 2):** 31-44

. **Miller, G. H., F. J. Sabatelli, R.S. Hare, Y. Glupczynski, P. Mackey, D. Shlaes, K. Shimizu, K. J. Shaw, and The Aminoglycoside Resistance Study Groups *.** 1997. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms - changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns?. Clin. Infect. Dis. **24 (Suppl. 1):** S46-62

. **Monnet D., J. Edwards, R. Gaynes and the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. CDC, Atlanta, GA..** 1994. Extended spectrum β-lactam-resistant nosocomial *Klebsiella pneumoniae* (ESB-KP): Epidemiologic evidence of interhospital transmission. Infect. Control Hosp. Epidemiol.. **15:** 23

. **Moròn, A., B. Font, M. Gorchs, G. Serrate, M. C. Solera, F. Segura, M. Garcia.** 1994. Prospective monitoring of antibiotic prescriptions in an internal medicine department by the creation of an integrated information processing system. In Abstracts of "2nd Scientific Meeting of the European Society of Chemotherapy" P 1 - Coimbra - Portugal - 1994

. **Nassif X., and P. J. Sansonetti.** 1986. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 e K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. Infect. Immun. **54:** 603-608

. **Nassif, X., J-M. Fournier, J. Arondel, and F. J. Sansonetti.** 1989. Mucoid phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. Infect. Immun.. **57:** 546-552

. **Naumovski L., J. P. Quinn, D. Miyashiro, M. Patel, K. Bush, S. B. Singer, D. Graves, T. Palzkill and A. M. Marvin.** 1992. Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended-spectrum β-lactamase in isolates from cancer pacients. Antimicrob. Agents Chemother.. **36:** 1991-1996

. **Naumovsky, L., J. P. Quinn, D. Miyashiro, M. Patel, K. Bush, S. B. Singer, D. Graves, T. Palzkill, and A. M. Arvin.** 1992. Outbreak of cetfazidime resistance due to a novel extended-spectrum β-lactamase in isolates from cancer patients. Antimicrob. Agents Chemother. **36:** 1991-1996

. **NCCLS - National Comitee for Clinical Laboratory Standards - USA.** 1995. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing - 5th edition. Disk diffusion. M2 A5.

. **Neto H. M., J. C. Sousa, M. L. Queirós, A. Aguiar and C. Guimarães.** 1992. Comportamento "in vitro" de estirpes patogénicas de *Klebsiella pneumoniae* face aos antibióticos β-lctâmicos. Rev. Portug. Doenças Infecc.. **15:** 121-124

. **Nicolas M-H, V. Jarlier, N. Honore, A. Philippon and S. T. Cole.** 1989. Molecular characterization of the gene encoding SHV-3 β-lactamase responsible for transferable cefotaxime resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. agents Chemother.. **33:** 2096-2100

. **Nicolle L. E., L. J. Strausbaugh and R. A. Garibaldi.** 1996. Infections and antibiotic resistance in nursing homes. Clin. Microbiol. Rev.. **9:** 1-17

. **Nikaido, H..** 1989. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **33:**1831-1836

. **Nouvellon M., J.-L. Pons, D. Sirot, M.-L. Combe, and J.-F. Lemeland.** 1994. Clonal outbreaks of extended-spectrum β-lactamase producing strains of *Klebsiella pneumoniae* demonstrated by antibiotic susceptibility testing, β-lactamase typing, and multilocus enzyme electrophoresis. J. Clin. Microbiol. **32:** 2625-2627

. **Nouvelon; N., J.-L. Pons, D. Sirot, M.-l. Combe, and J.-F. Lemeland.** 1994. Clonal outbreaks of extended-spectrum β-lactamase producing strains of *Klebsiella pneumoniae* demonstrated by antibiotic susceptibility testing, β-lactamase typing, and multilocus enzyme electrophoresis. J. Clin. Microbiol. **32:** 2625-2627

. **Nüesch-Inderbinen M., F. H. Kaiser and H. Hächler.** 1997. Survey and molecular genetics of SHV β-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. Antimicrob. Agents Chemother.. 41: 943-949

. **Nüesch-Inderbinen M., H. Hächler and F. H. Kaiser.** 1995. New system based on site-directed mutagenesis for highly accurate comparison of resistance levels conferred by SHV β-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother.. **39:** 1726-1730

. **Nüesch-Inderbinen M., H. Hächler and F. H. Kaiser.** 1996. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV β-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.. **15:** 398-401

. **O'Brien and the members of task force 2.** 1987. Resistance of bacteria to antibacterial agents: report of task force 2. Rev. Infect. Dis.. **9 (Suppl.3):** 244-260

. **O'Brien T. F., R. A. Norton, R. L. Kent, and A. A. Medeiros.** 1977. International surveillance of prevalence of antibiotic resistance. J. Antimicrob. Chemother.. **3 (Suppl. C):** 59-66.

. **Pagani, L., P. Ronza, E. Giacobone, and E. Romero.** 1994. Extended-spectrum β-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at an Italian hospital. Eur. J. Epidemiol.. **10:** 533-540

. **Pangon, B., C. Bizet, A. Buré, F. Pichon, A. Philippon, B. Regnier, and L. Gutmann.** 1989. "In vivo" selection of a cephamycin-resistant, porin-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM-3 β-lactamase. J. Infect. Dis. **159:** 1005-1006

. **Papanicolaou, G. A., A.A. Medeiros, and G. Jacoby.** 1990. Novel plasmid-mediated β-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino and α-metoxy β-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother.. **34:** 2200-2209

. **Paul G. C., , G. Gerbaud, A. Bure, A. M. Philippon, B. Pangon, and P. Courvalin.** 1989. TEM-4, a new plasmid-mediated β-lactamase that hydrolises broad-spectrum cephalosporins in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother.. **33:** 1958-63

. **Payne D. J. and S. G. B. Amyes.** 1991. Transferable resistance to extended-spectrum β-lactams: a major threat or a minor inconvenience? J. Antimicrob. chemother.. **27:** 255-261

. **Payne D. J., N. Woodford and S. G. B. Amyes.** 1992. Characterization of the plasmid mediated β-lactamase BIL-1. J. Antimicrob. Chemother.. **30:** 119-127

. **Péduzzi J., Barthélémy, K. Tiwari, D. Mattioni and R. Labia.** 1989. Structural features related to hydrolytic activity against ceftazidime of plasmid-mediated SHV-type CAZ-5 β-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother.. **33:** 2160-2163

. **Peixe L. M. S. V..** 1996. Caracterização de β-lactamases plasmídicas de espectro ampliado em *E.coli*. Tese de doutoramento - Faculdade de Farmácia - Universidade do Porto

. **Peixe Luísa Vieira, J. C. F. Sousa, J.-C. Perez-Diaz and F. Baquero.** 1997. A *bla* TEM-1_b-derived TEM-6 β-lactamase: a case of convergent evolution. Antimicrob. Agents Chemother.. **41:** 1206

. **Petit A., G. Gerbaud, D. Sirot, P. Courvalin and J. Sirot.** 1990. Molecular epidemiology of TEM-3 (CTX-1) β-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother.. **34:** 219-224

. **Petit A., H. B. Yaghalane-Bouslama, L. Sofer, and R. Labia.** 1992. Does high level production of SHV-type penicillinase confer resistance to ceftazidime in *Enterobacteriaceae*?. FEMS Microbiol. Let. **92:** 89-94

. **Petit A., H. Ben-Yaghlane-Bouslama, L. Sofer and R. Labia.** 1992. Characterization of chromossomally encoded penicillinase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. J. Antimcrob. Chemother.. **29:** 629-638

. **Philippon A., G. Arlet and P. H. Lagrange.** 1994. Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum β-lactamases. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.. **13 (Suppl. 1):** 17-29

. **Philippon A., G. Paul, G. Vedel, P. Nevot.** 1988 Résistance palsmidique aux cephlosporines de 3^e generation. La presse Médicale. **31:** 1883-1889

. **Philippon A., R. Labia and G. Jaboby.** 1989. Extended-spectrum β-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother.. **33:** 1131-1136

. **Podbielski, A., J. Schönling, B. Melzer, and G. Haase.** 1991. Different promoters of SHV-2 and SHV-2a β-lactamase lead to diverse levels of cefotaxime resistance in their bacterial producers. J. Gen. Microbiol.. **137:** 1667-1675

. **Podbielski, A., J. Schönling, B. Melzer, K. Warnatz and H-G Leusch.** 1991a. Molecular characterization of a new plasmid-encoded SHV-type β-lactamase (SHV-2 variant) conferring high-level cefotaxime resistance upon *Klebsiella pneumoniae*. J. Gen. Microbiol.. **137:** 569-578

. **Prinarakis E. E., E. Tzelepi, M. Gazouli, A. F. Mentis and L. Tzouvelekis.** 1996. Characterization of a novel SHV β-lactamase variant that resembles the SHV-5 enzyme. FEMS Microbiol. Lett. **139:** 229-234

. **Prinarakis E. E., V. Miriagou, E. Tzelepi, M. Gazouli and L. S. Tzouvelekis.** 1997. Emergence of an inhibitor-resistant β-lactamase (SHV-10) deived from an SHV-5 variant. Antimicrob. Agents Chemother.. **41:** 838-840

. **Quinn J. P..** 1994. Clinical significance of extended-spectrum β-lactamases. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.. **13 (Suppl.1):** 39-42.

. **Quinn J..** 1993 Clinical significance of extended-spectrum β-lactamases. In: 6th European Congress of Chemotherapy - Seville - Spain - March 1993 - The septic patient: Effect of plasmid-mediated cephalosporinases and endotoxins - Abstract 3

. **Rasheed J. K., C. Jay, B. Metchock, F. Berkowitz, L. Weigel, J. Crellin, C. Stewrad, B. Hill, A. A. Medeiros, and F. C. Tenover.** 1997. Evolution of extended-spectrum β-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. Antimicrob. Agents Chemother.. **41:** 647-653

. **Rasmussen B. A. and K. Bush.** 1997. Carbapenem-hydrolising β-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother.. **41:** 223-232

. **Rasmussen B. A., K. Bush, D. Keeney, Y. Yang, R. Hare, C. O'Gara and A. A. Medeiros.** 1996. Characterization of IMI-1 β-lactamase, a class A carbapenem-hydrolising enzyme from *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents Chemother.. **40:** 2080-2086

. **Rasmussen B. A., P. A. Bradford, J: p: Quinn, J. Wiener, R. A. Weinstein and K. Bush.** 1993. Gentically diverse ceftazidime-resistant isolates from a single center: biochemical nad genetic characterization of TEM-10 β-lactamases encoded by different nucleotide sequences. antimicrob. Agents Chemother.. **37:** 1989-1992

. **Reig R., C. Roy, M. Hermida, D. Teruel and A. Coira..** 1993. A survey of β-lactamases from 618 isolates of *Klebsiella* spp. J. Antimicrob. Chemother.. **31:** 29-35

. **Ribeiro J., J. Oliveira, E. Velhinho, A. P. Fernandes, T. Pina, H. Peres, J. Serra, J. Bicó.** 1996. Infecções nosocomiais. Rev. Portug. Doenças Infec.. **19:** 23-28

. **Rice L. B., J. D. C. Yao, K. Klimm, G. M. Eliopoulos and R. C. Moellering, Jr..** 1991. Efficacy of different β-lactams against an extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain in the rat intra-abdominal abscess model. Antimicrob. Agents Chemother. **35:** 1243-1244

. **Rice L. B., L. L. Carias, L. Etter and D. M. Shlaes.** 1993. Resistance to cefoperazone-sulbactam in *Klebsiella pneumoniae*: evidence for enhanced resistance resulting from the coexistence of two different resistance mechanisms. Antimicrob. Agents Chemother.. **37:** 1061-1064

. **Rice L. B., L. L. Carias, R. A. Bonomo and D. M. Shlaes.** 1996. Molecular genetics of resistance to both ceftazidime and β-lactam-lactamase inhibitor combinations in *Klebsiella pneumoniae* and "in vivo" response to β-lactam therapy. J. Infect. Dis.. **173:** 151-158

. **Rice L. B., S. H. Willey, G. A. Papanicolaou, A. A. Medeiros, G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering Jr., and G. A. Jacoby**. 1990. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum β-lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. Antimicrob. Agents Chemother. **34:** 2193-2199

. **Roussel-Delvallez M., D. Sirot, Y. Berrouane, M. Goffart, B. Gourde, F. Wallet, and R.J. Courcol**. 1995. Bactericidal effect of β-lactams and amikacin alone or in association against *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum β-lactamase. J. Antimicrob. Chemother.. **36:** 241-246

. **Sader H. S., M. A. Pfaller and R. N. Jones.** 1994. Prevalence of important pathogens and the antimicrobial activity of parenteral drugs at numerous medical centers in the United States. II. Study of the intra and interlaboratory dissemination of extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis.. **20:** 203-208

. **Sahm D. F..** 1996. The role of clinical microbiology in the control and surveillance of antimicrobial resistance. ASM News. **62:** 25-29

. **Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T..** In: Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed., N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

. **Sanders C. C. and W. E. Sanders.** 1992. β-lactam resistance in Gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. Clin. Infect. Dis.. **15:** 824-839

. **Sanders C. C., W. E. Sanders Jr., R. V. Goering, and V. Werner.** 1984. Selection of multiple antibiotic resistance by quinolones, β-lactams, and aminoglycosides with special reference to cross-resistance between unrelated drugs. Antimicrob. Agents Chemother.. **26:** 797-801

. **Sanders C. C..** 1991. ARTs versus ASTs: where are we going? J. Antimicrob. Chemother.. **28:** 621-625

. **Sanders C. C..** 1992. β-lactamases of Gram-negative bacteria: new chalenges for new drugs. Clin. Infect. Dis.. **14:** 1089-1099

. **Sanders, C. C., J. P. Iaconis, G. P. Bodey, and G. Samonis.** 1988. Resistance to ticarcillin-potassium clavulanate among clinical isolates of the family *Enterobacteriaceae*: Role of PSE-1 β-lactamse and high leves of TEM-1 and SHV-1 and problems with false susceptibility in disk diffusion tests. Antimicrob. Agents Chemother. **32:** 1365-1369

. **Sawai T., A. Tamaguchi and R. Hiruma.** 1988. Effect of interaction between outer membrane permeability and β-lactamase production on resistance to β-lactam agents in Gram-negative bacteria. Rev. Infect. Dis.. **10:** 761-764

. **Sawai T., S. Yamagishi and S. Mitsuhashi.** 1973. Penicillinases of *Klebsiella pneumoniae* and their phylogenetic relationship to penicillinases mediated by R factors. J. Bacteriol. **115:** 1045-1054

. **Schaechter M..** 1994. Microbiology in Chile - a traveler's sketch. A.S.M. News **61:** 8

. **Scheftel J. M., M. Weber and French "ICU" group.** 1993. Incidence of resistance to antibiotics in Gram-negative aerobes (3876 isolates) issued from 39 Intensive Care Units (ICU) in France during 1991. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Seville - Spain - Abstract 510

. **Shannon K. P., A. King, I. Phillips, M. H. Nicolas and A. Philippon.** 1990. Importation of organisms producing broad-spectrum SHV-group β-lactamase into the United Kingdom. J. Antimicrob. Chemother.. **25:** 343-351

. **Shaw K., P. N. Rather, R. S. Hare, and G. H. Miller.** 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol. Rev. **57:** 138-163

. **Shaw, K. J., R.S. Hare, F. J. Sabatelli, M. Rizzo, C. A. Cramer, L. Naples, S. Kocksi, H. Munayeyer, P. Mann, G. H. Miller, L. Verbist, H. . Laduyt, Y. Glupczynski, M. Catalano, and M. Woloj.** 1991. Correlation between aminoglycoside resistance profiles and DNA hybridization of clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother. **35:** 2253-2261

. **Siegenthaler W. E., A. Bonetti, R. Luthy.** 1986. Aminoglycoside antibiotics in infectious diseases. Am. J. Med. **80 (Suppl. 6B):** 2-11

. **Sirot D., C. Chanal, R. Labia, M. Meyran, J. Sirot and R. Cluzel.** 1989. Comparative study of five plasmid-mediated ceftazidimases isolated in *Klebsiella pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother.. **24:** 509-521

. **Sirot D., C. De Champs, C. Chanal, R. Labia, A. Darfeuille-Michaud, R. Perroux, and J. Sirot.** 1991. Translocation of antibiotic resistance determinants including an extended-spectrum β-lactamase between conjugative plasmids of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **35:** 1576-1581

. **Sirot D., J. Sirot, R. Labia, A. Morand P. Courvalin, A. Darfeuille-Michaud, R. Perroux and R. Cluzel.** 1987. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical ioslates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β-lactamase. J. Antimicrob. Chemother.. **20:** 323-334

. **Sirot D..** 1995. Extended-spectrum plasmid-mediated β-lactamases. J. Antimicrob. Chemother.. **36 (Suppl.A):** 19-34

. **Siu L. K.,P. L. Ho, K. Y. Yuen, S. S. Y. Wong and P. Y. Chau.** 1997. Transferable hyperproduction of TEM-1 β-lactamase in *Shigella flexneri* due to a point mutation in the Pribnow box. Antimicrob. Agents Chemother.. **41:** 468-470

. **Soilleux M. J., A. M. Morand, G. J. Arlet, M. R. Scavizzi and R. Labia.** 1996. Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β-lactamases: prevalence of TEM-3 and first identification of TEM-26 in France. Antimicrob. Agents Chemother.. **40:** 1027-1029

. **Soilleux, M. J., A. M. Morand, G. J. Arlet, M. R. Scavizzi, and R. Labia.** 1996. Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β-lactamases: prevalence of TEM-3 and first identification of TEM-26 in France. Antimicrob. Agents Chemother. **40:** 1027-1029

. **Sougakoff W., S. Goussard, G. Gerbaud and P. Courvalin.** 1988. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicilinase genes. Rev Infect. Dis.. **10:** 879-884

. **Sousa J. C. and L. V. N. Prista.** 1988. In: Antibióticos inibidores da síntese do peptidoglicano. Eds. Ordem dos Farmacêuticos - Porto- Portugal

. **Sousa J. C., G. Carneiro, M. L. Peixe, M. L. Queirós and I. Rebelo.** 1991. Characterization of β-lactamases encoded by pathogenic strains of *Escherichia coli* from Portugal. J. Antimicrob. Chemother.. **27:** 437-440

. **Sousa, J. C., e Prista, L. V. N..** 1990. Antibióticos inibidores da síntes proteica - aminoglicosídeos-aminociclitóis e compostos relacionados. Ed. Ordem dos Farmacêuticos

. **Stapleton P., P-J Wu, A. King, K. Shannon, G. French and I. Phillips.** 1995. Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother.. **39:** 2478-2483

. **Stratton, C. W..** 1988. Activity of β-lactamases against β-lactams. J. Antimicrob. Chemother.. **22 Suppl. A:** 23-35

. **Tenover, F.C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P.A. Michelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. **33:** 2233-2239

. **Thauvin-Eliopoulos C., M-F. Tripodi, R. Moellering Jr. and G. M. Eliopoulos.** 1997. Efficacies of piperacillin-tazobactam and cefepime in rats with experimental intra-abdominal abscesses due to an extended-spectrum β-lactamase-producing strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother.. **41:** 1053-1057

. **The Aminoglycoside Resistance Study Groups and Miller, G. H., F. J. Sabatelli, R. S. Hare, K. J. Shaw, and P. Mackey.** Changes with time and geographic area of the most frequent aminoglycoside resistance mechanisms - a reflection of aminoglycoside

usage patterns?. In: Program and abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial agents and Chemotherapy. Washington DC: American Society for Microbiology, 1995

. **The Aminoglycoside Resistance Study Groups.** 19th ICC: The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and the role of isepamicin - a broad spectrum aminoglycoside. Abstract of the Interscience Conference in Chemotherapy - Montréal - Canadá - 1995

. **The Aminoglycoside Resistance Study Groups.** 1995. The most frequently occuring aminoglycoside resistance mechanisms - combined results of surveys in eight regions of the World. J. Chemother. **7 (Suppl. 2):** 17-30

. **The Aminoglycoside Resistance Study Groups.** 19th ICC: The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms - result of surveys in eigth regions of the world. Abstract o f the Interscience Conference in Chemotherapy - Montréal - Canadá - 1995

. **Thomson C. J., P. M. A. Shanahan and S. G. B. Amyes.** 1994. TEM-1 plasmids in the community. Lancet. **343:** 921

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

. **Thomson K. S., C. C. Sanders, and J. A. Washington.** 1991. High-level resistance to cefotaxime and ceftazidime in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Cleveland, Ohio. Antimicrob. Agents Chemother.. **35:** 1001-1003

. **Thomson K. S., D. A. Weber, C. C. Sanders, and W. E. Sanders, Jr..** 1990. β-lactamase production in members of the family *Enterobacteriaceae* and resistance to β-lactam-enzyme inhibitor combinations. Antinmicrob.Agents Chemother. **34:** 622-627

. **Tolmasky, M. E., and J. H. Crosa.** 1987. Tn1331, a novel multiresistance transposon encoding resistance to amikacin and ampicillin in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother.. **31:** 1955-1960

. **Tolmasky, M. E., M. Roberts, M. Woloj, and J. H. Crosa.** 1986. Molecular cloning of amikacin resistance determinants from a *Klebsiella pneumoniae* plasmid. Antimicrob. Agents Chemother. **30:** 315-320

. **Tzouvelekis L. S., E. Tzelepi and A. F. Mentis.** 1994. Nucleotide sequence of a plasmid-mediated cephalosporinase gene (bla_{LAT-1}) found in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother.. **38:** 2207-2209

. **Tzouvelekis L. S., E. Tzelepi, A. F. Mentis and A.Tsakris.** 1993. Identification of a novel plasmid-mediated β-lactamase with chromossomal cephalosporinase characteristics from *Klebsiella pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother.. **31:** 645-654

. **Urban, C., K. S. Meyer, N. Mariano, J. J. Rahal, R. Flamm, B. A. Rasmussen, and K. Bush**. 1994. Identification of TEM-26 β-lactamase responsible for a major outbreak

of a ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. **38:** 392-395

. **Vatapoulos, A.C., A. Philippon, L. S. Tzouvelekis, Z. Komninou, and N.J. Legakis.** 1990. Prevalence of a transferable SHV-5 type β-lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Greece. J. Anticrob. Chemother. **26:** 635-648

. **Vernet V., C. Madoulet, C. Chippaux, and A. Philippon.** 1992. Incidence of two virulence factors (aerobactin and mucoid phenotype) among 190 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β-lactamase. FEMS Microbiol. Let. **96:** 1-6

. **Vollaard E. J. and H. A. L. Clasener.** 1994. Colonization resistance. Antimicrob. Agents Chemother.. **38:** 409-414

. **Wenzel R. P..** 1995. The economics of nosocomial infections. J. Hosp. Infect.. **31:** 79-87

. **Wu P.-J., K. Shanon, and I. Phillips.** 1994. Effect of hyperproduction of TEM-1 β-lactamase on "in vitro" susceptibility of *Escherichia coli* to β-lactam antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother.. **38:** 494-498

. **Zühlsdorf M. T. and B. Wiedemann.** 1992. Tn*21*-specific structures in Gram-negative bacteria from clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother.. **36:** 1915-1921

Apêndice

8. Apêndice

Antibiótico	**K802 N** *gyrA*	**K12** *gyrA*	**HB101** *rpsL* **20**	**ATCC 2592**
Amoxicilina	6	2	2	6
Piperacilina	2	0,75	1	3
Amox+clavulânico	2	0,75	1,5	4
Cefuroxima	4	1	2	6
Cefoxitina	6	3	1,5	4
Cefotaxima	0,094	0,016	0,032	0,125
Ceftazidima	0,5	0,064	0,125	0,5
Ceftriaxona	0,064	<0,016	0,023	0,047
Aztreonamo	0,125	0,023	0,023	0,047
Imipenemo	0,19	0,094	0,094	0,094

Concentrações mínimas inibitórias das estirpes receptoras e de controle usadas

CAZ-1 padrão	**Velocidade de hidrólise relativa**				
Substrato	**Penicilina**	**Cefalotina**	**Cefotaxima**	**Ceftazidima**	**Aztreonam**
100 μM	100			100	
500 μM	100	400	120	400	100

Velocidade de hidrólise relativa de extracto contendo enzima CAZ-1 padrão (Sirot et al., 1989) usada para controlo do método

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA