

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Medicina de Lisboa**



**Bacteriémias: determinantes genéticos de resistência e virulência em isolados clínicos de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp.**

Cátia Sofia Gabriel Caneiras

Mestrado em Microbiologia Clínica

2009

**Esta Dissertação foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa em reunião de 2 de Junho de 2009.**

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Medicina de Lisboa**



**Bacteriémias: determinantes genéticos de resistência e virulência em isolados clínicos de *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.***

Cátia Sofia Gabriel Caneiras

Mestrado em Microbiologia Clínica

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Aida Duarte

**Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nela apresentados.**

## **ELEMENTOS BIBLIOGRÁFICOS RESULTANTES DA DISSERTAÇÃO**

### Comunicação em Congresso Internacional (ver Anexo 1)

1. “Replicon typing of plasmids from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum b-lactamase”. C. Caneiras, F.Nunes, L. Lito, J. Melo-Cristino, M. José Salgado and A. Duarte in 19º ECCMID-European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Helsinki, Finland, 16-19 May 2009, P1197, Anexo 2
2. “Potential role of *Escherichia coli* common pilus in persistence of clinical isolates producing extended-spectrum beta-lactamase from bacteraemia and urinary tract infection”. C. Caneiras, F. Nunes, J. Pissara; L. Lito, J. Melo-Cristino, M. Jose Salgado and A. Duarte in 19º ECCMID-European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Helsinki, Finland, 16-19 May 2009, P1237, Anexo 3

## AGRADECIMENTOS

A todos os que, caminhando a meu lado, acreditaram que era possível.

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,  
Mas não esqueço de que minha vida  
É a maior empresa do mundo...  
E que posso evitar que ela vá à falência.  
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver  
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.  
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e  
Se tornar um autor da própria história...  
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar  
Um oásis no recôndito da sua alma...  
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.  
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.  
É saber falar de si mesmo.  
É ter coragem para ouvir um “Não”!!!  
É ter segurança para receber uma crítica,  
Mesmo que injusta...  
  
Pedras no caminho?  
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

*Fernando Pessoa*

## RESUMO

O isolamento de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. multirresistentes produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBL) em infecções invasivas severas como as bacteriémias, constitui um grande desafio terapêutico. De modo a aumentar o conhecimento destes microorganismos, efectuou-se a caracterização dos determinantes genéticos de resistência e virulência de isolados obtidos ao longo de 7 anos (2000-2007) no Hospital de Santa Maria.

A *Klebsiella* spp. demonstrou uma grande variabilidade genotípica, contrastando com a existência de um clone predominante nos isolados de *E. coli*, o qual persiste em diferentes serviços do hospital há 5 anos. Este clone é produtor da ESBL CTX-M15 e pertence maioritariamente ao grupo filogenético B2, embora esteja também presente em isolados do grupo D, A e B1. A superior capacidade de disseminação horizontal da *E. coli* comparativamente à *Klebsiella* spp. (2,04 replicões/isolado Vs 0,59 replicões/isolado), aliado à especificidade plasmídica encontrada (grupo IncF Vs grupo HI1 e P) sugere que os genes contidos nestes elementos genéticos móveis não são facilmente transmitidos entre estas espécies. O clone descrito apresenta as ilhas de patogenicidade IV<sub>536</sub>, ICFT073 e IICFT073 e os padrões de virulência com apenas dois (*fimH*, *ecpA*) ou três (*fimH*, *ecpA*, *iucC*) dos nove factores pesquisados. Até à data apenas descrita na *E. coli* entero-hemorrágica O157:H7<sup>78</sup>, o factor de aderência EcpA surge no presente trabalho sempre associada à fímbria FimH. Estudos adicionais são requeridos, no entanto parece existir uma acção combinada entre ambos: a FimH permite a adesão e invasão no epitélio vesical ou no enterócito actuando como causa primária da bacteriémia, enquanto que a EcpA possibilita a “fuga” ao sistema imunitário e, conseqüentemente a sua persistência no hospedeiro.

**Palavras Chave:** ESBL, virulência, controlos de replicação plasmídica

## ABSTRACT

The isolation of *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp multidrug-producing ESBL in severe invasive infections such as bacteraemia, is a major therapeutic challenge. To increase knowledge of these microorganisms, it was made the characterization of the genetic determinants of resistance and virulence of isolates obtained over 7 years (2000-2007) at Hospital de Santa Maria. The *Klebsiella* spp. has demonstrated a great genetic variability, in contrast with the existence of a predominant clone in the isolates of *E. coli*, which persists in different departments of the hospital for 5 years. This clone is a ESBL CTX-M15 producer and belong mostly to phylogenetic group B2, but is also present in isolates of group D, A and B1. The superior ability of horizontal spread of *E. coli* compared with *Klebsiella* spp. (2.04 replicons/isolate Vs 0.59 replicons/isolate) as well as the specific plasmid group found (group IncF Vs HI1 and P group) suggests that genes contained in these mobile genetic elements are not easily transferred between these species. The clone described presents the pathogenicity islands IV536, ICFT073 and IICFT073 and the virulence patterns mostly found the presence of only two (*fimH*, *ecpA*) or three (*fimH*, *ecpA*, *iucC*) of the nine virulence factors investigated. So far only described in entero-haemorrhagic *E.coli* O157:H7<sup>78</sup>, the EcpA pilus-adherence factor appears in this work always associated with the fimbriae FimH. Additional studies are required, however there appears to be a combined action between them: the *fimH* allows adhesion and invasion in the bladder epithelium or in the enterocyte acting as a primary cause of bacteremia, while the EcpA allows the "escape" of the immune system and consequently its persistence in the host.

**Keywords: ESBL, Virulence, replicon plasmidic controls**

---

## ÍNDICE

Elementos bibliográficos resultantes da dissertação	i
Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice	v
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xii

## CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. Bacteriémias: implicações clínicas e económicas	1
1.2. Isolados produtores de $\beta$ -Lactamases de espectro alargado (ESBL)	1
1.3. <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella</i> spp. em situações de bacteriémia	3
1.4. Disseminação Plasmídica: grupos de incompatibilidade de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella</i> spp.	5
1.5. Caracterização Filogenética em populações de <i>Escherichia coli</i>	8
1.6. Factores de Virulência e Ilhas de Patogenicidade (PAIs) de <i>Escherichia coli</i>	9
1.7. Objectivos	12

## CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS

<b>2. Materiais e Métodos</b>	<b>13</b>
2.1. Isolados Bacterianos	14
2.2. Métodos de Biotipagem	15
2.2.1. Métodos Fenotípicos	15
2.2.1.1. Susceptibilidade a Agentes Antimicrobianos	15
2.2.2 Métodos Genotípicos	16
2.2.2.1. M13 PCR <i>fingerprinting</i>	16
2.3. Métodos Moleculares	18

---

2.3.1. PCR	18
2.3.2. Purificação de Produtos de PCR	22
2.4. Métodos informáticos	23
2.4.1. BLAST	23
2.4.2. ClustalW	23
2.5. Métodos estatísticos	24

## **CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

<b>3. Resultados e Discussão</b>	<b>25</b>
3.1. Frequência de isolamento de ESBL em situações de bacteriémias no Hospital de Santa Maria, 2000-2007	26
3.2. Caracterização da amostra em estudo	28
3.2.1. Evolução da frequência de isolamento de produtores de ESBL na amostra em estudo	28
3.2.2. Distribuição dos isolados por serviços clínicos	30
3.3. Caracterização fenotípica dos isolados	34
3.3.1. <i>Escherichia coli</i>	34
3.3.2. <i>Klebsiella</i> spp.	37
3.3.3. Antibiotipo e ESBL	39
3.4. Caracterização Molecular	42
3.4.1. <i>Escherichia coli</i>	42
3.4.1.1. Disseminação do clone1 entre diferentes serviços do HSM	44
3.4.2. Tipificação Molecular dos isolados clínicos de <i>Klebsiella</i> spp.	48
3.5. Grupos de Incompatibilidade Plasmídica	50
3.5.1. <i>Escherichia coli</i>	50

---

3.5.2. <i>Klebsiella</i> spp.	51
3.6. Estudos de Filogenia e Virulência na <i>Escherichia coli</i>	53
3.6.1. Caracterização das estirpes quanto ao grupo Filogenético	53
3.6.2. Perfil de Virulência	57
3.6.3. Determinação das ilhas de patogenicidade	63
3.6.4. Grupos Filogenéticos: relação entre os perfis de resistência, virulência e ilhas de patogenicidade	66
<b>CAPÍTULO 4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	
<b>4. Conclusão e Perspectivas Futuras</b>	<b>73</b>
<b>CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFIA</b>	
<b>5. Bibliografia</b> .....	<b>77</b>
<b>ANEXO 1.</b> Programa Final do 19º European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)	92
<b>ANEXO 2.</b> Resumo da comunicação “Replicon typing of plasmids from <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Escherichia coli</i> clinical isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum $\beta$ -lactamase”	95
77	
<b>ANEXO 3.</b> Resumo da comunicação “Potential role of <i>Escherichia coli</i> common pilus in persistence of clinical isolates producing extended-spectrum beta-lactamase from bacteraemia and urinary tract infection”	96

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

	<i>Pág.</i>
<b>Figura 1</b> Representação da resistência dos isolados clínicos invasivos de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
<b>Figura 2</b> Contribuição da aquisição horizontal de elementos genéticos móveis para a evolução dos distintos tipos patogénicos de <i>E. coli</i>	5
<b>Figura 3</b> Esquema exemplificativo de conjugação bacteriana	6
<b>Figura 4</b> Árvore dicotómica utilizada para determinar o grupo filogenético dos isolados de <i>E. coli</i> através dos resultados obtidos por PCR	20
<b>Figura 5</b> Distribuição da frequência percentual dos isolados <i>Escherichia coli</i> (n=72) e <i>Klebsiella</i> spp. (n=83) produtores de ESBL provenientes de bacteriémia, por ano de isolamento	27
<b>Figura 6</b> Distribuição dos isolados clínicos de <i>Escherichia coli</i> por tipologia de serviços	30
<b>Figura 7</b> Distribuição dos isolados clínicos de <i>Klebsiella</i> spp. por tipologia de serviços	
<b>Figura 8</b> Serviços clínicos do HSM nos quais se verificou mais frequentemente o isolamento de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella</i> produtores de ESBL em hemoculturas, durante os anos compreendidos entre 2000 e 2007	31
<b>Figura 9</b> Resultados obtidos nos antibiogramas das 72 estirpes de <i>Escherichia coli</i> aos antibióticos estudados	33

---

<b>Figura 10</b>	Resultados obtidos nos antibiogramas das 83 estirpes de <i>Klebsiella</i> spp produtoras de ESBL	36
<b>Figura 11</b>	Identificação do perfil genético dos isolados de <i>Escherichia coli</i> do HSM.	41
<b>Figura 12</b>	Comparação do perfil genético dos isolados de <i>E. coli</i> dos serviços	43
<b>Figura 13</b>	Determinação do perfil genético dos isolados de <i>Klebsiella</i> spp. do HSM.	47
<b>Figura A1</b>	Programa Final do 19º European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)	47
<b>Figura A2</b>	Resumo da comunicação “Replicon typing of plasmids from <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Escherichia coli</i> clinical isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum $\beta$ -lactamase”	47
<b>Figura A3</b>	Resumo da comunicação “Potential role of <i>Escherichia coli</i> common pilus in persistence of clinical isolates producing extended-spectrum beta-lactamase from bacteraemia and urinary tract infection	xxx

---

**ÍNDICE DE TABELAS**

	<i><b>Pág.</b></i>
<b>Tabela 1</b> Pontos de corte definidos pelo CLSI, 2008.	16
<b>Tabela 2</b> <i>Primer</i> para M13 PCR <i>fingerprinting</i>	17
<b>Tabela 3</b> Programa de amplificação M-13 PCR <i>fingerprintig</i>	17
<b>Tabela 4</b> <i>Primers</i> utilizados na pesquisa de ESBL	18
<b>Tabela 5</b> <i>Primers</i> utilizados na tipificação plasmídica	19
<b>Tabela 6</b> <i>Primers</i> utilizados na caracterização filogenética dos isolados de <i>E. coli</i> .	20
<b>Tabela 7</b> <i>Primers</i> utilizados na identificação de factores de virulência e de ilhas de patogenicidade	21
<b>Tabela 8</b> Frequência de isolamento de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella</i> spp produtores de ESBL, considerando a totalidade de isolados em situações de bacteriémia, por ano de estudo, no Hospital de Santa Maria	25
<b>Tabela 9</b> Distribuição da frequência absoluta e percentual de isolados de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella</i> spp por serviço clínico do HSM	29
<b>Tabela 10</b> Classificação fenotópica dos isolados de <i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella</i> spp. de acordo com o comportamento face aos antibióticos cefotaxima (CTX), ciprofloxacina (CIP) e ceftazidima (CAZ)	38

---

<b>Tabela 11</b>	Distribuição do perfil genotípico de 28 isolados clínicos de <i>Escherichia coli</i> provenientes de bacteriémias tendo em conta o perfil fenotípico e a ESBL produzida	42
<b>Tabela 12</b>	Perfil genético dos isolados <i>Escherichia coli</i> de bacteriémias dos serviços hospitalares predominantes SO e MediIC, entre outros, no período de tempo entre 2000 e 2007	44
<b>Tabela 13</b>	Classificação dos plasmídeos detectados nos 28 isolados de <i>E. coli</i> . produtores de CTX-M15 e outras ESBL.	49
<b>Tabela 14</b>	Classificação dos plasmídeos detectados nos 22 isolados de <i>Klebsiella</i> spp. produtores de CTX-M15 e outras ESBL.	50
<b>Tabela 15</b>	Distribuição dos 70 isolados de <i>E. coli</i> produtores de ESBL isolados em situação de bacteriemia no HSM, pelos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D	52
<b>Tabela 16</b>	Distribuição dos factores de virulência produzidos pelos 45 isolados de <i>E. coli</i> pertencentes ao clone 1	56
<b>Tabela 17</b>	Frequência dos padrões genéticos de virulência em amostras isoladas de pacientes com bacteriemia causada por isolados persistentes no HSM, clone 1	57
<b>Tabela 18</b>	Ilhas de Patogenicidade pesquisadas, seus determinantes de virulência <sup>86</sup> e resultados obtidos em 45 isolados representativos de <i>E. coli</i> produtoras de ESBL provenientes de bacteriémias do HSM.	62

<b>Tabela 19</b>	Distribuição das combinações das ilhas de patogenicidade presentes nos isolados de <i>E. coli</i>	64
<b>Tabela 20</b>	Distribuição dos perfis de resistência e virulência pelos grupos filogenéticos dos isolados de <i>E. coli</i>	66

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

CLSI-*Clinical and Laboratory Standards Institute*

AMC- Amoxicilina/Ác. Clavulânico

BSAC- British Society for Antimicrobial Chemotherapy

CAZ- Ceftazidima

CIP- Ciprofloxacina

CTX- Cefotaxima

DDD- Doses diárias por mil habitantes

EARSS-*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*

ECDC-European Centre for Disease Prevention and Control

ESAC-*European Surveillance of Antimicrobial Consumption*

ESBL-  $\beta$ -lactamases de espectro alargado

EUCAST- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FOX-Cefoxitina

FV- Factores de Virulência

GM-Gentamicina

HSM- Hospital de Santa Maria

IACs- infecção associada aos cuidados de saúde

IMP-Imipenem

MDR- Multirresistente

PAIs- Ilhas de Patogenicidade

PCR- Polymerase Chain Reaction

RAPD- *Randomly amplified polymorphic DNA analysis* (RAPD)

UCIP- Unidade de cuidados intensivos polivalentes

UCIR- Unidade de cuidados intensivos respiratórios

UTIDH- Unidade de tratamentos intensivos de doenças hematológicas

## **CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Bacteriémias: implicações clínicas e económicas

A bacteriémia é caracterizada pelo isolamento de microorganismos viáveis na corrente sanguínea<sup>47</sup>. Apresenta taxas de mortalidade de 44%<sup>89</sup>, valor que pode ser superior a 50% em unidades de cuidados intensivos<sup>24</sup>. Representa cerca de 15% de todas as infecções nosocomiais e afecta aproximadamente 1% de todos os doentes hospitalizados<sup>37</sup>. Esta patologia aumenta a taxa de mortalidade, o prolongamento em unidades hospitalares e é geradora de custos extraordinários<sup>37</sup>. Por estas razões, a prevenção e a monitorização dos isolados mais frequentemente envolvidos em situações de bacteriémia devem ser consideradas acções prioritárias.

### 1.2. Isolados produtores de $\beta$ -Lactamases de espectro alargado (ESBL)

Estirpes produtoras de beta lactamases de espectro alargado (ESBL) têm emergido como um dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos<sup>68</sup>, com prevalências europeias que variam entre 3% (Suécia) e 34% (Portugal)<sup>31</sup>.

As famílias de maior importância neste grupo são as TEM, SHV e CTX-M. As duas primeiras são ceftazidimases, tendo sido descritas até à década de 90 como os enzimas  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBLs) mais frequentes<sup>3</sup>. No entanto a sua frequência tem sido ultrapassada com a introdução das cefalosporinas na década de 80<sup>2</sup>, pelos enzimas da família dos CTX-M<sup>52, 67</sup>. Os membros desta família emergente de enzimas são cefotaximases, apresentando uma actividade 35 vezes superior com a cefotaxima como substrato, que com a ceftazidima<sup>5</sup>. Desde

sua descrição em 1986, têm vindo a aumentar exponencialmente, constituindo já cerca de 50% dos ESBLs produzidos por *E. coli*<sup>6</sup>, estando actualmente descritas mais de 60 diferentes variantes deste grupo de acordo com a sua sequência amino-acídica<sup>93</sup>.

Os ESBL são enzimas maioritariamente de origem plasmídica que conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas e aztreonamo. São frequentemente encontradas em *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp e outras enterobactérias<sup>67</sup>. A terapêutica antimicrobiana para infecções causadas por organismos produtores de ESBL representa um desafio, considerando que estes organismos são frequentemente resistentes a outros antimicrobianos como trimetoprim-sulfametoxazol, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas<sup>67</sup>, tendo sido até recentemente sugerida uma redefinição que permita uma rápida percepção clínica das resistências associadas<sup>26</sup>.

Os grupos terapêuticos das cefalosporinas e das fluoroquinolonas são recomendadas como primeira linha na terapêutica empírica para o tratamento das infecções generalizadas provenientes do tracto urinário, infecções dos tecidos-moles e intra-abdominais<sup>51, 74, 90</sup>. Estudos recentes inferem que cerca de 12-16% dos doentes com infecção por isolados produtores de ESBL apresentam bacteriémia<sup>82</sup>, pelo que a terapêutica empírica a utilizar nestas situações assume especial preocupação.

Kang *et al.* descreve um estudo de 286 doentes com bacteriémia causada por microorganismos gram negativos, verificando que 52,8% dos doentes não teve a terapêutica adequada<sup>47</sup>. Assim, considerando que 30,8% de todas as bacteriémias se devem a organismos produtores de ESBL<sup>70</sup> e a rápida emergência e disseminação destes enzimas, verifica-se a necessidade de controlo destes microorganismos como uma prioridade estratégica<sup>71</sup>.

### **1.3. *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. em situações de bacteriémia**

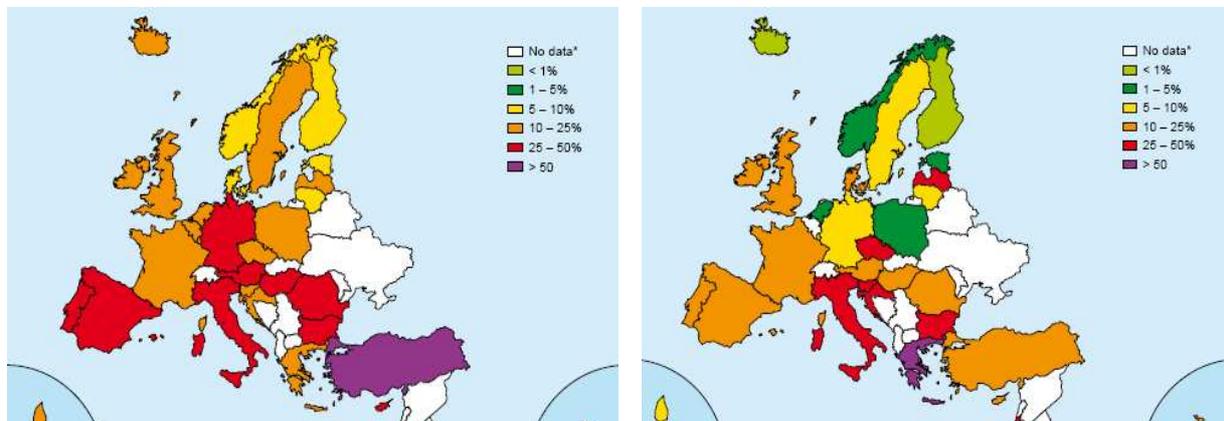
Entre os microorganismos gram-negativo mais frequentemente isolados em situações clínicas de bacteriémia encontram-se a *Escherichia coli* (20%) e a *Klebsiella pneumoniae* (4,7%)<sup>24</sup>. A origem primária da bacteriémia parece estar associada a infecções do tracto urinário (23-44%), tracto gastro-intestinal (14-17%) e associada a dispositivos médicos (14%), embora se verifique uma elevada percentagem de origem desconhecida (31-35%)<sup>53</sup>.

Infecções causadas por isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL estão usualmente confinadas ao ambiente hospitalar contrariamente aos isolados de *E. coli* produtores de ESBL, dos quais já cerca de metade das infecções são associadas a doentes não hospitalizados<sup>81</sup>. De facto, recentemente, a maioria dos casos reportados de bacteriémia causada por estirpes multiresistentes produtoras de ESBL na Europa tinham origem nosocomial. No entanto, o aumento de casos de infecção do tracto urinário e de bacteriémia adquirida na comunidade causada por estes microorganismos sugerem que a identificação precoce de doentes de elevado risco para a aquisição de isolados produtores de ESBL, baseada na sua origem geográfica e o estudo do percurso de viajante, poderá ajudar a otimizar estratégias de terapêutica empírica<sup>104</sup>.

Estudos multicêntricos europeus e intercontinentais de monitorização da susceptibilidade antimicrobiana com especial incidência nos isolados produtores de ESBL, têm consistentemente demonstrado uma variabilidade na frequência dos isolados considerando a localização geográfica, espécie bacteriana e a origem dos diferentes isolados<sup>15</sup>. Dos países europeus, Portugal apresenta as taxas mais elevadas de consumo de antibióticos: o projecto europeu ESAC-*European Surveillance of Antimicrobial Consumption* descreve que, no ano de 2006, se encontrou entre 18,69 e 23,24 doses diárias por mil habitantes (DDD), enquanto que na Holanda foi de 9,58-

14,14 DDD e em França 27,80-32,35 DDD<sup>27</sup>, valores preocupantes corroborados por outros estudos<sup>11</sup>.

Publicações recentes do sistema EARSS-*European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (<http://www.earss.rivm.nl>), fundado pela agência europeia ECDC-*European Centre for Disease Prevention and Control*, com o apoio da Comissão Europeia, descrevem elevados índices de resistência antimicrobiana nos microorganismos isolados da corrente sanguínea (Figura 1).



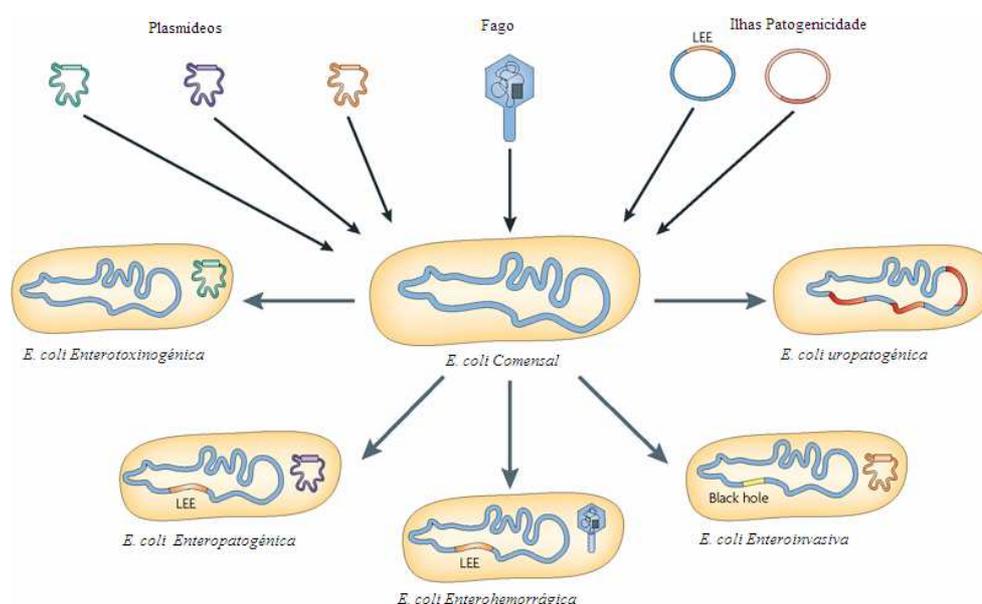
**Figura 1.** Representação da resistência dos isolados clínicos invasivos de *Escherichia coli* (esq.) e *Klebsiella pneumoniae*<sup>29</sup>.

Esta situação apresenta especial incidências nas enterobacteriáceas e sua resistências às cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, com os isolados invasivos de *E. coli* a apresentar um índice de resistência às fluoroquinolonas compreendido entre 25 e 50% e de *Klebsiella pneumoniae* entre 10-25%<sup>29</sup>. Estes dados devem, portanto, ser considerados na actualização dos pontos de corte definidos para estes agentes antimicrobianos, levando mesmo autores a sugerir uma alteração nos pontos de corte considerados pelas agências competentes<sup>53</sup> e uma harmonização internacional entre a agência europeia EUCAST- *European Committee on*

*Antimicrobial Susceptibility Testing* e a agência norte-americana CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute <sup>46</sup>.

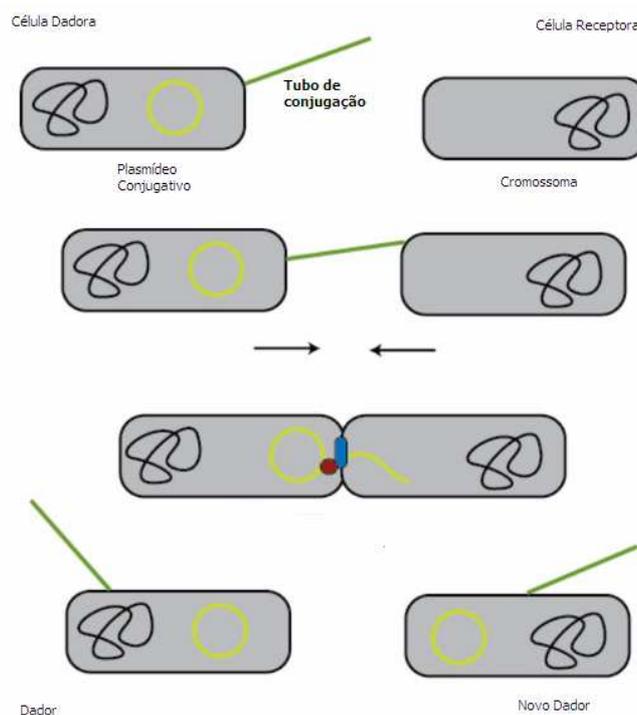
### 1.4. Disseminação Plasmídica: grupos de incompatibilidade de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp.

A aquisição de elementos genéticos móveis (fagos, plasmídios virulentos e ilhas de patogenicidade), assim como a perda de regiões de DNA cromossômico nas diferentes linhagens celulares, permitem uma dinâmica de evolução de clones de *E. coli* comensais (Figura 2), com distintas características patogênicas e frequentemente associadas a uma sintomatologia e quadro clínico específico: *E. coli* enterotoxigênicas, enteropatogênicas, enterohemorrágicas, enteroinvasivas e uropatogênicas<sup>1</sup>.



**Figura 2.** Contribuição da aquisição horizontal de elementos genéticos móveis para a evolução dos distintos tipos patogênicos de *E. coli* <sup>1</sup>.

Os plasmídeos são elementos genéticos extracromossomais que existem nas células como ácidos nucleicos livres, maioritariamente constituídos por duas cadeias de DNA circulares, que variam entre 1 e 1000 Kpb. O número de cópias na célula varia, podendo existir apenas 1 ou 2 cópias, ou mais de 100<sup>98</sup>. Parecem estar envolvidos na diversidade genética bacteriana, permitindo a aquisição e a perda de genes, e podem ser trocados horizontalmente por diferentes populações por conjugação ou mobilização (Figura 3)<sup>45</sup>. Contêm genes essenciais para a iniciação e controlo da replicação assim como genes acessórios cujas funções podem envolver resistência antimicrobiana ou genes de virulência<sup>20</sup>.



**Figura 3.** Esquema exemplificativo de conjugação bacteriana <sup>21</sup>.

Plasmídeos com a mesmo controlo de replicação são “incompatíveis”, enquanto que plasmídeos com diferentes controlos de replicação são “compatíveis”. Segundo este pressuposto, dois

plasmídeos pertencendo ao mesmo grupo Inc não podem ser propagados na mesma linhagem celular<sup>18</sup>. O grupo Inc tem sido frequentemente utilizado para classificar os plasmídeos. Este método permite traçar a difusão destes elementos genéticos móveis no que infere à resistência antimicrobiana, assim como monitorizar a evolução e disseminação de plasmídeos emergentes<sup>10</sup>. A epidemiologia de infecções causadas por isolados produtores de CTX-M demonstrou ser diferente de infecções causadas por produtores de outras ESBL como as TEM ou SHV: dado que os genes que codificam para os enzimas CTX-M encontram-se associados com elementos genéticos móveis, favorecendo a sua disseminação<sup>59, 76</sup>.

Em 1988, Couturier *et al.* desenvolveu um novo método para a identificação dos plasmídeos maioritariamente presentes em isolados de Enterobacteriáceas<sup>18</sup>. Este método, baseado na hibridização de 19 sondas de DNA que reconheciam diferentes replicões, apresentava como limitações ser trabalhoso, demorado e de difícil aplicação num grande número de isolados. Carattoli *et al.* apresentou em 2005, um método de PCR para identificação de 18 origens de replicação representativas dos grupos de incompatibilidade mais frequentemente associados à resistência antimicrobiana em enterobacteriáceas<sup>8</sup>, o qual contribuiu para um aumento de estudos sobre esta temática.

### 1.5. Caracterização Filogenética em populações de *Escherichia coli*

A análise filogenética dos isolados de *E. coli* demonstrou a existência de quatro grupos filogenéticos maioritários: A, B1, B2 e D<sup>34</sup>. Embora os determinantes de virulência possam estar associados a elementos genéticos móveis, uma relação entre a classificação filogenética e a virulência tem sido reportada: isolados virulentos extra-intestinais são, maioritariamente do grupo B2 e, com menor frequência, do grupo D. Por sua vez os isolados comensais pertencem maioritariamente aos grupos A e B1<sup>84</sup>. Tradicionalmente, infere-se que a prevalência de isolados multirresistentes é menor em isolados B2<sup>84</sup>, embora recentemente se tenha descrito isolados multirresistentes pertencentes a este grupo filogenético<sup>13,35</sup>.

Branger *et al.* promoveu um estudo com 157 *E.coli* produtoras de ESBL, verificando que foram encontradas ESBL em todos os grupos filogenéticos e que a resistência às fluoroquinolonas se encontra associada a uma diminuição de factores de virulência (FV) e da capacidade invasiva<sup>5</sup>, corroborado por outros estudos<sup>58</sup>. Sannes *et al.*, por sua vez, infere que os isolados de *E.coli* do sangue comparativamente a isolados rectais, apresentam mais FV em situações de bacteriémia. Sugere, assim, uma supremacia dos determinantes de virulência sobre os filogenéticos como indicadores preditivos da capacidade de virulência<sup>85</sup>.

A relação entre a resistência aos antimicrobianos, o grupo filogenético a que pertencem e o potencial de virulência não é clara e consensual. De facto, pouco é conhecido sobre a caracterização filogenética de *Escherichia coli* produtores de ESBL e sua importância na patogenicidade destas estirpes, principalmente em situações de infecção invasiva severa, como é o caso da bacteriémia.

## 1.6. Factores de Virulência e Ilhas de Patogenicidade (PAIs) de *Escherichia coli*

A severidade das infecções bacterianas resulta de uma complexa interacção entre a susceptibilidade do hospedeiro e as características do agente patogénico, entre as quais os factores bacterianos de virulência que possui<sup>25</sup>. Dentro dos factores de virulência mais frequentemente associados a infecções severas invasivas por facilitarem a colonização, proliferação e o acesso bacteriano ao sistema endovenoso, podemos destacar as adesinas específicas, os sideróforos e as toxinas<sup>41, 66</sup>.

A adesão celular é amplamente descrita como um passo importante para a patogénese da doença<sup>96</sup>, dado que confere à bactéria uma capacidade de protecção contra alguns mecanismos mecânicos de protecção bacteriana (p.e. descamação da mucosa), aumentando a sua habilidade para se multiplicar e invadir o tecido renal<sup>56, 101</sup>. A adesão da *E. coli* às células uroepiteliais é medido por proteínas bacterianas denominadas de adesinas associadas ou não à produção de fímbrias. O gene *pap* codifica uma adesina fímbria P, a qual media a adesão da bactéria a glicopéptidos localizados na superfície das células do tracto urinário, facilitando a colonização da pélvis e a invasão do parênquima renal<sup>101</sup>, sendo que a proteína *papG*, dada a sua localização estratégica na região distal da estrutura fimbrial, parece ter um papel relevante na protecção da *E. coli* da acção dos neutrófilos<sup>94</sup>. A fímbria FimH é uma adesina sensível aos resíduos de manose existentes nos receptores glicoproteicos, que se encontram localizados na superfície das células epiteliais da bexiga. Esta adesão é seguida pela invasão do tecido uroepitelial<sup>60, 61</sup>.

O gene *sfa* é codificador da adesina fímbria S, reconhecendo resíduos de ácido siálico na laminina. Esta fímbria é uma hemaglutinina manose-resistente que se liga a estruturas presentes

em eritrócitos humanos, sendo usualmente detectada em amostras de *E. coli* isoladas em pacientes com quadros clínicos de sépsis ou meningite. Por sua vez, o gene *afa* codifica uma adesina afimbrial, reconhecendo o antígeno de grupo sanguíneo Dr como seu receptor<sup>40</sup>.

A aerobactina, codificada pelo gene *iucC*, é uma proteína associada à captação de ferro, cujo gene se encontra frequentemente em plasmídeos que codificam também a resistência a antimicrobianos. Está associada a situações clínicas graves dado que promove crescimento bacteriano em concentrações limitantes de ferro, coincidentes com as encontradas no decorrer da infecção<sup>32</sup>.

A hemolisina, codificada pelo gene *hly*, encontra-se associada a quadros severos de infecção. Promove a lise dos eritrócitos, contribuindo para o processo inflamatório através da libertação de ferro, interrupção da fagocitose e causando toxicidade directa para os tecidos<sup>17</sup>.

O factor citotóxico necrotizante 1, codificado pelo gene *cnf*, consiste numa toxina protéica que induz a desaminação do resíduo de glutamina 63 da proteína RhoA GTP-ligante, uma proteína essencial para a organização do citoesqueleto de actina de células eucariotas<sup>50</sup>. O gene *usp*, o qual codifica para uma proteína específica uropatogénica, parece estar associado à infecção do tracto urinário, tendo sido recentemente descrito como um importante factor de virulência<sup>102</sup>.

O pílus de adesão EcpA, embora esteja presente também em isolados comensais, caracteriza-se por ser crucial para a virulência da *E. coli* H7:O157 em humanos. A presença deste proteína parece mimetizar os isolados comensais promovendo a evasão ao sistema imunitário, promovendo a perpetuação da colonização e a promoção da infecção<sup>78</sup>.

As Ilhas de Patogenicidade (PAIs) foram descritas pela primeira vez por Hacker *et al.*, sendo elementos genéticos móveis constituídos por grandes quantidades de DNA (superiores a 10Kb) as

quais codificam para genes de virulência e de resistência<sup>84</sup>. Encontram-se contidas de forma adjacente a genes RNAt e contêm sequências de inserção, integrases e transposases<sup>86</sup>.

De facto, dada a complexidade inerente a esta temática, estirpes de *E. coli* produtoras de ESBL envolvidas em situações de bacteriémia apresentam ainda um potencial de virulência desconhecido. Podem representar clones altamente virulentos ou isolados oportunistas cuja habilidade para causar doença se encontra largamente limitada aos hospedeiros comprometidos, nos quais a resistência poderá apresentar vantagem selectiva.

## 1.7. Objectivos

O objectivo principal deste estudo consiste em caracterizar os determinantes genéticos associados à resistência e virulência em isolados clínicos de *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado provenientes de bacteriémias.

De modo a atingir este objectivo, é necessário:

- Caracterização fenotípica e genotípica dos isolados clínicos de *E.coli* e de *Klebsiella spp* produtores de beta-lactamases de espectro alargado (ESBL) isolados de hemoculturas;
- Caracterização do perfil de disseminação plasmídica através da determinação dos grupos de incompatibilidade dos isolados em estudo;
- Caracterização filogenética da população de *E. coli*;
- Determinação de factores de virulência e Ilhas de Patogenicidade (PAIs) em *E.coli* e sua relação com os perfis de resistência e virulência encontrados.

O interesse nesta temática justifica-se pela necessidade crescente de aumentar o conhecimento das estirpes produtoras de ESBL, principalmente quando provenientes de situações invasivas severas, como é o caso das bacteriémias. Este facto assume especial relevância considerando os limitados estudos neste âmbito e a controversa relação da virulência com a previsibilidade da resistência e patogenicidade dos isolados.

## **CAPÍTULO 2. MATERIAL E MÉTODOS**

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Isolados Bacterianos em estudo

As hemoculturas efectuadas após suspeita de infecção bacteriana por sintomatologia ou parâmetros clínicos, foram processadas pelo sistema automático do Hospital de Santa Maria. Apenas os isolados de *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli* identificados como produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado pelo Laboratório de Microbiologia do Hospital de Santa Maria foram encaminhados para o Laboratório de Controlo Microbiológico da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, no âmbito de ser efectuado um estudo específico. Todas as estirpes foram, então, conservadas a partir de uma cultura pura em criotubos com 1 mL de BHI com glicerol a 15%, devidamente identificados e conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Deste modo, é possível preservar as características genotípicas e fenotípicas das bactérias, garantindo-se que as características permanecem intactas para estudos posteriores e, comparativamente à conservação a temperatura ambiente, diminuindo-se o risco de contaminação bacteriana e/ou fúngica.

O presente trabalho constitui um estudo retrospectivo das estirpes de *Klebsiella* spp. (n=83), nomeadamente *Klebsiella pneumoniae* (n=68) e *Klebsiella oxytoca* (n=15), e *Escherichia coli* (n=72) produtoras de ESBL, isoladas de hemoculturas do Hospital de Santa Maria (HSM) no decorrer de 7 anos consecutivos (2000-2007). Apenas 1 isolado por doente foi considerado.

## **2.2. Métodos de Biotipagem**

Para a caracterização fenotípica e genotípica dos 155 isolados clínicos produtores de beta-lactamases de espectro alargado isolados de hemoculturas, serão utilizadas técnicas tradicionais de determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos, como o método de difusão em disco Kirby-Bauer, e de tipificação molecular, como o *M13-PCR fingerprinting*.

### **2.2.1 Métodos Fenotípicos**

A terapêutica empírica para infecções severas deve ser recomendada tendo por base a distribuição dos microorganismos e o seu perfil de susceptibilidade na instituição onde o regime é administrado, de modo a minizar as consequências de uma terapêutica inapropriada. Deste modo, irá proceder-se à caracterização fenotípica dos isolados em estudo.

### **Susceptibilidade a Agentes Antimicrobianos**

Numa primeira fase, irá proceder-se à determinação da susceptibilidade dos isolados a diferentes famílias de antimicrobianos utilizados na prática clínica, recorrendo-se ao método de difusão de discos de antibiótico em agar, também designado Método de Kirby-Bauer.

Verificou-se a susceptibilidade dos isolados em estudo a 7 antimicrobianos: 3 cefalosporinas, cefoxitina (2<sup>a</sup> geração), ceftazidima e cefotaxima (3<sup>a</sup> geração); aminoglicosídeos, gentamicina; quinolonas, ciprofloxacina e o grupo dos carbapenemos, representado pelo imipenemo. Foi utilizado também um disco de amoxicilina e ácido clavulânico (associação beta-lactâmico com inibidor de beta lactamases).

Os resultados foram analisados tendo em conta os pontos de coorte definidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Tabela1) para interpretação da susceptibilidade de Enterobacteriáceas aos antimicrobianos utilizados no presente estudo<sup>99</sup>.

**Tabela 1.** Pontos de coorte definidos pelo CLSI, 2008<sup>99</sup>.

Agente Antimicrobiano	Conteúdo do disco (µg)	Diâmetro da Zona de Inibição (mm)		
		R	I	S
Cefotaxima (CTX)	30	≤ 14	15-22	≥ 23
Ceftazidima (CAZ)	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Ciprofloxacina (CIP)	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Cefoxitina (FOX)	30	≤ 13	15-17	≥ 18
Imipenemo (IMP)	10	≤ 13	14-15	≥ 16
Gentamicina (GM)	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Amox. e Ác. Clav. (AMC)	20/10	≤ 13	14-17	≥ 18

### 2.2.2. Métodos Genotípicos

O controlo de uma infecção associada aos cuidados de saúde (IACS) pressupõe o conhecimento das bactérias endémicas no meio hospitalar. De modo a proceder à caracterização molecular e avaliar a relação clonal dos isolados clínicos em estudo, recorreu-se ao método genotípico M-13 PCR *fingerprinting*.

#### M-13 PCR *fingerprinting*

O método de M-13 PCR *fingerprinting*, baseado na técnica de *randomly amplified polymorphic DNA analysis* (RAPD) é de fácil realização, embora tenha sido descrita baixa reprodutibilidade inter-ensaios. Tem sido amplamente utilizado neste laboratório para tipificar diversos

microorganismos, sendo referida uma boa correlação com outros métodos<sup>28</sup>. Para extrair o DNA de cada isolado recorreu-se à técnica de *boiled*, menos dispendiosa que o recurso a *Kits* de extracção comerciais e mais rápida que a extracção por fenol:clorofórmio e precipitação com etanol absoluto. A sequência do *primer* utilizado encontra-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** *Primer* para M13 PCR *fingerprinting*

Descrição	Gene(s) alvo	Sequência primer (5'-3')	Referência
<b>M-13</b>	Emparelha aleatoriamente com fragmentos polimórficos do genoma	GAGGGTGGCGGTTCT	Grundmann <i>et al.</i> , 1997

Para a amplificação recorreu-se às *Ready-to-go RAPD Analysis Beads* (Amersham Biosciences®), de acordo com as instruções do fabricante. As reacções foram efectuadas num termociclador (*Clycler<sup>TM</sup> thermal cycler*, Bio-Rad®) previamente aquecido a 95°C segundo o programa descrito na Tabela 3. O restante protocolo encontra-se de acordo com o descrito por Grundmann *et al.*,1997<sup>30</sup>.

**Tabela 3.** Programa de amplificação M-13 PCR *fingerprinting*

Temperatura (°C)	Tempo	Nº ciclos
94	2 min	1
94	20 seg	35
50	1 min	35
72	20 seg	35
72	5 min	1

## 2.3. Métodos Moleculares

As técnicas moleculares têm demonstrado elevado interesse no diagnóstico e terapêutica de doenças infecciosas, promovendo um conhecimento aprofundado dos mecanismos de resistência e virulência de microorganismos clinicamente relevantes.

### 2.3.1. PCR

O método de PCR (Polymerase Chain Reaction) permite a amplificação específica de genes cuja presença se procura confirmar. O amplicão originado com os primers indicados é depois purificado, sequenciado e analisado. Esta reacção, requer uma extracção prévia do DNA das células, de forma a estar disponível para os primers, nucleótidos e DNA polimerase. As reacções de polimerase em cadeia foram realizadas utilizando o *kit* comercial *puReTaq Ready-To-Go PCR Beads* (Amersham Biosciences®), de acordo com as instruções do fabricante.

### Pesquisa de ESBL

Através da técnica de PCR foi efectuada a pesquisa dos enzimas do grupo CTX-M1, tendo-se utilizado para tal os *primers* discriminados na Tabela 4.

**Tabela 4.** *Primers* utilizados na pesquisa de ESBL

Descrição	Sequência primer (5'-3')	Referência
CTX-M1 F	ATGGTTAAAAAATCACTGCGCTCCT	no. X92506
CTX-M1 R	TTACAAACCGTCGGTG	

### Tipificação plasmídica

De modo a classificar os plasmídeos existentes nos isolados de *E.coli* e *Klebsiella* spp. provenientes de bacteriémias foi efectuada uma identificação do grupo Inc, de acordo com o descrito por Carattoli et al., 2005 <sup>8</sup>.

**Tabela 5.** Primers utilizados na tipificação plasmídica.

Identificação	Sequência primer (5'-3')	Referência
HI1 Fw	ggagc gatggattacttcagtac	AF 250878
HI 1Rv	tgccgtttcacctcgtgagta	
HI2 Fw	tttctcctgagtcacctgtaaacac	BX664015
HI2 Rv	ggctcactaccgttgcacacct	
I1 Fw	cgaagccggacggcagaa	M20413
I1 Rv	tcgtcgtccgccaagtctgt	
X Fw	aaccttagaggctattaagttgctgat	Y00768
X Rv	tgagagtcaattttatctcatgttttagc	
L/M Fw	ggatgaaaactatcagcatctgaag	U27345
L/M Rv	ctgcagggggcattctttagg	
N Fw	gtctaacgagcttaccgaag	NC_003292
N Rv	gtttcaactctgccaagttc	
FIA Fw	ccatgctggtctagagaaggtg	J01724
FIA Rv	gtatatccttactggcttccgcag	
FIB Fw	ggagtctgacacacgattttctg	M26308
FIB Rv	ctcccgtcgttcagggcatt	
W Fw	cctaagaacaacaagccccecg	U12441
W Rv	ggtgcgcggcatagaaccgt	
Y Fw	aattcaacaacactgtgcagcctg	K02380
Y Rv	gcgagaatggacgattacaaaactt	
P Fw	ctatggccctgcaaacgcgcccagaaa	M20134
P Rv	tcacgcgccagggcgcagcc	
FIC Fw	gtgaactggcagatgaggaagg	AH003523
FIC Rv	ttctcctcgtcggcaactagat	

A/C Fw	gagaaccaaagacaaagacctgga	X73674
A/C Rv	acgacaaacctgaattgcctcctt	
T Fw	ttggcctgtttgtgcctaaacct	K00053
T Rv	cgttgattacacttagctttggac	
FIIS Fw	ctgtcgtaagctgatggc	AE006471
FIIS Rv	ctctgccacaaactcagc	
FrepB Fw	tgatcgtttaaggaatttg	AY234375
FrepB Rv	gaagatcagtcacacatcc	
K/B Fw	gcggtccggaaagccagaaaac	M93063
K Rv	tctttcacgagcccgcaaaa	
B/O Rv	tctgcgttccgcaagttega	M28718

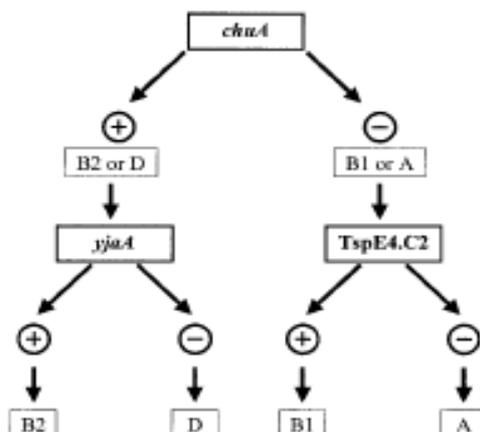
### Caracterização Filogenética

Os isolados de *E.coli* provenientes de bacteriémias do Hospital de Santa Maria foram caracterizados filogeneticamente com os *primers* descritos na Tabela 6 e de acordo com o descrito por Clermont, O *et al.* (2000)<sup>12</sup>.

**Tabela 6.** *Primers* utilizados na caracterização filogenética dos isolados de *E. coli*.

Nome <i>Primer</i>	Sequência primer (5'-3')
ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT
ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA
YjaA.1	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG
YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC
TspE4C2.1	GAGTAATGTCGGGGCATTCA
TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG

Os resultados obtidos através da técnica de PCR foram interpretados de acordo com a árvore dicotômica apresentada na Figura 4 <sup>12</sup>.



**Figura 4.** Árvore dicotômica utilizada para determinar o grupo filogenético dos isolados de *E. coli* através dos resultados obtidos por PCR<sup>12</sup>.

### Factores de Virulência e Ilhas de Patogenicidade

**Tabela 7.** Primers utilizados na identificação de factores de virulência e de ilhas de patogenicidade

Descrição	Gene(s) alvo	Sequência primer (5'-3')	Referência
Fímbria P	papC	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	Pitout <i>et al.</i> , 2005
Fímbria S e F1C	sfa/focDE	CTCCGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	
Adesinas Afa	afaC	CGGCTTTTCTGCTGAACTGGCAGGC CCGTCAGCCCCACGGCAGACC	
Fímbria do Tipo1	fimH	AACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTG ATTGCGTACCAGCATTAGCAATGTCC	
Hemolisina	hlyCA	AGATTCTTGGGCATGTATCCT	

		TTGCTTTGCAGACTGTAGTGT	
Factor Citotóxico Necrotizante	cnf	TTATATAGTCGTCAAGATGGA	
Aerobactina	iucC	CACTAAGCTTTACAATATTGA AAACCTGGCTTACGCAACTGT ACCCGTCTGCAAATCATGGAT	
Factor comum de aderência	ecpA	AAGCTGGTTGTGACGCCAC GAAACCATCCTGTGCGGTG	Presente trabalho
Proteína específica uropatogénica	usp	CCGAGTAGTGTGTTGGCGAC GTCGGGGCGTAACAATCCT	Presente trabalho
PAI III 536	sfa AI.1	CGGGCATGCATCAATTATCTTTG	
	sfa AI.2	TGTGTAGATGCAGTCACTCCG	
PAI IV 536	IR P2 FP	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	
	IR P2 RP	TCGTGCGGCAGCGTTTCTTCT	
PAI II CFT073	cft 073.2 Ent1	ATGGATGTTGTATCGCGC	Sabate <i>et al.</i> , 2006
	cft 073.2 Ent2	ACGAGCATGTGGATCTGC	
PAI I 536	I.9	TAATGCCGGAGATTCATTGTC	
	I.10	AGGATTTGTCTCAGGGCTTT	
PAI II 536	orf1 up	CATGTCCAAAGTTCGAGCC	
	orf1 down	CTACGTCAGGCTGGCTTTG	
PAI I j96	papGif	TCGTGCTCAGGTCCGGAATTT	
	papGlr	TGGCATCCCACATTATCG	
PAI II j96	hlyd	GGATCCATGAAAACATGGTTAATGGG	Sabate <i>et al.</i> , 2006
	cnf	GAAGTTACAGCGCGCA	
PAI I CFT073	RPAi	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	
	RPAf	TCGCCACCAATCACAGCGAAC	

### 2.3.2. Purificação de Produtos de PCR

Para completar a caracterização genética das bactérias é necessário sequenciar os produtos obtidos na amplificação por PCR. Sendo a sequenciação um processo complexo e muito sensível

é necessário garantir que a solução a analisar contém apenas o DNA pretendido. Deste modo, as amostras foram purificadas utilizando-se o Kit de purificação *JETquick Spin Column Technique* (Genomed®), segundo as instruções do fabricante.

## 2.4. Métodos Informáticos

A análise das sequências nucleotídicas amplificadas pelo método de PCR foi efectuada recorrendo a dois programas informáticos: BLAST e CLUSTALW.

### 2.4.1. BLAST

O programa BLAST 2.0 (*Basic Local Alignment Search Tool*, disponível em [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) permite a análise das sequências nucleotídicas obtidas considerando a homologia com as contidas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), permitindo conhecer a significância estatística dos emparelhamentos.

### 2.4.2. ClustalW

O Software ClustalW Multalign é um programa de alinhamento de múltiplas sequências, para DNA e proteína, disponível online ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)). Produz alinhamentos de várias sequências divergentes, de forma biologicamente relevante. Calcula o melhor emparelhamento possível entre cada sequencia, e fornece um *output* alinhado para que as identidades, semelhanças e diferenças possam ser visíveis.

## **2.5. Métodos Estatísticos**

De modo a perceber a significância estatística das comparações efectuadas ao longo do presente trabalho foi efectuado o Teste de Fisher Exacto, recorrendo ao programa de cálculo disponível em <http://www.graphpad.com/quickcalcs/index>.

## **CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Frequência de isolamento de ESBL em situações de bacteriémias no Hospital de Santa Maria, 2000-2007

De modo a perceber a representatividade do isolamento de estirpes produtoras de ESBL provenientes de bacteriémias no decorrer de 7 anos no HSM, procedeu-se à análise dos isolados enviados para a FFUL comparativamente à totalidade dos isolados recolhidos em hemoculturas no hospital durante o período em estudo (Tabela 8).

**Tabela 8.** Frequência de isolamento de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp produtores de ESBL, considerando a totalidade de isolados em situações de bacteriémia, por ano de estudo, no Hospital de Santa Maria.

Ano de Isolamento	Nº isolados (%)			
	<i>E. coli</i>		<i>Klebsiella</i> spp.	
	Total (100)	ESBL	Total (100)	ESBL
2000	130	2 (1,5)	59	1 (1,7)
2001	174	1 (0,6)	87	8 (9,2)
2002	174	4 (2,3)	64	9 (14,1)
2003	209	5 (2,4)	83	14 (16,9)
2004	236	6 (2,5)	93	5 (5,4)
2005	223	20 (9,0)	107	20 (18,7)
2006	229	11 (4,8)	102	15 (14,7)
2007	233	23 (9,9)	107	11 (10,3)

A frequência de isolamento de *Escherichia coli* produtora de ESBL em bacteriémias variou entre 0,6% e 9,9%, nos anos de 2001 e 2007, respectivamente. Os anos decorridos entre 2005 e 2007 demonstraram um aumento significativo comparativamente aos anos anteriores (0,6-2,5% Vs 4,8-9,9%, IC95%,  $p < 0,05$ ).

Embora há cerca de 10 anos atrás um estudo de hemoculturas europeias efectuado entre 1997 e 1998 pelo programa internacional de vigilância antimicrobiana SENTRY, tenha determinado um índice de 0,36% de isolados de *E. coli* potencialmente produtores de ESBL<sup>24</sup>, foi recentemente descrito em Espanha por Rodriguez-Bano *et al.*, uma frequência de isolamento que, actualmente rondará os 9,0%<sup>81</sup>, com uma preocupante tendência crescente igualmente verificada por toda a Europa<sup>7, 15, 31</sup> e concordante com a evolução descrita no presente trabalho.

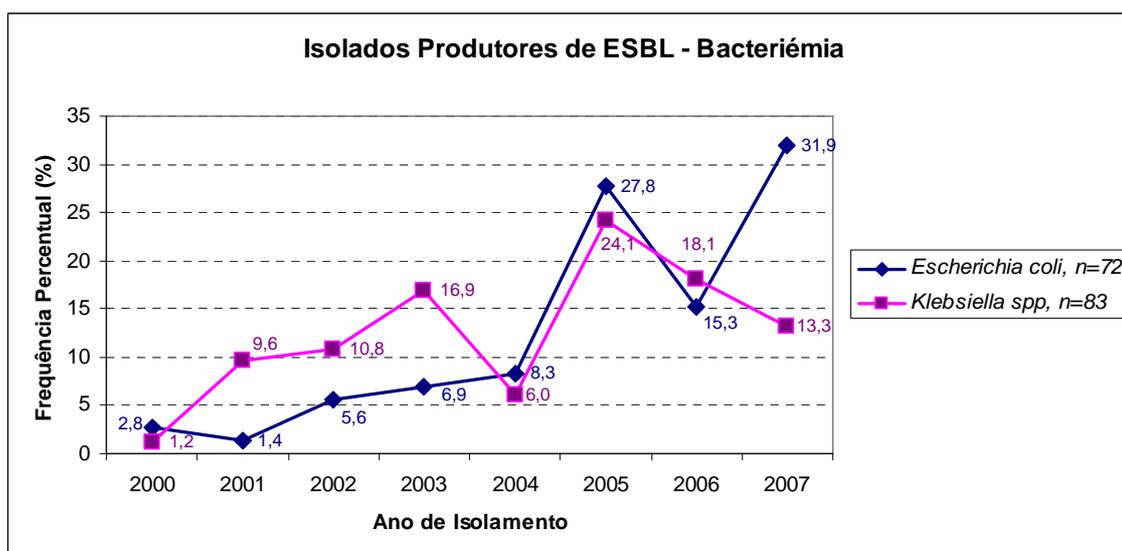
Nos isolados de *Klebsiella spp.* o índice percentual de isolados produtores de ESBL assumiram uma variação entre 1,7% e 18,7% nos anos de 2000 e 2005, respectivamente, com os anos de 2000 e 2004 a apresentarem os índices mais reduzidos (1,7 e 5,4%, respectivamente). No último ano do presente estudo, 2007, a frequência de produção de ESBL em isolados de *Klebsiella spp* foi de 10,3%. Embora no presente estudo se verifique um decréscimo no índice de isolados desta espécie nos últimos 3 anos (18,7% em 2005 Vs 10,3% em 2007), importa notar que outros estudos europeus descrevem valores de produção de ESBL na ordem dos 9,4% (França, 1998)<sup>19</sup>, 10,2% (Itália, 2003)<sup>54</sup> e 13,7% (Espanha, 2008)<sup>64</sup>, pelo que os valores obtidos no Hospital de Santa Maria indiciam uma necessidade de medidas preventivas e de monitorização rigorosa.

### 3.2. Caracterização da amostra em estudo

No período de tempo decorrido entre Janeiro de 2000 e Dezembro de 2007 foram identificados 155 isolados clínicos produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBL), nomeadamente 72 *Escherichia coli* e 83 *Klebsiella* spp., das quais 68 *Klebsiella pneumoniae* e 15 *Klebsiella oxytoca*. Todos os isolados são provenientes de hemoculturas do Hospital de Santa Maria (HSM), Lisboa, tendo sido apenas considerado um isolado por doente.

#### 3.2.1. Evolução da frequência de isolamento de produtores de ESBL na amostra em estudo

De um modo complementar à informação recolhida no ponto 3.1. deste trabalho, na qual foi determinada a frequência de isolamento de ESBL no Hospital de Santa Maria em situações de bacteriémia, importa também caracterizar a amostra em estudo no que infere à evolução destas estirpes entre 2000 e 2007 (Figura 5).



**Figura 5.** Distribuição da frequência percentual dos isolados *Escherichia coli* (n=72) e *Klebsiella* spp. (n=83) produtores de ESBL provenientes de bacteriémia, por ano de isolamento.

Como se pode observar na Figura 5, verifica-se uma tendência crescente de isolamento de estirpes produtoras de ESBL em ambas as estirpes, com os anos compreendidos entre 2005 e 2007 a apresentarem significativamente ( $p < 0,05$ ; NC=95%) um número superior de isolados produtores de ESBL, comparativamente aos restantes anos.

Analizando as duas espécies bacterianas isoladamente, verifica-se um aumento significativo de isolamentos de *E. coli* no ano de 2005 (os quais representavam 8,33% da totalidade da amostra em 2004, passando para 27,78% em 2005,  $p < 0,05$ ; NC=95%), comportamento semelhante ao encontrado na frequência de isolados de *Klebsiella* spp. produtores de ESBL, nos quais também se verificou um aumento extraordinário de isolados (6,02% em 2004 para 24,10% em 2005,  $p < 0,05$ ; NC=95%), De facto, os resultados obtidos sugerem a existência de um surto de ambos os isolados produtores de ESBL no HSM no ano de 2005.

Verifica-se que a frequência de isolamento de *Klebsiella* spp. invasiva diminuiu significativamente nos anos subsequentes (24,10% no ano de 2005 comparativamente a 18,07% e 13,25% dos anos de 2006 e 2007, respectivamente), comportamento distinto do verificado para os isolados de *Escherichia coli*. Nestes isolados invasivos produtores de ESBL, verificou-se um aumento de 28% em 2005 para 32% em 2007, sendo preocupante o facto de, neste último, o número de isolados de *E. coli* atingir o valor mais elevado dos últimos 7 anos.

### 3.2.2. Distribuição dos isolados por Serviços Clínicos

O estudo das unidades nas quais mais frequentemente foram isoladas estirpes produtoras de ESBL permite não só verificar a possibilidade de existência de clones endêmicos no Hospital ou em serviços de determinada tipologia, assim como implementar medidas específicas e adequadas à situação. Deste modo, pretendeu-se estudar a distribuição da frequência absoluta e percentual dos isolados por agrupamento de serviços clínicos, considerando a similaridade de serviço prestado (Tabela 9).

**Tabela 9.** Distribuição da frequência absoluta e percentual de isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. por serviço clínico do HSM.

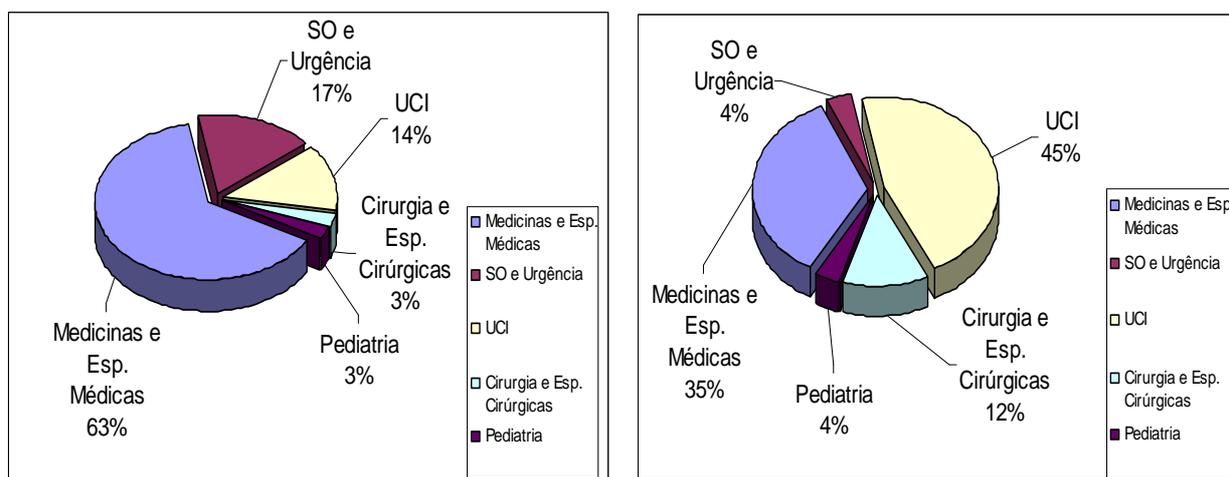
SERVIÇOS	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i> spp.
	Nº isolados (%)	Nº isolados (%)
Medicinas e Esp. Médicas	46 (63,89)	29 (34,94)
SO e Urgência	12 (16,67)	3 (3,61)
UCI	10 (13,89)	38 (45,78)
Cirurgia e Esp. Cirúrgicas	2 (2,78)	10 (12,05)
Pediatria	2 (2,78)	3 (3,61)
<b>TOTAL</b>	<b>72 (100)</b>	<b>83 (100)</b>

Legenda: SO-Sala de Observações da Urgência; UCI-Unidade de Cuidados Intensivos

No presente estudo, os isolados de *Escherichia coli* provêm maioritariamente dos serviços de medicina e de especialidades médicas do HSM, nos quais são isolados 63,89% da totalidade da amostra, seguidos dos isolados da Sala de Observações da Urgência e Urgência Central (16,67%) e das distintas unidades de cuidados intensivos, representando 13,89% dos isolados. A *Klebsiella* spp. apresenta uma distribuição distinta, apesar dos serviços em que mais frequentemente são

isolados serem comuns: 45,78% dos isolados provêm das unidades de cuidados intensivos e apenas 34,94% das medicinas e especialidades médicas. Em ambas as estirpes existe um baixo número de isolados provenientes dos serviços de pediatria comparativamente aos restantes, representando 3,61% da amostra de isolados de *Klebsiella* spp. e 2,78% de *Escherichia coli*.

A representação gráfica dos resultados (Figura 6 e 7) permite comparar de um modo mais perceptível a representatividade dos serviços clínicos em cada uma das espécies bacterianas:

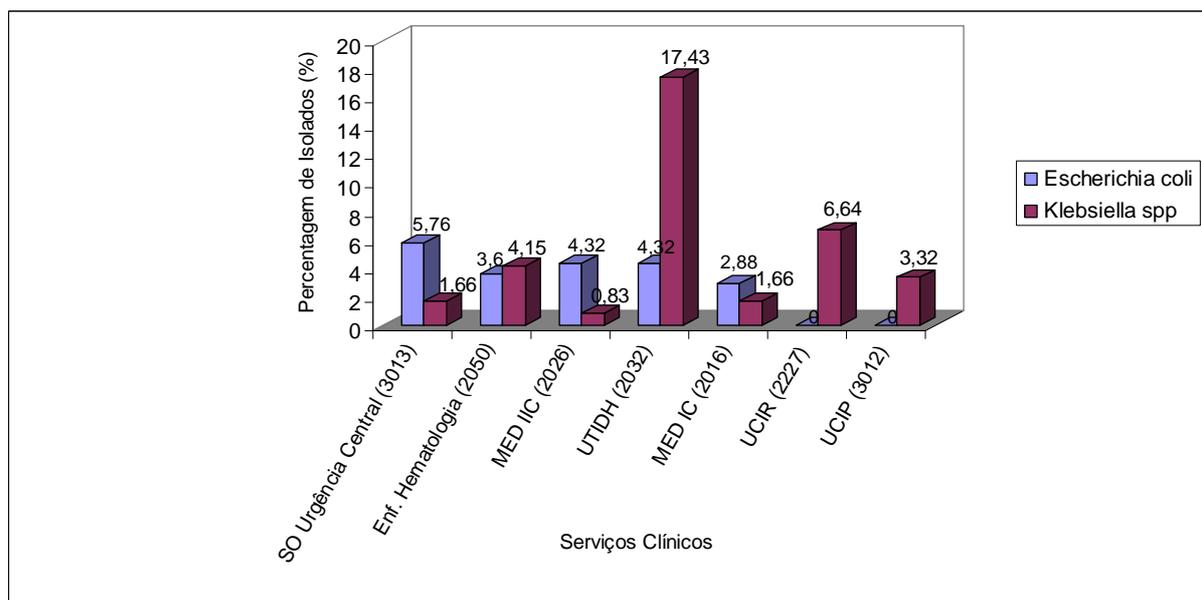


**Figuras 6 e 7.** Distribuição dos isolados clínicos de *Escherichia coli* e *Klebsiella*, respectivamente, por tipologia de serviços.

Os isolados bacteriémicos de *Escherichia coli* produtores de ESBL encontram-se mais frequentemente associados aos serviços de medicina e especialidades médicas do que os isolados de *Klebsiella* spp. (63% Vs 35%, respectivamente), espécie na qual os isolados na unidade de cuidados intensivos e nos serviços cirúrgicos representam mais de 50% da totalidade da amostra. De facto, contrariamente ao demonstrado pela *Klebsiella* spp., os isolados de *E. coli* produtores de ESBL não aparecem frequentemente nas UCI, comportamento descrito também por

outros autores<sup>81</sup>. Por sua vez, na sala de observação da urgência e serviço de urgência central denota-se também uma superior frequência de isolamento de *Escherichia coli* comparativamente à *Klebsiella* spp. (16,67% Vs 3,61%, respectivamente).

Na Figura 8 encontram-se representados especificamente os serviços clínicos nos quais mais frequentemente se verificou o isolamento de produtores de ESBL em hemoculturas (Figura 4). Importa, no entanto, referir que esta classificação não tem em conta outros factores além dos serviços clínicos que influenciam o risco de contrair bacteriémia através da infecção por estes isolados, entre os quais a severidade da patologia dos doentes, o estado de imunossupressão ou a existência de dispositivos médicos invasivos<sup>95</sup>.



**Figura 8.** Serviços clínicos do HSM nos quais se verificou mais frequentemente o isolamento de *Escherichia coli* e *Klebsiella* produtores de ESBL em hemoculturas, durante os anos compreendidos entre 2000 e 2007. Legenda: SO- Sala de Observações; Med-Medicina; UTIDH – Unidade de tratamentos intensivos de doenças hematológicas; UCIR-Unidade de cuidados intensivos respiratórios; UCIP-Unidade de cuidados intensivos polivalentes

Ao considerarmos os serviços com maior representatividade de isolamento de espécies produtoras de ESBL em bacteriémias, verificamos que os isolados de *Escherichia coli* se encontram mais frequentemente distribuídos por 5 serviços, de forma bastante uniforme (2,88-5,76%) quando comparada com os isolados de *Klebsiella* spp. (0,83-17,43%). De facto, os isolados de *Klebsiella* spp. produtores de ESBL encontram-se maioritariamente na unidade de tratamentos intensivos de doenças hematológicas-UTIDH (representando 17,43% da amostra), unidade de cuidados intensivos respiratórios-UCIR (6,64%) e unidade de cuidados intensivos polivalentes –UCIP (3,32%), sendo que nestes últimos serviços não foi isolada nenhuma *E. coli*.

De forma expectável, dada a gravidade das patologias inerentes e a maior frequência com que são efectuadas hemoculturas, a enfermaria de hematologia e a unidade de tratamentos intensivos de doenças hematológicas foram os serviços do HSM nos quais se verificou uma maior predominância de isolados clínicos em ambas as estirpes simultaneamente.

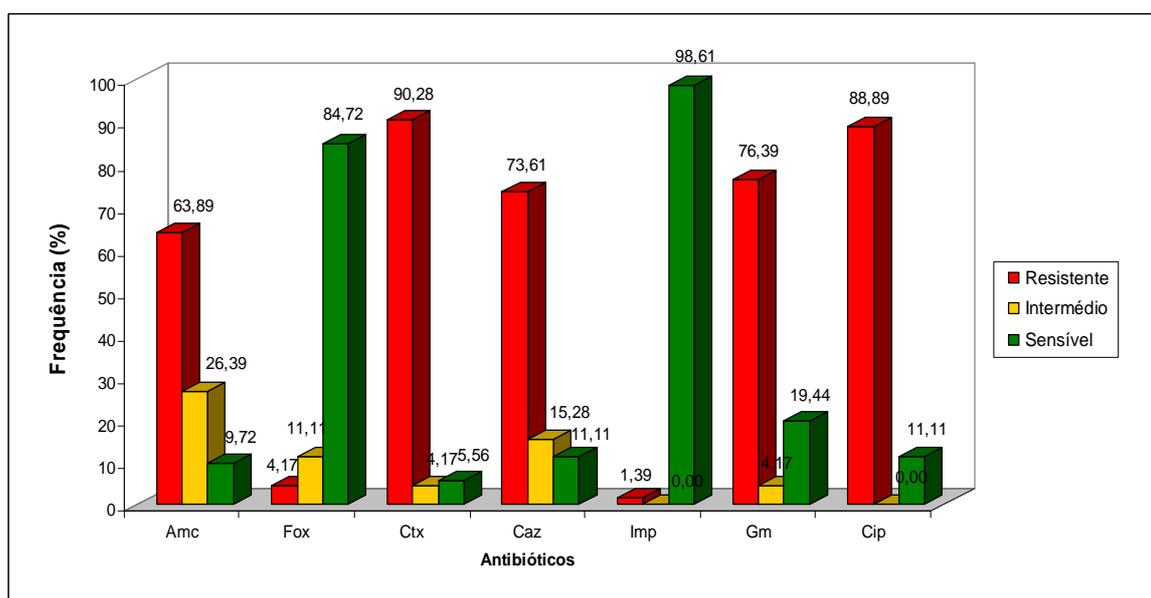
Conhecidos os serviços do HSM nos quais mais frequentemente são isoladas estirpes produtoras de ESBL em situações invasivas, é pertinente a percepção da possibilidade de um único clone endémico entre os diferentes serviços ou a possibilidade da existência de vários clones.

### 3.3. Caracterização fenotípica dos isolados

Os antibióticos seleccionados pretendem representar os grupos antimicrobianos mais frequentemente utilizados na prática clínica, nomeadamente o grupo dos  $\beta$ -lactâmicos (representado pela amoxicilina associado com ácido clavulânico, cefalosporina de segunda geração-cefoxotina e cefalosporinas de terceira geração-cefotaxima e ceftazidima); carbapenemos, representado pelo imipenemo; aminoglicosídeos representada pela gentamicina e, finalmente o grupo das fluoroquinolonas representado pela ciprofloxacina.

#### 3.3.1. *Escherichia coli*

Na Figura 9, são apresentadas as frequências percentuais referentes ao comportamento dos 72 isolados clínicos de *Escherichia coli* face aos 7 antibióticos em estudo.



**Figura 9.** Resultados obtidos nos antibiogramas das 72 estirpes de *Escherichia coli* aos antibióticos estudados. As frequências percentuais de cada comportamento estão assinaladas sobre a respectiva barra. Legenda: Amc-amoxicilina/ác. Clavulânico; Fox-cefoxotina; Ctx-cefotaxima; Caz-ceftazidima; Imp-imipenemo; Gm-gentamicina; Cip-ciprofloxacina

Em situações graves e nas unidades de cuidados intensivos, a bacteriemia requer terapêutica antimicrobiana empírica urgente, iniciada tendo em conta os microorganismos mais frequentes e o perfil de susceptibilidade dos isolados da região geográfica em que estes se encontram<sup>77</sup>. Como pode ser observado na Figura 9, a susceptibilidade dos isolados em estudo aos antibióticos testados encontram-se compreendidas entre 5,56 e 98,61%, sendo importante realçar que esta variabilidade é influenciada pelo comportamento aos antibióticos cefoxitina e imipenemo, cuja resistência representa apenas 15,28% e 1,39% dos isolados, respectivamente.

As consequências da prescrição de cefalosporinas em infecções graves causadas por estirpes com ESBL (mesmo quando aparentemente susceptíveis) encontra-se já bem estabelecida<sup>69, 100</sup>, conduzindo a elevados valores de ineficácia (42-100%)<sup>48</sup>. Rodriguez-Bano *et al.* descreve que em situações de bacteriemia provocada por isolados produtores de ESBL do tipo CTX-M, cerca de 4 em cada 10 doentes que receberam monoterapia empírica com cefalosporinas não sobreviveram<sup>81</sup>. Concordante com outros estudos<sup>16</sup>, Kang, C. *et al.* infere que 52,8% dos pacientes com bacteriemia do seu estudo receberam uma terapêutica inadequada, resultando num acréscimo de mortalidade (27,4 Vs 38,4%, p=0,049) e de maior necessidade de alteração de terapêutica comparativamente aos pacientes que receberam a terapêutica adequada<sup>47</sup>.

De facto, no presente estudo verificamos apenas 3,17% dos isolados demonstraram resistência à cefalosporina de segunda geração testada, cefoxitina, embora os índices de resistência encontrados para as cefalosporinas de terceira geração, cefotaxima e ceftazidima, tenham sido bastante superiores: 90,28 e 73,61%, respectivamente. A percentagem de isolados de *Escherichia coli* resistentes à associação amoxicilina-ác.clavulânico (AMC) foi de, aproximadamente 64%,

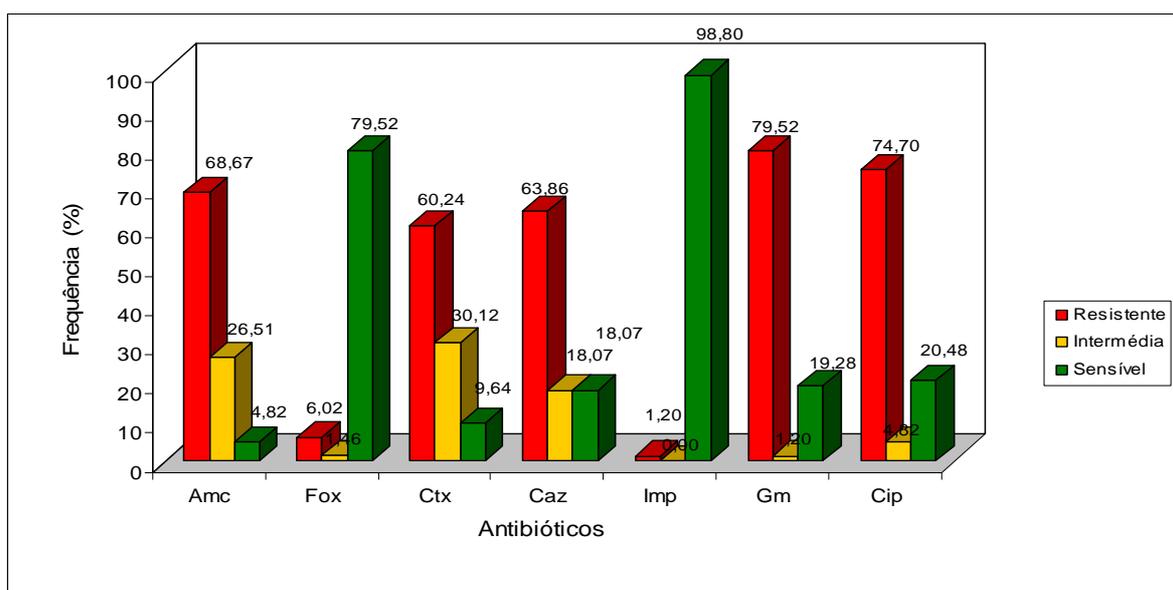
valor bastante superior ao descrito no programa de monitorização europeu EARSS-*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*, o qual apresenta isolados clínicos invasivos de *E. coli* com um índice de resistência ao AMC de 30,6%<sup>63</sup>. Embora concordante com outros estudos (20-30%)<sup>33, 92</sup>, importando realçar que estes trabalhos foram efectuados apenas tendo em consideração bacteriémias como consequência de infecções urinárias. No entanto, considerando que em Portugal, à semelhança do comportamento existente em outros países europeus, a classe dos  $\beta$ -lactâmicos se encontram entre os mais frequentemente prescritos a nível da comunidade<sup>23</sup>, os resultados obtidos reforçam a importância clínica do conhecimento destes isolados, assim como a necessidade de antecipação do seu comportamento aos antimicrobianos vulgarmente utilizados.

Os valores de resistência aos antimicrobianos ciprofloxacina e gentamicina determinados neste estudo foram de 88,89% e 76,39%. Um estudo desenvolvido pelo BSAC-*British Society for Antimicrobial Chemotherapy*, em isolados provenientes de bacteriémia recolhidas no reino unido entre 2000 e 2001 reporta um valor de apenas 11% de resistência à gentamicina<sup>79</sup>, enquanto que Oteo, J., *et al.*, com uma amostra de 7098 isolados invasivos de *E. coli* recolhidos em 32 hospitais em Espanha, refere índices de resistência à ciprofloxacina e gentamicina de 6,8% e 5,3%, respectivamente<sup>65</sup>, embora recentemente tenham sido descritos valores em Espanha bastante próximos dos descritos neste trabalho<sup>27</sup>. De facto, é preocupante que cerca de 40% (28/72) dos isolados apresentem um perfil de simultânea resistência a todos os antibióticos com excepção da cefoxitina e imipenemo. Os elevados índices de susceptibilidade frequentemente associados a este carbapenemo<sup>2, 4, 67</sup>, os quais no presente estudo foram superiores a 90% sustentam a hipótese de que esta parece ser a melhor opção terapêutica para situações de bacteriémia causada por

isolados produtores de ESBL<sup>81</sup>. No entanto, importa notar que o recente aparecimento de isolados resistentes aos carbapenemos<sup>72</sup> e a velocidade com que novas situações têm surgido, parecendo acompanhar o perfil de prescrição, fazem com que a recomendação empírica deste grupo de antibióticos deva ser efectuada com bastante precaução.

### 3.3.2. *Klebsiella* spp.

Na figura 10 são apresentadas as frequências percentuais referentes ao comportamento clínico dos isolados de *Klebsiella* spp em estudo face aos antibioticos seleccionados.



**Figura 10.** Resultados obtidos nos antibiogramas das 83 estirpes de *Klebsiella* spp produtoras de ESBL. As frequências percentuais de cada comportamento estão assinaladas por cima da respectiva barra. Legenda: Amc-amoxicilina/ác. Clavulânico; Fox-cefoxitina; Ctx-cefotaxima; Caz-ceftazidima; Imp-imipenemo; Gm-gentamicina; Cip-ciprofloxacina

Como pode ser observado pela análise da Figura 10 e comparação com a Figura 9, o perfil de susceptibilidade aos antibióticos obtido pelos isolados de *Klebsiella* spp. e *E. coli* do HSM são

sobreponíveis. Ainda assim, a resistência ao  $\beta$ -lactâmico CTX é superior nos isolados de *E. coli* comparativamente à *Klebsiella* spp (90,28% Vs 60,24%), sugerindo uma superior incidência de isolados de *E. coli* produtores de cefotaximases comparativamente à *Klebsiella* spp.

6,02% das *Klebsiella* spp. reflectem uma resistência à cefoxitina, valor inferior ao encontrado para a *E. coli* (15,28%), enquanto que a frequência de isolamento de isolados resistentes ao imipenemo foi a mesma (1,20% na *E. coli* Vs 1,39% na *Klebsiella* spp.), embora de forma preocupante cerca de 60% dos isolados em estudo com resistência simultânea à ceftazidima, cefotaxima, ciprofloxacina e gentamicina.

Um estudo recente descreve 718 isolados invasivos de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de 35 hospitais, referindo que o valor de resistência mais significativo e preocupante é o do antimicrobiano ciprofloxacina (10,4%)<sup>64</sup>, valor bastante inferior ao determinado no presente estudo (74,7 %). Também a resistência encontrada ao antimicrobiano representativo da classe dos aminoglicosídeos, gentamicina, assume uma percentagem de aproximadamente 80%. Assim, considerando que a espécie de *Klebsiella* spp. é frequentemente isolada em situações clínicas severas em unidades de cuidados intensivos<sup>31</sup> e tendo em conta os índices de resistência descritos aos grupos terapêuticos habitualmente associados a alternativas aos  $\beta$ -lactâmicos, reforça a necessidade de incentivos à criação de documentos orientadores de prescrição e monitorização de isolados multirresistentes.

### 3.3.3. Antibiotipo e ESBL

Os isolados clínicos foram agrupados de acordo com o antibiograma, nomeadamente pela selecção dos três antibióticos cujos índices de resistência eram simultaneamente superiores na *E. coli* e *Klebsiella* spp.: cefotaxima (90,28% Vs 60,24%), ciprofloxacina (88,89% Vs 74,70%) e ceftazidima (73,61% Vs 63,86%). O principal objectivo consiste em verificar se há predominância de algum antibiograma no ambiente hospitalar do HSM durante os 6 anos (2001-2007).

**Tabela 10.** Classificação fenotípica dos isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. de acordo com o comportamento face aos antibióticos cefotaxima (CTX), ciprofloxacina (CIP) e ceftazidima (CAZ).

		Perfil Fenotípico			<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella</i> spp.
		CTX	CIP	CAZ	Nº isolados (%)	Nº isolados (%)
Classificação Fenotípica	<b>F1A</b>	R	R	R	44 (61,10)	33 (39,76)
	<b>F1B</b>	R	R	I	11 (15,28)	8 (9,64)
	<b>F2</b>	S/I	R	R	4 (5,56)	12 (14,46)
	<b>F3</b>	R	S	R	4 (5,56)	8 (9,64)
	<b>F4</b>		Variável		9 (12,50)	22 (26,51)
<b>Total</b>					<b>72 (100)</b>	<b>83 (100)</b>

A classificação foi efectuada em 4 grupos distintos (Tabela 10). O grupo predominante F1A compreende 44 dos 72 isolados de *E. coli* (61,11%) e 33 dos 83 isolados de *Klebsiella* spp (39,76%), sendo caracterizado pela resistência simultânea aos três antibióticos seleccionados. Na

*Escherichia coli* verifica-se uma predominância dos serviços de medicinas e sala de observações, seguido da unidade UTIDH, com percentagens de representatividade de 18,18%, 15,91% e 9,09%, respectivamente. Este antibiotipo surge em Outubro de 2002 persistindo no HSM ao longo de todos os anos decorrentes do estudo, apresentando o último isolado no fim do mês de Novembro de 2007. Também na *Klebsiella* spp., foi na unidade UTIDH que mais frequentemente se isolaram estirpes produtoras de ESBL em situações de bacteriémias pertencentes ao grupo predominante F1A (13,25%), seguida da unidade UCIP (3,6%). De forma semelhante ao descrito para a *E. coli*, também este antibiotipo surge em 2002 (Dez/2002), mantendo-se até ao fim do presente estudo.

O grupo F1B distingue-se apenas por apresentar uma resistência intermédia à ceftazidima, contemplando 11 isolados (15,28%) de *E. coli* e 8 isolados de *Klebsiella* spp. (9,64%). Os grupos F2 (isolados sensíveis/intermédios à cefotaxima) e F3 (isolados sensíveis à ciprofloxacina) representam 14,46% e 9,64% dos isolados, respectivamente, e apenas 5,56% da população de *Escherichia coli* em estudo. Finalmente, o grupo F4 cujos isolados apresentam um comportamento variável aos antibióticos seleccionados, grupo no qual se incluem apenas 12,5% dos isolados de *E. coli* (9/72), comparativamente aos 26,51% dos isolados de *Klebsiella* spp. (22/83).

Todos os isolados são produtores de ESBL e, embora não se tenha determinado a enzima produzida para todos os grupos fenotípicos, outros estudos a decorrer em simultâneo no laboratório permitiram associar o grupo F2 com a produção de ESBL pertencente ao grupo TEM

e o F1A e F1B à produção da ESBL pertence ao grupo CTX-M, sendo que os isolados F1A são produtores da CTX-M15.

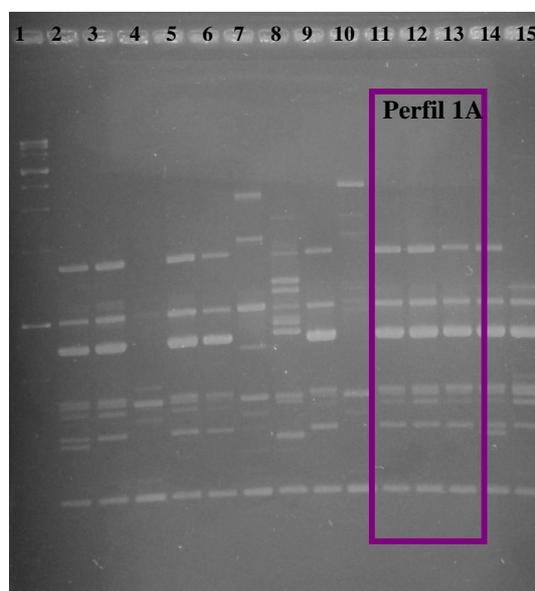
Alguns dos pontos relevantes a registar nesta fase do presente projecto é a similar persistência dos isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. (2002-2007), embora no caso das *E. coli* pareça existir uma menor variabilidade e maior adaptação dos isolados com o perfil de resistências do grupo F1 ao ambiente do Hospital de Santa Maria, perfil associado à produção de CTX-M15.

### 3.4. Caracterização Molecular

O controlo de uma infecção associada aos cuidados de saúde (IACS) pressupõe o conhecimento das bactérias endémicas no meio hospitalar. *E.coli* e *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes são comuns em situações de bacteriémia, causando “clusters de infecção”, em que aproximadamente 50% destes apresentam capacidade de disseminação clonal<sup>71</sup>. De modo a avaliar a relação clonal entre as estirpes de cada género em estudo, foi utilizado o método de tipificação *M-13 PCR fingerprinting*.

#### 3.4.1. *Escherichia coli*

Foram seleccionadas 46 estirpes de *E. coli* pertencentes aos quatro perfis fenotípicos anteriormente determinados (ver ponto 3.2.2.), com as quais se procedeu à determinação do perfil genotípico, como se encontra exemplificado na Figura 11.



**Figura 11.** Identificação do Perfil Genético *dos isolados de Escherichia coli* do HSM.

Legenda: Poço 1 (1)- Marcador de pesos moleculares; (2)488Ec, Perfil1B; (3)491Ec, PerfilA1A (4)497Ec,Perfil2; (5) 547Ec,Perfil1A; (6) 551Ec, Perfil1A; (7) 555Ec, Perfil3; (8) 563Ec, Perfil4 (9) 581Ec, Perfil 1A; (10) 587Ec, Perfil 5; (11) 600Ec, Perfil1A; (12) 619Ec, Perfil1A; (13) 621Ec, Perfil1 A; (14) 623Ec, Perfil 1B; (15) 640Ec, Perfil1C

Na totalidade das amostras estudadas, verificou-se a existência de seis perfis genotípicos distintos (1-6), com o perfil maioritário 1 a apresentar três subtipos (1A, 1B e 1C). O perfil genético 1, identificado na Figura 11, é encontrado em 60,87% dos isolados seleccionados, principalmente em isolados produtores de enzimas do tipo CTX-M e CTX-M15 (perfil fenotípico F1A e F1B). Apenas um isolado pertencente ao perfil fenotípico F4 apresentou o perfil genético 1. Os restantes perfis (2 a 6) encontram-se distribuídos por todos os grupos fenotípicos, embora seja difícil perceber uma tendência comparativa entre o perfil genéticos e o perfil fenotípico, dado o baixo número de amostras de cada perfil. Os isolados produtores de TEM (filogenético F3), encontram-se geneticamente distantes dos produtores de CTX-M15, demonstrando os perfis genéticos do tipo 3 a 6, embora a produção de ESBL do tipo CTXM-15 e TEM possam estar associadas no mesmo isolado bacteriano<sup>9</sup>. A relação entre o perfil fenotípico/ESBL produzida e o perfil genotípico é apresentada na Tabela 11:

**Tabela 11.** Distribuição do perfil genotípico de 28 isolados clínicos de *Escherichia coli* provenientes de bacteriémias tendo em conta o perfil fenotípico e a ESBL produzida.

F	ESBL	n	Perfil Genético							
			Número de isolados(%)							
			1A	1B	1C	2	3	4	5	6
F1A	CTX-M15	35	21(60,00)	3(8,57)	1(2,86)	2(5,71)	(5,71)	2(5,71)	4(11,44)	-
F1B	CTX-M	3	1(33,33)	1(33,33)	-	-	-	-	1(33,33)	-
F2	TEM	4	-	-	-	-	1(25,00)	1(25,00)	1(25,00)	1(25,00)
F3	N/D	2	-	-	-	-	1(50,00)	1(50,00)	-	-
F4	N/D	2	-	-	1(50,00)	1(50,00)	-	-	-	-
<b>Total</b>		<b>46</b>	<b>22(47,82)</b>	<b>4(8,70)</b>	<b>2 4,35)</b>	<b>3(6,52)</b>	<b>4(8,70)</b>	<b>4(8,70)</b>	<b>6(13,04)</b>	<b>1(2,17)</b>

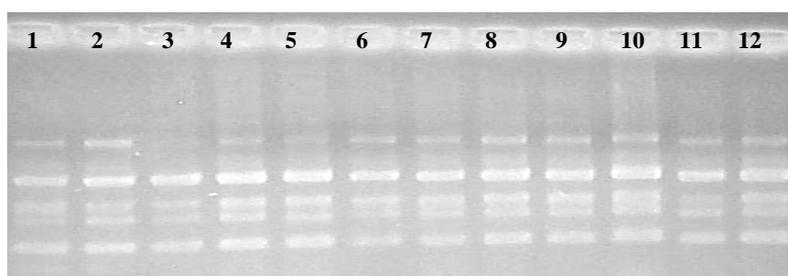
Legenda: F=Fenótipo; n = número de isolados

Cerca de 71% (25/35) dos isolados representativos dos isolados produtores de CTX-M15 pertencem ao perfil genético 1, sugerindo a existência de um clone endêmico no Hospital de

Santa Maria (Clone1). Considerando que o isolamento destas amostras se encontram compreendidas entre Dezembro de 2002 e Dezembro de 2007 e que se encontram representados em 6 serviços diferentes, poder-se-á sugerir que este clone 1 permanece disseminado pelo HSM há, pelo menos, 5 anos. Considerando o elevado tempo de permanência de um clone endémico isolado em situações de infecções invasivas severas, como é o caso da bacteriémia, torna-se imperativo perceber o possível envolvimento dos serviços hospitalares de modo a perceber a possível disseminação entre serviços

### 3.4.1.1. Disseminação do clone1 entre diferentes serviços do HSM

Tendo como ponto de partida os dois serviços hospitalares com maior frequência de isolamentos de *Escherichia coli* produtoras de ESBL em situações de bacteriémia (capítulo 3.1.2), foram seleccionados 18 isolados clínicos dos serviços predominantes SO (n=7) e Med IIC (n=6), assim como seleccionados outros 3 isolados indistintamente, e efectuada a tipificação molecular (Figura 12).



Legenda: Poço(1)129Ec; (2)322E; (3)547Ec;(4)551Ec;(5)674Ec;(6)691Ec (7)687Ec  
(8)353Ec (9)403Ec (10)619Ec (11)352Ec (12)372Ec

Na Figura 12 é possível perceber o perfil genético do clone1, o clone predominante no Hospital de Santa Maria, verificando-se que é comum a isolados dos serviços SO e Medicina IIC.

A relação entre os serviços hospitalares nos quais se verificou o isolamento e o perfil genético obtido encontra-se na Tabela 12.

**Tabela 12.** Perfil genético dos isolados *Escherichia coli* de bacteriémias dos serviços hospitalares predominantes SO e MediIC, entre outros, no período de tempo entre 2000 e 2007.

Serviço	Isolados	Data Isolamento	Perfil Genético								
			1A	1B	1C	2	3	4	5	6	
<b>SO</b>	10	24-10-2000									x
3013	129	15-05-2003	x								
	322	17-12-2004	x								
	547	07-08-2006	x								
	674	07-05-2007		x							
	687	30-01-2007	x								
	691	11-06-2007	x								
<b>Med IIC</b>	25	15-10-2001				x					
2026	352	21-03-2005	x								
	353	23-03-2005	x								
	372	02-06-2005	x								
	403	26-08-2005	x								
	619	20-01-2007	x								
<b>Outros</b>											
	2221	16-10-2006	x								
	2160	18-11-2006	x								
	2442	22-01-2007	x								

Legenda: 3013: Sala de observação da urgência (SO); 2026:Medicina IIC; 2221:Doenças pulmonaresP7; 2160:Patologia cirúrgicaP8; 2442:Pneumologia pediátrica

Os sete isolados clínicos de *Escherichia coli* do serviço SO são provenientes de bacteriémias decorridas entre os anos de 2000 e 2007. Como pode ser observado no Tabela 12, todos os isolados seleccionados,excepto um, apresentam um perfil genético comum, designado como

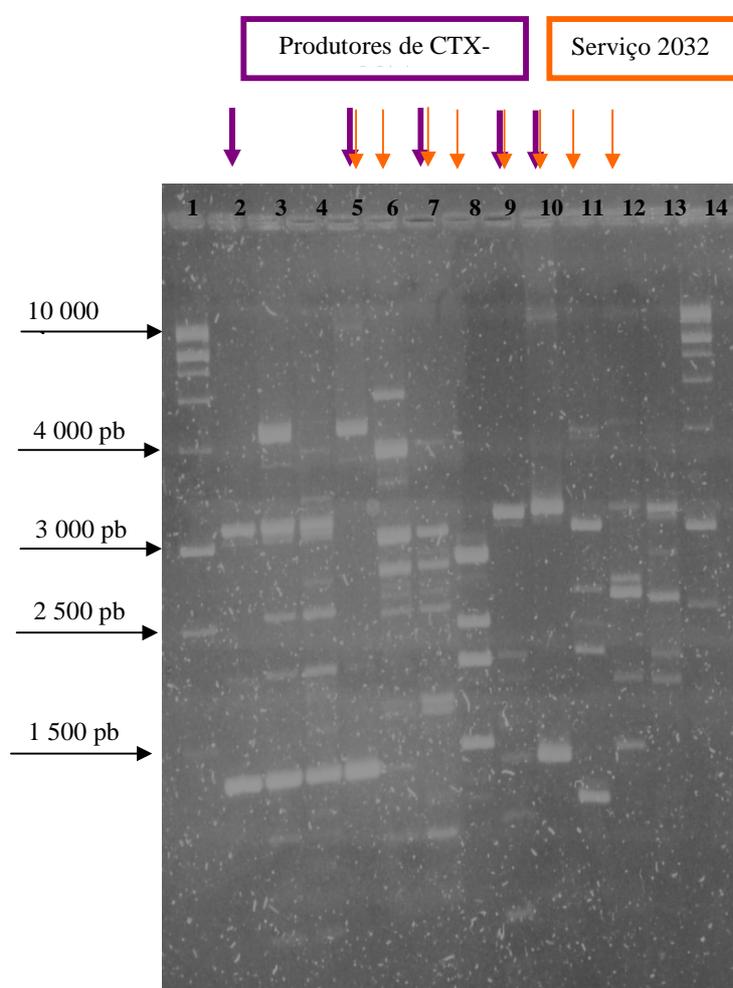
clone 1. De facto, apenas o primeiro isolado deste serviço hospitalar, que data de Outubro de 2000, apresenta o perfil 6. No serviço Medicina IIC os resultados são similares aos já descritos para o serviço SO. A estirpe 25, isolada em 2001 apresenta um perfil distinto (perfil 2), enquanto que as 4 estirpes restantes, do ano de 2005, provêm do mesmo clone que persiste no HSM nos últimos anos e que é transversal aos serviços hospitalares. Estes resultados sugerem que estamos na presença de um clone com elevada capacidade de disseminação e de adaptação e que o ambiente genético das *Escherichia coli* isoladas em situações clínicas de bacteriémias nos anos de 2000/2001 é distinto do clone que se mantém no hospital até à actualidade. Esta alteração clonal no ambiente genético dos isolados do HSM coincide com o primeiro isolamento de uma estirpe produtora de CTX-M15 em Portugal<sup>14</sup> num isolado proveniente deste hospital.

Quando observamos o perfil genético dos 3 isolados clínicos provenientes de outros serviços distintos dos predominantes, verificamos que estes isolados são geneticamente iguais aos que permanecem no HSM desde 2002 e que, corroborando o já referido, apresenta elevada capacidade de transmissibilidade entre serviços geograficamente dispersos. Não podemos ser alheios às características deste clone 1, nomeadamente a aparente elevada capacidade invasiva, assim como elevada capacidade de disseminação e de adaptação. Especial relevância deve ser dada a esta situação se considerarmos dois factos: (1) a existência de um isolado (621Ec) proveniente de um serviço pediátrico e (2) a interacção entre Hospital e Comunidade e a possível dispersão deste clone para esta última. De facto, verifica-se a existência de isolados provenientes do serviço 3013, sala de observações da urgência, o qual funciona como “via de entrada” dos indivíduos da comunidade no hospital, com o mesmo perfil clonal dos isolados “tradicionalmente” considerados hospitalares, como o serviço 2026, uma medicina.

Dos 16 doentes seleccionados cujos isolados pertencem ao clone 1 todos eles, excepto um, apresentam uma idade superior a 75 anos, de acordo com informações recolhidas no HSM. Embora neste estudo se desconheça patologias associadas, terapêutica administrada ou internamentos prévios ao isolamento das *E. coli* em situações de bacteriémia, é possível antever uma forte possibilidade de interacção destes doentes com unidades prestadoras de saúde. Rodriguez-Bano, J., *et al.* descreve que 19% dos episódios bacteriémicos detectados foram estritamente associados à aquisição na comunidade, o que poderá significar que isolados multiresistentes podem ser a causa de sérias infecções adquiridas na comunidade<sup>81</sup>. A situação descrita no presente estudo demonstra a necessidade de redefinir acções de monitorização dos isolados na comunidade, reiterando a importância da evolução do conceito específico de infecção nosocomial para um conceito de infecção associada aos cuidados de saúde, o qual contempla os riscos associados às características da população geriátrica e à elevada mobilidade de doentes e profissionais entre unidades prestadoras de cuidados de saúde.

### 3.4.2. Tipificação Molecular dos isolados clínicos de *Klebsiella* spp.

De modo a verificar a possível relação clonal entre os isolados de *Klebsiella* spp. produtores de ESB, seleccionaram-se 12 isolados clínicos tendo como critério a representatividade dos quatro antibiótipos e a selecção de isolados consecutivos provenientes do mesmo serviço hospitalar (n=8). Foram também incluídos isolados pertencentes ao antibiótipo F1A, produtor de CTX-M15 (n=5). Estes isolados encontram-se devidamente identificados e assinalados na Figura 13.



**Figura 13.** Determinação do perfil genético dos isolados de *Klebsiella* spp. do HSM.

Legenda: Poço 1 (1) Marcador PM 1Kb (2) 560Kl; (3) 553Kl (4) 1454Kl (5) 535Kl (6) 79Kl (7) 139Kl (8) 164Kl (9) 238Kl (10) 412Kl (11) 541Kl (12) 593Kl (13) 1507Kl (14) Marcador PM 1Kb

Como é possível observar na Figura 13, existe uma grande variabilidade genética nos isolados de *Klebsiella* spp. estudados. Mesmo quando são comparados isolados com antibiograma comum ou que demonstram a produção da mesma enzima, verifica-se que não pertencem a um só clone.

Como já foi referido (capítulo 3.1.2 do presente trabalho), o serviço hospitalar no qual mais frequentemente se isolou *Klebsiella* spp. produtora de ESBL entre 2001 e 2007 em situações invasivas foi a unidade de tratamentos intensivos de doenças hematológicas-UTIDH (17,43%). Quando comparamos os 8 isolados obtidos neste serviço verificamos a existência de 8 perfis genéticos distintos, pelo que é possível inferir que contrariamente ao descrito anteriormente para a *E. coli.*, e apesar de esta estirpe produtora de CTXM-15 apresentar capacidade invasiva e se manter endêmica no HSM de Dezembro-2002 até Dezembro de 2007, verificamos que os isolados de *Klebsiella* spp. demonstram uma diversificação genotípica não verificada nos isolados de *E. coli.* Dada a crescente importância destes isolados no ambiente hospitalar e os escassos estudos referentes a esta espécie, torna imperioso estudos mais detalhados sobre a virulência, capacidade invasiva, capacidade de persistência e disseminação<sup>103</sup>

### 3.5. Grupos de Incompatibilidade Plasmídica

Embora seja reconhecido o papel dos plasmídeos na transferência horizontal<sup>8, 45</sup>, poucos estudos têm caracterizado os plasmídeos em diferentes populações bacterianas.

#### 3.5.1 – *Escherichia coli*

Foram estudados 28 isolados que foram seleccionados tendo em conta o perfil de resistência, a predominância, os anos de isolamento e os serviços. Os resultados são apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Classificação dos plasmídeos detectados nos 28 isolados de *E. coli*. produtores de CTX-M15 e outras ESBL.

Isolados de <i>E. coli</i>		Origem de Replicação						Total	
ESBL	Nº isolados	Nº de Isolados*						Nº replicões	média
		A/C	FrepB	FIA	FIB	N	Y		
CTX-M15	21	2	11	13	11	2	2	41	1,95
Outros	7	0	5	6	4	1	0	16	2,29
Todos	28	2	16	19	15	3	2	57	2,04

\* No mesmo isolado encontravam-se presentes mais do que um plasmídeo

Como pode ser observado na Tabela 13, quer nos isolados produtores de CTX-M15 quer nos isolados produtores de outro tipo de ESBL, o plasmídeo mais frequentemente detectado é o apresenta a origem de replicação do grupo IncF (FrepB), resultados concordantes com com outros autores<sup>45, 88</sup>. Rijavec, M. *et al.* descreve o estudo efectuado com 110 isolados de *Escherichia coli* recolhidas em situações infecções do tracto urinário, nos quais 26% apresentavam integrões da classe1 e 56% apresentavam plasmídios do tipoF distribuidos por todos os grupos filogenéticos, sugerindo que todos eles têm similar tendência para adquirir e manter elementos genéticos móveis frequentemente associados a determinantes de resistência<sup>80</sup>, comportamento descrito por

outros autores <sup>55</sup>. De facto, também no presente estudo os plasmídeos do tipo IncF (FIA, FIB, FIC e FII) se encontram amplamente dispersos pelos isolados de *E. coli*, sugerindo uma adaptação bem sucedida a esta espécie.

Em todos os isolados (n=28) foi detectado, pelo menos, um plasmídeo, tendo sido o FIA (n=19), o FrepB (n=16) e o FIB (n=15) os mais prevalentes. Nos 28 isolados foram detectados 57 replicões, sendo que 25 isolados demonstraram a existência de multireplicões, frequentemente associações do grupo F aos replicões A/C, N e Y.

### 3.5. 2 – *Klebsiella* spp.

Na Tabela 14 podem ser encontrados os resultados obtidos na determinação da tipologia plasmídica dos isolados invasivos de *Klebsiella* spp produtores de ESBL.

**Tabela 14.** Classificação dos plasmídeos detectados nos 22 isolados de *Klebsiella* spp. produtores de CTX-M15 e outras ESBL.

Isolados de <i>Klebsiella</i> spp.		Origem de replicação Nº de isolados					Total	
Nº isolados		A/C	FrepB	FIB	HI1	P	Nº replicões	média
<b>ESBL</b>								
CTX-M15	16	0	0	0	10	1	11	0,69
Outros	6	1	1	1	0	1	4	0,67
Todos	22	1	1	1	10	2	13	0,59

Os plasmídeos com a origem de replicação HI1 foram os maioritariamente detectados nos isolados em estudo (10/22), seguido da origem de replicação do tipo P (2/22). A origem de

replicação A/C e FIB encontrava-se presente em apenas 1 isolado. De facto, os resultados parecem sugerir uma especificidade plasmídica concordante com a espécie microbiana. Assim, os isolados de *Klebsiella* spp. apresentam mais frequentemente plasmídeos com origem de replicação HII e P (este último apenas isolado em *Klebsiella oxytoca*) enquanto que nas *E. coli* foram detectados maioritariamente plasmídeos do Grupo F. Também na representatividade de plasmídeos detectados surge um comportamento distinto entre as espécies estudadas: na *Klebsiella* spp detectaram-se 13 plasmídeos em 22 isolados, com 8 isolados sem qualquer plasmídeo (média de 0,59 plasmídeos/isolado); enquanto que na *E. coli* foram detectados 57 plasmídeos em 28 isolados, sendo que todos os isolados apresentavam pelo menos 1 plasmídeo (média de 2,04 plasmídeos/isolado).

Apesar do papel crítico desempenhado pelos plasmídeos na transferência genética horizontal, poucos estudos procederam à comparação das características plasmídicas entre diferentes espécies bacterianas, nomeadamente da  $\beta$ -lactamase CTX-M15 em isolados de *Klebsiella* spp.. Os resultados obtidos são indicadores de uma superior capacidade de disseminação horizontal da *Escherichia coli* comparativamente à *Klebsiella* spp., assim como sugerem que os genes contidos nestes elementos genéticos móveis não conseguem ser facilmente transmitidos entre estas espécies.

### 3.6. Estudos de Filogenia e Virulência na *Escherichia coli*

#### 3.6.1. Caracterização das estirpes quanto ao grupo Filogenético

O objectivo deste capítulo foi caracterizar o grupo filogenético das estirpes produtoras de ESBL isoladas de bacteriémias. Foi, assim, determinado o grupo filogenético de todos os isolados de *Escherichia coli* em estudo, excepto dois, perfazendo um total de 70 isolados. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15.** Distribuição dos 70 isolados de *E. coli* produtores de ESBL isolados em situação de bacteriemia no HSM, pelos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D.

Perfil		Grupo Filogenético				Total de Isolados
Fenotípico	ESBL	Nº de isolados (%)				
		A	B1	B2	D	
F1A	CTX-M15	2 (4,80)	2 (4,76)	30 (71,43)	8 (19,05)	42
F1B	CTM-M	1 (9,09)	0	9 (81,82)	1 (9,09)	11
F2	TEM	2 (50,00)	0	1 (25,00)	1 (25,00)	4
F3	N/D	1 (25,00)	0	1 (25,00)	2 (50,00)	4
F4	N/D	3 (33,33)	0	5 (55,56)	1 (11,11)	9
<b>TOTAL</b>		9(12,86)	2(2,86)	46 (65,71)	13(18,57)	70

Legenda: N/D – Não determinado

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que 65,71% dos isolados (46/70) derivam do grupo filogenético B2, usualmente associado a isolados altamente patogénicos, embora, a amostra apresente uma elevada percentagem de isolados provenientes do grupo filogenético comensal A (12,86%), estatisticamente igual à obtida para o grupo filogenético D, associado a bactérias patogénicas intestinais e extra-intestinais (18,57%). Apenas 2,86% dos isolados provêm do grupo filogenético B1.

Picard *et al.* estudou 82 estirpes de *E coli* comensais e patogénicas, caracterizando-as no que infere aos grupos filogenéticos, verificando a presença de conhecidos factores de virulência e determinando a virulência *in vivo* destes mesmos isolados, recorrendo a um modelo de virulência extraintestinal. O autor verifica que os isolados comensais derivam maioritariamente dos grupos filogenéticos A e B1, apresentam baixo número de factores de virulência, não causando mortalidade *in vivo*. Por sua vez, os grupos filogenéticos B2 e D encontram-se associados a isolados patogénicos causadores de infecções invasivas, estabelecendo uma relação entre o grupo D e isolados patogénicos intestinais ou extra-intestinais e o grupo B2, contendo estirpes altamente patogénicas<sup>73</sup>. Vários autores corroboram esta associação descrita<sup>34, 39-43, 85</sup>, embora poucos estudos tenham sido efectuados considerando o crescente envolvimento de isolados resistentes em infecções invasivas. De facto, os resultados obtidos neste estudo são indicativos que estirpes caracterizadas filogeneticamente como comensais podem ser isoladas em situações invasivas, sugerindo a potencial supremacia dos factores dependentes do hospedeiro no desenvolvimento da infecção.

No que infere à relação entre o grupo filogenético e a resistência dos isolados, verificamos uma frequente associação na literatura entre grupo filogenético B2 e isolados patogénicos, caracterizados como mais virulentos e com elevada sensibilidade, principalmente às fluoroquinolonas<sup>35, 58, 72, 85</sup>. No entanto, Branger *et al.*, num estudo com isolados produtores de distintas  $\beta$ -lactamases (TEM, SHV e CTX-M) descreve os isolados produtores de SHV e TEM como estando maioritariamente incluídos no grupo filogenético B2, exibindo numerosos factores de virulência (FV) e apresentando sensibilidade às fluoroquinolonas. Por sua vez os isolados produtores da ESBL CTX-M foi associada ao grupo filogenético D, apresentando poucos FV e

elevados índices de resistências às fluoroquinolonas<sup>5</sup>, revelando deste modo que a associação entre grupos filogenéticos, virulência e resistência não é ainda consensual.

Branger *et al.* descreve uma associação das enzimas ESBL do tipo CTX-M ao grupo filogenético D, comparativamente aos isolados produtores de ESBL do tipo SHV e TEM, os quais apresentavam mais frequentemente isolados do grupo B2. Este autor conclui, no entanto, que a emergência de isolados produtores de ESBL parece resultar de complexas interações entre o tipo de ESBL produzido, o “background” genético do isolado e a pressão selectiva dos nichos ecológicos nos quais de encontra<sup>5</sup>. Quando os resultados obtidos no presente estudo são analisados por perfil fenotípico, verificamos que nos isolados do grupo F1A, produtor de CTX-M15, se encontram isolados de todos os grupos filogenéticos, embora maioritariamente provenientes do grupo B2 (71,43%) e D (19,05%), concordante com o descritos noutros estudos<sup>13, 52</sup>.

Na variante fenotípica F1B, cujos isolados apresentam um comportamento de resistência intermédia à cefotaxima e mantêm as resistências aos antibióticos ceftazidima e ciprofloxacina, mantém-se a predominância de isolados do grupo B2 (81,82%). Os isolados do grupo fenotípico F2 e F3 apresentam predominância de isolados pertencentes aos grupos filogenéticos A e D embora a amostra seja pequena (n=4) para tirar quaisquer elacções conclusivas. Finalmente, no grupo F4, o qual apresenta um comportamento variável aos antibióticos, os isolados são, na sua maioria, provenientes do grupo filogenético B2 (55,56%), embora seja notória uma elevada percentagem (33,33%) de isolados pertencentes ao grupo A, usualmente associado a *Escherichia coli* comensais.

Se analisarmos a distribuição dos grupos filogenéticos em isolados produtores de CTX-M15 que detinham um perfil de resistência concomitante aos beta-lactâmicos (excepto carbapenemos), aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (os quais representam 87,80% da amostra total) encontramos também todos os grupos filogenéticos representados (28 isolados do grupo B2, 2 do grupo B1, 4 do grupo D e 2 do grupo A).

A emergência de isolados de *E. coli* produtores de ESBL parece ser resultado de complexas interacções entre o tipo de ESBL, o perfil genético dos isolados, e as pressões selectivas dos nichos ecológicos nos quais se incluem. De facto, apesar da relação previamente estabelecida entre o grupo filogenético e a resistência às fluoroquinolonas ser a que se encontra melhor documentada<sup>40, 43, 97</sup>, os resultados obtidos no presente estudo sugerem uma revisão destes factos, tendo em consideração a multirresistência frequentemente associada aos isolados produtores de ESBL.

### 3.6.2. Perfil de Virulência

Foram seleccionados 45 isolados de *E.coli* causadoras de bacteriémias no HSM, tendo em conta a representatividade do clone1 que persiste no hospital, o tipo de ESBL produzida (39 produtores de CTX-M15 e 6 produtores de outras ESBL) e os quatro grupos filogenéticos (6 isolados do grupoA, 2 do grupo B1, 27 do grupo B2 e 10 do grupoD). Nesta amostra, foi estudada a distribuição de 9 factores de virulência associados a *E.coli* extra intestinais, previamente associadas como agentes causadores de infecções do tracto urinário (UTI) e bacteriémia<sup>81</sup>.

Os resultados obtidos na pesquisa de factores de virulência pode ser observada na Tabela 16.

**Tabela 16.** Distribuição dos factores de virulência produzidos pelos 45 isolados de *E. coli* pertencentes ao clone 1

			Nº de isolados (%)
	Factores de Virulência (FV)	Gene alvo	45 (100)
Adesão	Fímbrias do tipo P	<i>papC</i>	0
	Fímbrias do tipo S	<i>Sfa/focDE</i>	0
	Adesina afimbrial	<i>afaC</i>	0
	Fímbrias do Tipo1	<i>fimH</i>	41 (91,11)
Toxinas	Hemolisina	<i>hly</i>	1 (2,22)
	Factor Citotóxico Necrotizante	<i>cnf</i>	0
Captação Ferro	Aerobactina	<i>iucC</i>	28 (62,22)
Outros	Pilus comum de adesão	<i>ecpA</i>	41 (91,11)
	Proteína específica uropatogénica	<i>usp</i>	0

Os factores de virulência mais frequentemente encontrados foram a adesina FimH e a aerobactina *iucC*, presente em 91,11% e 62,22% dos isolados estudados, respectivamente. Nenhum isolado demonstrou a presença dos genes de adesão *papC*, *sfa* e *afa.*, assim como do gene *cnf*, o qual codifica para o factor citotóxico necrotizante. A presença da hemolisina codificada pelo gene *hly*

foi detectada apenas em 1 isolado (2,22%). 91,11% dos isolados (41/45) apresentaram o gene *ecpA*, referente à produção “*E. coli common pilus*” e em nenhum foi encontrado o gene *usp*, o qual codifica para a proteína específica uropatogénica. Importa, no entanto, perceber como estes resultados se encontram distribuídos nos 45 isolados. O modo como os genes de virulência foram detectados nos isolados do clone 1 permitiu o seu agrupamento em padrões característicos, cuja frequência se encontra apresentada na Tabela 17.

**Tabela 17.** Frequência dos padrões genéticos de virulência em amostras isoladas de pacientes com bacteriémia causada por isolados persistentes no HSM, clone 1.

Padrão de virulência	Genes de virulência	Nº de isolados (%)
		n= 45(100)
1	0	3 (6,67)
2	<i>fimH, iucC</i>	1 (2,22)
3	<i>ecpA, iucC</i>	1 (2,22)
4	<i>fimH, ecpA</i>	14 (31,11)
5	<i>fimH, ecpA, iucC</i>	25 (55,56)
6	<i>fimH, ecpA, iucC, hylCA</i>	1 (2,22)

Pela análise da Tabela 17 verificamos que apesar de existirem 6 padrões distintos de virulência, cerca de 35% dos isolados apresentam apenas 2 dos 9 factores de virulência (FV) estudados e que aproximadamente 7% dos isolados não demonstram a presença de quaisquer FV pesquisados no presente trabalho. Os padrões de virulência maioritariamente encontrados na amostra em estudo compreende a presença apenas de dois (*fimH, ecpA*-padrão 4) ou três (*fimH, ecpA, iucC*-padrão 5) dos nove factores de virulência pesquisados.

A maior percentagem dos isolados provenientes de doentes com bacteriémia (55,56%) apresenta o padrão de virulência 5, constituído pela presença dos genes *fimH*, *ecpA* e *iucC*, seguido do padrão 4 (31,11% dos isolados), que apresentam os genes *fimH* e *ecpA*. Apenas 1 isolado (2,22% da amostra total) apresenta concomitantemente 4 dos 9 factores de virulência (FV) estudados, nomeadamente *fimH*, *ecpA*, *iucC* e *hylCA*.

No presente estudo não se verificou a existência de qualquer padrão de virulência específico nos isolados produtores de CTX-15 comparativamente a outras ESBL. Karisisik, E. *et al.* descreve, no estudo efectuado a 114 isolados clínicos de *E. coli* do Reino Unido, que a detecção de factores de virulência não se encontrava restrita aos clones epidémicos produtores de CTX-M-15, embora o par de genes que codifica para uma adesina do tracto urinário *afa/draBC* parece estar significativamente associado à produção de  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M<sup>49</sup>. Pitout, J. *et al.* por sua vez, infere não existir diferença entre o nível de virulência dos produtores e não produtores de  $\beta$ -lactamases CTX-M, com valores médios de 8,5 e 8,7 ( $p=1,10$ ), respectivamente, embora os factores de virulência encontrados nestes isolados sejam distintos comparativamente aos encontrados nos produtores de TEM, SHV e VEB-1<sup>75</sup>. Importa considerar que a amostra considerada em ambos os estudos é maioritariamente de isolados do tracto urinário e não de situações de bacteriémia.

Embora se encontre descrito que, comparativamente a formas menos severas de ITU, a bacteriémia é preferencialmente causada por clones que expressam fímbrias do tipo P<sup>44</sup>, na amostra de 45 isolados produtores de CTX-M15 e pertencentes ao clone1 o qual permanece no HSM durante anos, estas adesinas uropatogénicas não parecem ter uma acção significativa na

patogenicidade das *E. coli* considerando que nenhum isolado demonstrou a presença dos genes de adesão pesquisados: *papC*, *sfa/focDE* e *afaC*. Os resultados poderão ser justificados pela especificidade dos genes do operão pesquisados dado que a presença de fímbrias do tipo P parece ser fortemente influenciada pela idade e pelo comprometimento imunitário do hospedeiro<sup>66</sup>.

Importa, no entanto realçar a elevada percentagem de isolados nos quais foi encontrada a presença do gene *fimH*, codificante das fímbrias do tipo1 (91,11%), as quais apresentam uma importante contribuição para a colonização da bexiga, estando também associadas a mecanismos de invasão e patogenicidade da *E. coli*<sup>56,60</sup>. No presente estudo, esta adesina encontra-se presente em 4 dos 5 padrões de virulência que apresentam genes de virulência, nomeadamente nos padrões predominantes 4 e 5, sugerindo uma acção relevante nestes isolados. Verifica-se que na totalidade da amostra em estudo, com excepção de um isolado, a detecção da *fimH* encontra-se associada à presença do gene *ecpA*.

A hemolisina, codificada pelo gene *hly*, é frequentemente associada com quadros severos de infecção sendo vista como um importante factor na implantação da infecção devido ao aumento da toxicidade bacteriana e sua acção citolítica que disponibiliza ferro para as bactérias<sup>72, 85</sup>. No entanto, no presente estudo houve amplificação do gene *hly* em apenas 1 amostra, isolado no qual se verificou também a presença dos genes *fimH*, *ecpA* e *iucC*. Apesar de, como já referido, não existir qualquer padrão que diferencie os isolados produtores de CTX-M15 (n=39) dos outros isolados (n=6), é curioso verificar que este isolado não é produtor de CTX-M15 e que apresenta um padrão de maior sensibilidade comparativamente aos restantes. Outra toxina pesquisada foi o factor citotóxico necrotizante, embora nenhum isolado em estudo tenha demonstrado a presença

deste gene. Os resultados obtidos encontram-se em concordância com o descrito por Vila, J., *et al.*, autor que descreve que dos 6 FV estudados, a hemolisina e o factor citotóxico necrotizante se encontram mais frequentemente presentes ( $p < 0,05$ ) em isolados susceptíveis às quinolonas do que em isolados resistentes (pielonefrite - 52,4% Vs 14,3% ou cistite - 31,0% Vs 0%)<sup>97</sup>, embora o estudo tenha sido efectuado apenas em isolados uropatogénicos.

A produção da aerobactina parece contribuir para a virulência dos isolados dentro e fora do tracto urinário<sup>96</sup>. 55,66% dos isolados (25/45) apresentam o padrão de virulência 5, o qual se caracteriza pela presença concomitante dos genes *fimH*, *ecpA* e *iucC*. O nosso estudo determinou que este último, foi o segundo de maior prevalência na população estudada, tendo sido detectado em 62,22% do total da amostra, corroborando a potencial importância em quadros severos de infecção.

O aumento da resistência antimicrobiana em isolados de *E. coli* verificou-se paralelamente ao aumento da incidência de sépsis por este microorganismo, sugerindo uma correlação entre a resistência e a virulência<sup>72</sup>. Johnson, J. *et al.*, num estudo desenvolvido entre 2000 e 2001, comparou 76 isolados de *E. coli* multirresistentes e 76 isolados sensíveis. Os isolados provenientes do grupo MR representam predominantemente um grupo filogenético não-B2 (91%) e exibiram uma reduzida virulência molecular comparativamente ao grupo controlo B2. Apenas 30% dos isolados multiresistentes foram considerados ExPEC, comparativamente a 61% do grupo controlo, no entanto exibiram um índice de virulência inferior do que os ExPEC susceptíveis (7,25 Vs 9,0;  $p = 0,001$ )<sup>41</sup>. Os resultados sugerem existir uma ligação entre a virulência e a resistência em isolados de *E. coli*, corroborada pelo presente estudo

Importa realçar que a detecção dos factores de virulência foi efectuada em 45 isolados pertencentes ao clone1, o qual persiste no HSM durante 5 anos. Como já observado pelos dados clínicos dos doentes nos quais foi isolada *E coli* pertencendo a este clone (capítulo 3.3.1.1), os idosos parecem funcionar como veículo e/ou fonte de colonização, população na qual é frequente a existência de várias patologias concomitantes e um estado imunitário comprometido<sup>24,79</sup>.

A virulência de isolados de *E. coli* associados a infecções invasivas severas, como a bacteriémia, é influenciada pelo estado imunitário do hospedeiro, sendo que hospedeiros imunocomprometidos permitem uma infecção mais persistente com isolados menos virulentos<sup>101</sup>. Clermont *et al.* testou quatro isolados produtores de CTX-M15 num modelo animal de virulência extraintestinal, verificando que apesar do reduzido número de genes de virulência, todos os isolados produtores de CTX-M15 mataram os 10 ratinhos inoculados<sup>13</sup>. Os resultados obtidos neste estudo são concordantes com o descrito, sugerindo que a baixa virulência existente na amostra poderá conferir uma vantagem competitiva face a isolados virulentos, detectados e eliminados pelo sistema imunitário. Importa, de facto, não esquecer que o facto de isolados de *E. coli* resistentes apresentarem menos factores de virulência nada infere ao seu potencial de virulência *in vivo*. Esta percepção parece ser corroborada com o facto de 91,11% dos isolados em estudo apresentarem a presença do gene *ecpA*, o qual codifica para um factor de aderência que é crucial para a virulência da *E. coli* O157:H7 em humanos, mimetizando os isolados comensais e permitindo uma vantagem para a colonização e evasão do sistema imunitário<sup>78</sup>.

### 3.6.3. Determinação das ilhas de patogenicidade

O aumento do conhecimento sobre as ilhas de patogenicidade (PAIs), nomeadamente a sua estrutura, capacidade de mobilidade a factores de patogenicidade codificados por ela, constitui uma útil ferramenta para um melhor entendimento da evolução bacteriana e da interacção com a célula eucariota hospedeira<sup>84</sup>. No presente trabalho foram pesquisadas as ilhas de patogenicidade mais frequentemente associadas à amostra de isolados clínicos invasivos de *E. coli* descrita no ponto 3.6.2..

**Tabela 18.** Ilhas de Patogenicidade pesquisadas, seus determinantes de virulência<sup>86</sup> e resultados obtidos em 45 isolados representativos de *E. coli* produtoras de ESBL provenientes de bacteriemias do HSM.

Ilhas de patogenicidade (PAIs)	Características e determinantes de virulência codificados pelas PAIs	Nº de
		isolados (%)
		<b>n = 45 (100)</b>
I <sub>536</sub>	α- hemolisina, fímbrias, adesinas	0
II <sub>536</sub>	α- hemolisina, fímbrias do tipoP, adesina Hek, adesinas tipo-hemaglutininas	7 (15,56)
III <sub>536</sub>	Fímbrias do tipoS, sistema sideróforo de captação de ferro, hemoglobina protease tipoTSH, receptor tipo Heme-Hma	0
IV <sub>536</sub>	Ilha de elevada patogenicidade (HPI),yersiniabactina, síntese do sistema sideróforo	39 (86,67)
I <sub>CFT073</sub>	α- hemolisina, fímbria do tipoP e aerobactina	23 (51,11)
II <sub>CFT073</sub>	Fímbrias do tipoP e genes reguladores de ferro	20 (44,44)
I <sub>j96</sub>	α- hemolisina e fímbrias do tipoP	14 (31,11)
II <sub>j96</sub>	α- hemolisina, fímbrias do tipo P, factor citotóxico necrotizante ( <i>cnf</i> ), hemaglutinina resistente ao calor ( <i>hra</i> )	0

A presença da ilha de patogenicidade I<sub>CFT073</sub> e II<sub>CFT073</sub> foi detectada em 51,11% e 44,44% dos isolados, respectivamente, enquanto que 31,11% apresentaram a PAI I<sub>j96</sub> e 15,56% a PAI II<sub>536</sub>.

Em nenhum dos 45 isolados em estudo foram detectadas as ilhas de patogenicidade II<sub>J96</sub>, I<sub>536</sub> e III<sub>536</sub>.

A ilha de patogenicidade IV<sub>536</sub>, também designada como ilha de elevada patogenicidade (HPI) foi detectada em 86,67% dos isolados, tendo sido aquela que mais frequentemente foi encontrada. Estudos *in vivo* demonstraram que esta HPI contribui para a virulência de *E. coli* patogénicas extra-intestinais<sup>86, 87</sup>, embora outros estudos descrevam a sua presença nos isolados comensais (30-38%)<sup>84, 91</sup>, embora, como já verificámos no presente estudo, a definição de comensal não exclua a possibilidade de isolamento em infecções invasivas. Deste modo, estudos adicionais são requeridos para clarificar a importância da HPI.

O clone de *E. coli* produtor de CTX-M15 que se encontra já disseminado por vários países da Europa e África foi recentemente caracterizado por Clermont, O. *et al.*. Entre outras características referidas, o autor descreve que pertencem ao grupo filogenético B2, produzem biofilme e, apesar do baixo número de factores de virulência/ilhas de patogenicidade encontrados, apresentam a HPI, elevada resistência aos antibióticos e elevada virulência *in vivo*<sup>13</sup>. Por sua vez Carattoli, A. *et al.* descreve também uma elevada prevalência (25/28) de isolados produtores de CTX-M-15 em Roma, Itália, embora as ilhas de patogenicidade mais frequentemente encontradas tivessem sido a I<sub>CFT073</sub>, II<sub>CFT073</sub> e IV<sub>536</sub><sup>9</sup>, concordante com os resultados do presente estudo. Embora não esteja ainda totalmente esclarecido o papel clínico da presença de factores de virulência/ilhas de patogenicidade no genoma bacteriano<sup>86</sup>, os resultados obtidos parecem sugerir uma variabilidade geográfica condicionada pela pressão selectiva e/ou ambiente genético.

Importa, no entanto verificar o modo como as ilhas de patogenicidade se encontram distribuídas nos isolados (Tabela 19):

**Tabela 19.** Distribuição das combinações das Ilhas de Patogenicidade presentes nos isolados de *E. coli*.

Nº de PAIs	Nº isolados	Combinações de PAIs					
0	2	-					
1	10	IV <sub>536</sub>					
2	8	IV <sub>536</sub>	II <sub>CTF073</sub>				
	1	I <sub>536</sub>	II <sub>536</sub>				
	6	IV <sub>536</sub>	I <sub>CFT073</sub>				
3	1	I <sub>CFT073</sub>	II <sub>CTF073</sub>	I <sub>J96</sub>			
	4	IV <sub>536</sub>	I <sub>CFT073</sub>	I <sub>J96</sub>			
	2	IV <sub>536</sub>	II <sub>CTF073</sub>	II <sub>536</sub>			
	2	IV <sub>536</sub>	I <sub>CFT073</sub>	II <sub>CTF073</sub>			
4	5	IV <sub>536</sub>	I <sub>CFT073</sub>	II <sub>CTF073</sub>	I <sub>J96</sub>		
	2	I <sub>CFT073</sub>	I <sub>536</sub>	II <sub>536</sub>	I <sub>J96</sub>		
6	2	IV <sub>536</sub>	I <sub>CFT073</sub>	II <sub>CTF073</sub>	I <sub>536</sub>	I <sub>J96</sub>	II <sub>536</sub>

Quando observamos o modo como as PAIs se encontravam distribuídas nos isolados em estudo, verificamos que 60% dos isolados apresentam menos do que 3 PAIs em simultâneo. De facto, comparativamente a outros estudos<sup>84, 86</sup>, é notório o baixo número de ilhas de patogenicidade encontradas no genoma bacteriano dos isolados em estudo, possivelmente justificada pela resistência às fluoroquinolonas, as quais aparentemente induzem a perda parcial ou total das ilhas de patogenicidade<sup>91</sup>.

Sabate *et al.* refere que a PAI IV<sub>536</sub> foi a primeira a ser adquirida e a ser fixada no cromossoma, fazendo com que seja a mais estável<sup>84</sup>. De facto, também Middendorf *et al* demonstrou que a

PAI<sub>IV536</sub> apresenta elevada estabilidade, facto que pode explicar a sua elevada frequência<sup>57</sup>. O presente estudo parece corroborar este facto, uma vez que a PAI<sub>IV536</sub> se encontra em 72,72% (8/11) das combinações de PAIs encontradas nos isolados, sendo também a única que é encontrada sozinha, embora a sua presença esteja também frequentemente associada com a PAI I<sub>CFT073</sub>. A PAI II<sub>CFT073</sub> parece ter sido a terceira a ser adquirida, seguida pela PAI I<sub>j96</sub> e I<sub>536</sub>. Finalmente, PAI II<sub>536</sub> e III<sub>536</sub> parecem ter sido as últimas a ser adquiridas, um facto que poderá explicar o porquê de serem pouco comuns e encontradas exclusivamente em isolados altamente virulentos<sup>84</sup>. A consistência dos resultados obtidos por vários autores parecem de facto sugerir que a aquisição das PAIs pelos isolados de *E. coli* consiste num processo mecanismo programado e sequencial, cuja presença e prevalência de factores de virulência e ilhas de patogenicidade é amplamente influenciado pela resistência dos isolados<sup>36,57</sup>.

#### **3.6.4. Grupos Filogenéticos: relação entre os perfis de resistência, virulência e ilhas de patogenicidade**

Com o intuito de verificar uma possível associação entre o grupo filogenético, virulência e resistência, como anteriormente descrito por outros autores<sup>34, 39, 41, 43, 72, 73, 85</sup>, os resultados anteriormente obtidos foram agrupados de acordo com o grupo filogenético da amostra representativa estudada (Tabela 20).

**Tabela 20.** Distribuição dos perfis de resistência e virulência pelos grupos filogenéticos dos isolados de *E. coli*.

	Grupos Filogenéticos			
	Nº isolados (%)			
	<b>A</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>D</b>
	6 (100)	2 (100)	27 (100)	10 (100)
<b>Resistência</b>				
CIP	5 (83,33)	2 (100)	27(100)	10 (100)
GM	5 (83,33)	2 (100)	23 (85,19)	4 (40,00)
<b>Factores de Virulência</b>				
<i>pap</i>	0	0	0	0
<i>sfa</i>	0	0	0	0
<i>afa</i>	0	0	0	0
<i>fimH</i>	5 (83,33)	1 (50,00)	26 (96,39)	9 (90,00)
<i>hyl</i>	0	0	1	0
<i>cnf</i>	0	0	0	0
<i>iucC</i>	4 (66,67)	0	19 (70,37)	5 (50,00)
<i>ecpA</i>	5 (83,33)	1 (50,00)	26 (96,39)	9 (90,00)
<i>usp</i>	0	0	0	0
<b>Ilhas de Patogenicidade</b>				
PAI I 536	0	0	0	0
PAI II 536	1	0	6	0
PAI III 536	0	0	0	0
PAI IV 536	5	2	23	9
PAI I CFT073	1	1	16	5
PAI II CFT073	2	0	16	2
PAI I j96	1	0	13	0
PAI II j96	0	0	0	0

Tendo já verificado que os todos os isolados em estudo apresentam menor número de factores de virulência do que os descritos por outros autores<sup>84, 86</sup>, é possível perceber uma maior

distribuição dos FV pesquisados no grupo filogenético B2 comparativamente aos restantes, confirmada pela sua significância estatística ( $p < 0,05$ ). Os isolados pertencentes aos grupos filogenéticos A e D apresentam similar percentagem de factores de virulência, não existindo diferença estatística entre eles ( $p < 0,05$ ).

A totalidade dos isolados dos grupos filogenéticos B1, B2 e D apresentam resistência à ciprofloxacina (CIP), como é possível observar na Tabela 11. Também no que infere à gentamicina (GM) todos os grupos, com excepção do grupo D, apresentam mais de 80% dos isolados resistentes a este antibiótico (83,33%-100%). O grupo filogenético comensal A verifica uma igual percentagem de isolados resistentes a estes antibióticos (83,33%). Como é possível verificar, o perfil de resistência não se encontra restrito a grupos filogenéticos específicos, como amplamente tem sido descrito<sup>58</sup>, os quais usualmente associam os grupos B2 e D a perfis de menor resistência antimicrobiana.

Horcajada *et al.* descreve que dentro do Grupo B2, isolados resistentes às fluoroquinolonas demonstraram prevalências mais baixas de *papC*, *hlyA* e *cnfI* comparativamente aos isolados sensíveis ( $P < 0,001$ ), embora não se tenha detectado este contraste para a detecção de hemolisina e fímbria do tipoP. Estudos prévios referem que isolados resistentes às quinolonas apresentam menos FV do que os sensíveis<sup>35, 97</sup>, sendo que recentemente foi descrito que este fenómeno parece estar apenas associado a estirpes do grupo filogenético B2<sup>35</sup>, comportamento não identificado no presente estudo. De facto, os resultados obtidos sugerem que para situações de bacteriemia causada por isolados multirresistentes de *E. coli* produtores de ESBL não é possível antever a sua virulência ou capacidade de patogenicidade pela associação ao grupo filogenético.

O facto de serem os isolados do grupo B2 e D os maioritariamente envolvidos em processos infecciosos levou Escobar *et al.* a estudar a distribuição de 17 factores de virulência numa colecção de 98 isolados representativos de *Escherichia coli* patogénicas e comensais. O autor sugere que a virulência se deve ao *background* genético o qual permite numerosos eventos de transferência horizontal, responsáveis pela aquisição e expressão de diferentes factores de virulência<sup>22</sup>. Também Piatti *et al.* infere que as mutações que conferem resistência às quinolonas e fluoroquinolonas parecem requerer um *background* genético específico, não estando este facto correlacionado com os grupos filogenéticos, embora o evento mutacional em si pareça afectar a expressão de determinados factores de virulência, pelo menos no complexo e prevalente grupo B2<sup>72</sup>. Surgem, no entanto, estudos contraditórios que inferem que a associação do grupo filogenético B2 à virulência extraintestinal é atribuível à abundância de factores de virulência que contém e não a um *background* genético definido<sup>40</sup>, permanecendo, no entanto, por esclarecer a aparente compatibilidade entre o grupo filogenético B2 e os genes de virulência, também verificado no presente estudo.

As clássicas comparações entre isolados de populações comensais e extra-intestinais de *E. coli*, baseados em factores de virulência, demonstraram que o potencial de virulência destas estirpes em indivíduos saudáveis é mais baixo do que em indivíduos com ITU<sup>84</sup>. Russo, T.A. *et al.* sugere que a definição entre *E. coli* patogénicas e comensais deverá ser alvo de re-definição<sup>83</sup>. De facto, não é claro se todas as *E. coli* no tracto intestinal de indivíduos saudáveis devem ser considerados comensais, independentemente do seu grupo filogenético ou apenas os isolados do grupo A e B1. Permanece também por esclarecer se um isolado pertencente ao grupo A ou B1 de um indivíduo

com infecção do tracto urinário deve ser considerado um verdadeiro isolado patogénico ou apenas um isolado comensal que produz infecção num indivíduo imunocomprometido.

Johnson, J. *et al.* estudou 63 isolados de *E. coli* provenientes de diferentes patologias urinárias: pielonefrite, prostatite e cistite, caracterizando o grupo filogenético dos isolados e pesquisando a presença de 35 factores de virulência. O autor verificou que não havia diferença significativa na distribuição dos grupos filogenéticos pelas diferentes patologias, sugerindo deste modo que seria a distinta acumulação de factores de virulência que condicionaria a patogenicidade dos isolados e, conseqüentemente a evolução clínica<sup>42</sup>. Entre outros<sup>40</sup>, também Sannes, M.R. *et al.* comparou os isolados bacteriémicos de 63 idosos com 71 isolados rectais, verificando uma distribuição filogenética comum, embora os isolados do grupo filogenético B2 e D apresentassem uma virulência superior aos restantes grupos<sup>85</sup>. Ao analisarmos a distribuição filogenética dos factores de virulência em estudo nos isolados de *E. coli* de bacteriémias, verificamos que apesar do grupo B2 ter sido o predominante, exibindo a maior concentração individual de FVs e contendo um maior número de clones virulentos, o mesmo comportamento foi detectado em outros grupos filogenéticos, nomeadamente o A e D.

Jaureguy, F., *et al.* desenvolveu um estudo cohort prospectivo durante um ano, no qual seguiu todos os isolados provenientes de bacteriémia em 2 hospitais universitários em França. Através de uma análise multifactorial permitiu distinguir 2 populações: os do grupo filogenético B2 associados mais frequentemente a susceptibilidade a antibióticos, infecção da comunidade, provenientes do tracto urinário e de hospedeiros imunocompetentes. Os que pertencem ao grupo A, B1 ou D foram associados mais frequentemente à resistência aos antibióticos, infecção

nosocomial, origem não urinária e hospedeiros imunocomprometidos<sup>38</sup>. Embora não minimizando a importância do hospedeiro e da bactéria na severidade inicial na evolução para quadros de bacteriemia e sépsis, os resultados obtidos no presente estudo evidenciam uma supremacia do repertório de FV sobre o grupo filogenético na previsão do comportamento de patogenicidade. No entanto, aumenta a complexidade desta análise quando consideramos a multirresistência dos isolados, a qual parece ser determinante para o reduzido número de FV e PAIs detectadas.

De facto, considerando a diversidade de perfis observados em todos os níveis da árvore filogenética, é possível sugerir que diferentes percursos podem originar isolados de *E. coli* extraintestinais e que a evolução destas estirpes, envolve extensa transmissão horizontal de FV e que o processo de remodelação dos factores de virulência e ilhas de patogenicidade é altamente activo e ocorre de forma contínua<sup>44</sup>.

## **CAPÍTULO 4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS**

#### 4. Conclusões e Perspectivas Futuras

Os resultados reunidos no presente trabalho permitiriam caracterizar os isolados clínicos de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBL) provenientes de bacteriémias, obtidos ao longo de 7 anos (2000-2007) no Hospital de Santa Maria (HSM), Lisboa, no que infere aos determinantes genéticos associados à resistência e virulência.

Em 2007, no último ano deste estudo, a frequência de isolamento de estirpes de *E. coli* e *Klebsiella* spp. produtoras de ESBL em situações invasivas foi de 9,9% e 10,3%, respectivamente, valores concordantes com os mais elevados da Europa, nomeadamente em França<sup>19</sup>, Itália<sup>54</sup> e Espanha<sup>64</sup>. A preocupante tendência crescente de isolamento, aliada aos índices de resistência encontrados para aos antibióticos gentamicina e ciprofloxacina superiores a 70%, usualmente alternativas clínicas aos  $\beta$ -lactâmicos, constituem um grande desafio terapêutico, alertando para uma necessidade urgente de medidas preventivas e de rigoroso controlo e monitorização destes isolados.

Dada influência dos plasmídeos como elementos móveis na transferência genética horizontal<sup>8</sup>, efectuou-se a caracterização do perfil de disseminação plasmídica, através da determinação dos grupos de incompatibilidade dos isolados em estudo. Os isolados de *E. coli* apresentaram uma média de 2,04 plasmídeos/isolado, tendo sido os plasmídeos com a origem de replicação grupo IncF, seguido do FIA e FIB os mais frequentemente encontrados. Por sua vez, os isolados de

*Klebsiella* spp apresentam um valor médio de 0,59 plasmídeos/isolado, tendo sido maioritariamente detectados os que apresentam a origem de replicação HII e P, inexistentes na *E. coli*. Os resultados são assim indicadores de uma superior capacidade de disseminação horizontal da *E. coli* e de uma especificidade plasmídica, não descrita até à data, e que sugere que os genes contidos nestes elementos genéticos móveis não são facilmente transmitidos entre estas espécies.

Os isolados de *Klebsiella* spp. demonstraram uma grande variabilidade genotípica, contrariamente à existência de um clone predominante nos isolados de *E. coli*, o qual persiste em diferentes serviços do hospital há 5 anos. Este clone é produtor da  $\beta$ -lactamase de espectro alargado CTX-M15 e pertence maioritariamente ao grupo filogenético B2, embora esteja também presente em isolados do grupo D, A e B1. Verifica-se, assim, que estirpes caracterizadas filogeneticamente como comensais podem ser isoladas em situações invasivas, sugerindo a potencial supremacia dos factores dependentes do hospedeiro no desenvolvimento da infecção e a revisão destes conceitos.

O clone predominante de *E. coli* apresenta as ilhas de patogenicidade IV<sub>536</sub>, I<sub>CFT073</sub> e II<sub>CFT073</sub>. Os padrões de virulência maioritariamente encontrados nos isolados deste clone corresponde à presença de apenas dois (*fimH*, *ecpA*) ou três (*fimH*, *ecpA*, *iucC*) dos nove factores de virulência pesquisados. Até à data apenas descrita na *E. coli* entero-hemorrágica O157:H7<sup>78</sup>, a EcpA surge no presente trabalho sempre associada à fímbria fimH, sugerindo uma acção combinada destes factores. Dada a descrição das suas funções<sup>41, 75, 78</sup> poder-se-à inferir que a fimH permite a adesão e invasão no epitélio vesical ou no enterócito actuando como causa primária da bacteriémia,

enquanto que a EcpA possibilita a “fuga” ao sistema imunitário e, conseqüentemente a sua persistência no hospedeiro.

De modo a aprofundar o conhecimento e a importância destes factores, estudos adicionais em culturas celulares de células vesicais e intestinais deverão ser efectuados. Importa também perceber o serotipo do clone descrito, verificando se se trata do clone O25:H4-ST131 recentemente descrito como internacionalmente emergente<sup>62</sup>.

A emergência de isolados multirresistentes produtores de ESBL parece ser resultado de complexas interacções entre o perfil genético dos isolados e as pressões selectivas dos nichos ecológicos nos quais se incluem. Dada a crescente importância dos isolados de *Klebsiella* spp em situações severas e invasivas no ambiente hospitalar<sup>70</sup> e os escassos estudos referentes a esta espécie, é imperiosa a promoção de estudos mais detalhados sobre a sua virulência, capacidade invasiva, capacidade de persistência e disseminação.

## **CAPÍTULO 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA**

## 5. Referências Bibliográficas

1. Ahmed, N., Dobrindt, U., Hacker, J. & Hasnain, S. E. (2008). Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. *Nat Rev Microbiol* **6**, 387-394.
2. Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1-14.
3. Bou, G., M. Cartelle, M. Tomas, D. Canle, F. Molina, R. Moure, J. M. Eiros e A. Guerrero. (2002). Identification and Broad Dissemination of the CTX-M-14  $\beta$ -Lactamase in Different *Escherichia coli* Strains in the Northwest Area of Spain. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 4030-4036.
4. Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* **14**, 933-951, table of contents.
5. Branger, C., Zamfir, O., Geoffroy, S., Laurans, G., Arlet, G., Thien, H. V., Gouriou, S., Picard, B. & Denamur, E. (2005). Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg Infect Dis* **11**, 54-61.
6. Brigante, G., F. Luzzaro, M. Perilli, G. Lombardi, A. Coli, G. M. Rossolini, G. Amicosante e A. Toniolo (2005). Evolution of CTX-M-type  $\beta$ -lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients *International Journal of Antimicrobial Agents* **25**, 157-162.

7. Canton, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F. & Coque, T. M. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* **14 Suppl 1**, 144-153.
8. Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L. & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* **63**, 219-228.
9. Carattoli, A., Garcia-Fernandez, A., Varesi, P., Fortini, D., Gerardi, S., Penni, A., Mancini, C. & Giordano, A. (2008). Molecular epidemiology of Escherichia coli producing extended-spectrum beta-lactamases isolated in Rome, Italy. *J Clin Microbiol* **46**, 103-108.
10. Carattoli, A., Miriagou, V., Bertini, A., Loli, A., Colinon, C., Villa, L., Whichard, J. M. & Rossolini, G. M. (2006). Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. *Emerg Infect Dis* **12**, 1145-1148.
11. Cars, O., Molstad, S. & Melander, A. (2001). Variation in antibiotic use in the European Union. *Lancet* **357**, 1851-1853.
12. Clermont, O., Bonacorsi, S. & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4555-4558.
13. Clermont, O., Lavollay, M., Vimont, S., Deschamps, C., Forestier, C., Branger, C., Denamur, E. & Arlet, G. (2008). The CTX-M-15-producing Escherichia coli diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother* **61**, 1024-1028.
14. Conceicao, T., Brizio, A., Duarte, A., Lito, L. M., Cristino, J. M. & Salgado, M. J. (2005). First description of CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 477-478.
15. Coque, T. M., Baquero, F. & Canton, R. (2008). Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill* **13**.

16. Cordery, R. J., Roberts, C. H., Cooper, S. J., Bellinghan, G. & Shetty, N. (2008). Evaluation of risk factors for the acquisition of bloodstream infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in the intensive care unit; antibiotic management and clinical outcome. *J Hosp Infect* **68**, 108-115.
17. Cortajarena, A. L., Goni, F. M. & Ostolaza, H. (2003). A receptor-binding region in *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *J Biol Chem* **278**, 19159-19163.
18. Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L. & Maas, W. K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev* **52**, 375-395.
19. De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Bonnet, R. & Sirot, J. (2000). A 1998 survey of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in France. The French Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 3177-3179.
20. Diestra, K., Juan, C., Curiao, T., Moya, B., Miro, E., Oteo, J., Coque, T. M., Perez-Vazquez, M., Campos, J., Canton, R., Oliver, A. & Navarro, F. (2009). Characterization of plasmids encoding blaESBL and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* **63**, 60-66.
21. Eils, R. iGEM (International Genetically Engineered Machines Competition), in [http://2008.igem.org/Team:Heidelberg/Project/Killing\\_I](http://2008.igem.org/Team:Heidelberg/Project/Killing_I) accessed on 12 May 2009.
22. Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Anne-Béatrice Blanc-Potard, Hung Bui, Chantal Le Bouguéneq & Denamur, E. (2004). A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli* *Molecular Biology and Evolution* **21**, 1085–1094.

23. Falcão, J. M., Pisco, A. M., Simões, J. A. Falcão, A. Pimenta, Z. P. & Nunes, B. (2003). Prescrição de antibacterianos em Clínica Geral: Um estudo na Rede Médicos-Sentinela. *Rev Port Clin Geral* **19**, 315-329.
24. Fluit, A. C., Jones, M. E., Schmitz, F. J., Acar, J., Gupta, R. & Verhoef, J. (2000). Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. *Clin Infect Dis* **30**, 454-460.
25. Garcia-Martinez, J., Martinez-Murcia, A. J., Rodriguez-Valera, F. & Zorraquino, A. (1996). Molecular evidence supporting the existence of two major groups in uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **14**, 231-244.
26. Giske, C. G., Sundsfjord, A. S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D. L., Canton, R. & Walsh, T. R. (2009). Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother* **63**, 1-4.
27. Goosens, H. (2003). Antibiotic resistance in Europe *The Lancet Infectious Diseases* **3**, 398.
28. Gori, A., Espinasse, F., Deplano, A., Nonhoff, C., Nicolas, M. H. & Struelens, M. J. (1996). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified DNA polymorphism analysis for typing extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **34**, 2448-2453.
29. Grundmann, H. EARSS Annual Report 2007. *European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)*. 2007. Disponível em: <http://www.earss.rivm.nl> (acedido a 7/Março/2009).

30. Grundmann HJ, T. K., Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Maher M, Seifert H, Vaneechoutte M. (1997). Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* **35**, 3071-3077.
31. Hanberger, H., Garcia-Rodriguez, J. A., Gobernado, M., Goossens, H., Nilsson, L. E. & Struelens, M. J. (1999). Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. French and Portuguese ICU Study Groups. *Jama* **281**, 67-71
32. Harjai, K., Chhibber, S., Bhau, L. N. & Sharma, S. (1994). Introduction of plasmid carrying an incomplete set of genes for aerobactin production alters virulence of *Escherichia coli* HB101. *Microb Pathog* **17**, 261-270
33. Henquell, C., Sirot, D., Chanal, C., De Champs, C., Chatron, P., Lafeuille, B., Texier, P., Sirot, J. & Cluzel, R. (1994). Frequency of inhibitor-resistant TEM beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in France. *J Antimicrob Chemother* **34**, 707-714.
34. Herzer, P. J., Inouye, Inouye & Whittam (1990). Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**, 6175-6181.
35. Horcajada, J. P., Soto, S., Gajewski, A., Smithson, A., Jimenez de Anta, M. T., Mensa, J., Vila, J. & Johnson, J. R. (2005). Quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* strains from phylogenetic group B2 have fewer virulence factors than their susceptible counterparts. *J Clin Microbiol* **43**, 2962-2964.
36. Houdouin, V., Bonacorsi, S., Bidet, P., Bingen-Bidois, M., Barraud, D. & Bingen, E. (2006). Phylogenetic background and carriage of pathogenicity island-like domains in relation to

antibiotic resistance profiles among Escherichia coli urosepsis isolates. *J Antimicrob Chemother* **58**, 748-751.

37. Hugonnet, S., Sax, H., Eggimann, P., Chevrolet, J. C. & Pittet, D. (2004). Nosocomial bloodstream infection and clinical sepsis. *Emerg Infect Dis* **10**, 76-81.

38. Jauregui, F., Carbonnelle, E., Bonacorsi, S., Clec'h, C., Casassus, P., Bingen, E., Picard, B., Nassif, X. & Lortholary, O. (2007). Host and bacterial determinants of initial severity and outcome of Escherichia coli sepsis. *Clin Microbiol Infect* **13**, 854-862.

39. Jauregui, F., Landreau, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbonnelle, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., Picard, B., Nassif, X. & Brisse, S. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic Escherichia coli strains. *BMC Genomics* **9**, 560.

40. Johnson, J. R. & Kuskowski, M. (2000). Clonal origin, virulence factors, and virulence. *Infect Immun* **68**, 424-425.

41. Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Gajewski, A., Sahn, D. F. & Karlowsky, J. A. (2004). Virulence characteristics and phylogenetic background of multidrug-resistant and antimicrobial-susceptible clinical isolates of Escherichia coli from across the United States, 2000-2001. *J Infect Dis* **190**, 1739-1744.

42. Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Gajewski, A., Soto, S., Horcajada, J. P., Jimenez de Anta, M. T. & Vila, J. (2005). Extended virulence genotypes and phylogenetic background of Escherichia coli isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J Infect Dis* **191**, 46-50.

43. Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Owens, K., Gajewski, A. & Winokur, P. L. (2003). Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or

extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. *J Infect Dis* **188**, 759-768.

44. Johnson, J. R., O'Bryan, T. T., Kuskowski, M. & Maslow, J. N. (2001). Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and papA alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse-source bacteremia. *Infect Immun* **69**, 5363-5374.

45. Johnson, T. J., Wannemuehler, Y. M., Johnson, S. J., Logue, C. M., White, D. G., Doetkott, C. & Nolan, L. K. (2007). Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1976-1983.

46. Kahlmeter, G. (2008). Breakpoints for intravenously used cephalosporins in Enterobacteriaceae—EUCAST and CLSI breakpoints *Clinical Microbiology & Infection* **14**, 169-174.

47. Kang, C. I., Kim, S. H., Park, W. B., Lee, K. D., Kim, H. B., Kim, E. C., Oh, M. D. & Choe, K. W. (2005). Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 760-766.

48. Kang, C. I., Kim, S. H., Park, W. B., Lee, K. D., Kim, H. B., Kim, E. C., Oh, M. D. & Choe, K. W. (2004). Bloodstream infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for mortality and treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 4574-4581.

49. Karisik, E., Ellington, M. J., Livermore, D. M. & Woodford, N. (2008). Virulence factors in *Escherichia coli* with CTX-M-15 and other extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* **61**, 54-58.

50. Landraud, L., Gibert, M., Popoff, M. R., Boquet, P. & Gauthier, M. (2003). Expression of *cnf1* by *Escherichia coli* J96 involves a large upstream DNA region including the *hlyCABD* operon, and is regulated by the RfaH protein. *Mol Microbiol* **47**, 1653-1667.
51. Lipsky, B. A., Berendt, A. R., Deery, H. G., Embil, J. M., Joseph, W. S., Karchmer, A. W., LeFrock, J. L., Lew, D. P., Mader, J. T., Norden, C. & Tan, J. S. (2004). Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis* **39**, 885-910.
52. Livermore, D. M. & Hawkey, P. M. (2005). CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *J Antimicrob Chemother* **56**, 451-454.
53. Livermore, D. M., Hope, R., Brick, G., Lillie, M. & Reynolds, R. (2008). Non-susceptibility trends among Enterobacteriaceae from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001–06 *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008 **62**, ii41-ii54.
54. Luzzaro, F., Mezzatesta, M., Mugnaioli, C., Perilli, M., Stefani, S., Amicosante, G., Rossolini, G. M. & Toniolo, A. (2006). Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. *J Clin Microbiol* **44**, 1659-1664.
55. Marcade, G., Deschamps, C., Boyd, A., Gautier, V., Picard, B., Branger, C., Denamur, E. & Arlet, G. (2009). Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* **63**, 67-71.
56. Martinez, J. J., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Pinkner, J. S. & Hultgren, S. J. (2000). Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *Embo J* **19**, 2803-2812.
57. Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G. & Hacker, J. (2004). Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *J Bacteriol* **186**, 3086-3096.

58. Moreno, E., Prats, G., Sabate, M., Perez, T., Johnson, J. R. & Andreu, A. (2006). Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **57**, 204-211.
59. Moubareck, C., Daoud, Z., Hakime, N. I., Hamze, M., Mangeney, N., Matta, H., Mokhbat, J. E., Rohban, R., Sarkis, D. K. & Doucet-Populaire, F. (2005). Countrywide spread of community- and hospital-acquired extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-15)-producing Enterobacteriaceae in Lebanon. *J Clin Microbiol* **43**, 3309-3313.
60. Mulvey, M. A. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **4**, 257-271.
61. Mulvey, M. A., Lopez-Boado, Y. S., Wilson, C. L., Roth, R., Parks, W. C., Heuser, J. & Hultgren, S. J. (1998). Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **282**, 1494-1497.
62. Nicolas-Chanoine, M. H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M. P., Canica, M. M., Park, Y. J., Lavigne, J. P., Pitout, J. & Johnson, J. R. (2008). Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* **61**, 273-281.
63. Oteo, J., Campos, J., Lazaro, E., Cuevas, O., Garcia-Cobos, S., Perez-Vazquez, M. & de Abajo, F. J. (2008). Increased amoxicillin-clavulanic acid resistance in *Escherichia coli* blood isolates, Spain. *Emerg Infect Dis* **14**, 1259-1262.
64. Oteo, J., Garduno, E., Bautista, V., Cuevas, O. & Campos, J. (2008). Antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Spain: analyses of 718 invasive isolates from 35 hospitals and report of one outbreak caused by an SHV-12-producing strain. *J Antimicrob Chemother* **61**, 222-224.

65. Oteo, J., Lazaro, E., de Abajo, F. J., Baquero, F. & Campos, J. (2005). Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, Spain. *Emerg Infect Dis* **11**, 546-553.
66. Otto, G., Magnusson, M., Svensson, M., Braconier, J. & Svanborg, C. (2001). pap genotype and P fimbrial expression in *Escherichia coli* causing bacteremic and nonbacteremic febrile urinary tract infection. *Clin Infect Dis* **32**, 1523-1531.
67. Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* **18**, 657-686.
68. Paterson, D. L., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Yeiser, B., Bonomo, M. D., Rice, L. B. & Bonomo, R. A. (2003). Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3554-3560.
69. Paterson, D. L., Ko, W. C., Von Gottberg, A., Casellas, J. M., Mulazimoglu, L., Klugman, K. P., Bonomo, R. A., Rice, L. B., McCormack, J. G. & Yu, V. L. (2001). Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* **39**, 2206-2212.
70. Paterson, D. L., Ko, W. C., Von Gottberg, A., Mohapatra, S., Casellas, J. M., Goossens, H., Mulazimoglu, L., Trenholme, G., Klugman, K. P., Bonomo, R. A., Rice, L. B., Wagener, M. M., McCormack, J. G. & Yu, V. L. (2004). International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial infections. *Ann Intern Med* **140**, 26-32.

71. Pfaller, M. A., Acar, J., Jones, R. N., Verhoef, J., Turnidge, J. & Sader, H. S. (2001). Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. *Clin Infect Dis* **32 Suppl 2**, S156-167.
72. Piatti, G., Mannini, A., Balistreri, M. & Schito, A. M. (2008). Virulence factors in urinary Escherichia coli strains: phylogenetic background and quinolone and fluoroquinolone resistance. *J Clin Microbiol* **46**, 480-487.
73. Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahim, N., Bingen, E., Elion, J. & Denamur, E. (1999). The Link between Phylogeny and Virulence in Escherichia coli Extraintestinal Infection. *Infection and Immunity* **67**, 546-553.
74. Pitout, J. D. & Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* **8**, 159-166.
75. Pitout, J. D., Laupland, K. B., Church, D. L., Menard, M. L. & Johnson, J. R. (2005). Virulence factors of Escherichia coli isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4667-4670.
76. Pitout, J. D., Nordmann, P., Laupland, K. B. & Poirel, L. (2005). Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother* **56**, 52-59.
77. Reimer, L. G., Wilson, M. L. & Weinstein, M. P. (1997). Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* **10**, 444-465.
78. Rendon, M. A. e. a. (2007). Commensal and pathogenic Escherichia coli use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 10637-10642.

79. Reynolds, R., Potz, N., Colman, M., Williams, A., Livermore, D. & MacGowan, A. (2004). Antimicrobial susceptibility of the pathogens of bacteraemia in the UK and Ireland 2001-2002: the BSAC Bacteraemia Resistance Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother* **53**, 1018-1032.
80. Rijavec, M., Starcic Erjavec, M., Ambrozic Avgustin, J., Reissbrodt, R., Fruth, A., Krizan-Hergouth, V. & Zgur-Bertok, D. (2006). High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups. *Curr Microbiol* **53**, 158-162.
81. Rodriguez-Bano, J., Navarro, M. D., Romero, L., Muniain, M. A., de Cueto, M., Rios, M. J., Hernandez, J. R. & Pascual, A. (2006). Bacteremia due to extended-spectrum beta -lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clin Infect Dis* **43**, 1407-1414.
82. Rodriguez-Bano, J., Navarro, M. D., Romero, L., Muniain, M. A., Perea, E. J., Perez-Cano, R., Hernandez, J. R. & Pascual, A. (2006). Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of nosocomial infection or colonization: implications for control. *Clin Infect Dis* **42**, 37-45.
83. Russo, T. A. & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* **181**, 1753-1754.
84. Sabate, M., Moreno, E., Perez, T., Andreu, A. & Prats, G. (2006). Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin Microbiol Infect* **12**, 880-886.

85. Sannes, M. R., Kuskowski, M. A., Owens, K., Gajewski, A. & Johnson, J. R. (2004). Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *J Infect Dis* **190**, 2121-2128.
86. Schmidt, H. & Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **17**, 14-56.
87. Schubert, S., Picard, B., Gouriou, S., Heesemann, J. & Denamur, E. (2002). *Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Infect Immun* **70**, 5335-5337.
88. Sherley, M., Gordon, D. M. & Collignon, P. J. (2003). Species differences in plasmid carriage in the Enterobacteriaceae. *Plasmid* **49**, 79-85.
89. Sligl, W., Taylor, G. & Brindley, P. G. (2006). Five years of nosocomial Gram-negative bacteremia in a general intensive care unit: epidemiology, antimicrobial susceptibility patterns, and outcomes. *Int J Infect Dis* **10**, 320-325.
90. Solomkin, J. S., Mazuski, J. E., Baron, E. J., Sawyer, R. G., Nathens, A. B., DiPiro, J. T., Buchman, T., Dellinger, E. P., Jernigan, J., Gorbach, S., Chow, A. W. & Bartlett, J. (2003). Guidelines for the selection of anti-infective agents for complicated intra-abdominal infections. *Clin Infect Dis* **37**, 997-1005.
91. Soto, S. M., Jimenez de Anta, M. T. & Vila, J. (2006). Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or -independent pathways, respectively. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 649-653.
92. Sotto, A., De Boever, C. M., Fabbro-Peray, P., Gouby, A., Sirot, D. & Jourdan, J. (2001). Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients with urinary tract infections: a prospective study. *J Clin Microbiol* **39**, 438-444.

93. Suzuki, S., Shibata, N., Yamane, K., Wachino, J., Ito, K. & Arakawa, Y. (2009). Change in the prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J Antimicrob Chemother* **63**, 72-79.
94. Tewari, R., Ikeda, T., Malaviya, R., MacGregor, J. I., Little, J. R., Hultgren, S. J. & Abraham, S. N. (1994). The PapG tip adhesin of P fimbriae protects *Escherichia coli* from neutrophil bactericidal activity. *Infect Immun* **62**, 5296-5304.
95. Tumbarello, M., Sanguinetti, M., Montuori, E., Trecarichi, E. M., Posteraro, B., Fiori, B., Citton, R., D'Inzeo, T., Fadda, G., Cauda, R. & Spanu, T. (2007). Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 1987-1994.
96. Usein, C. R., Damian, M., Tatu-Chitoiu, D., Capusa, C., Fagaras, R., Tudorache, D., Nica, M. & Le Bouguenec, C. (2001). Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. *J Cell Mol Med* **5**, 303-310.
97. Vila, J., Simon, K., Ruiz, J., Horcajada, J. P., Velasco, M., Barranco, M., Moreno, A. & Mensa, J. (2002). Are quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent? *J Infect Dis* **186**, 1039-1042.
98. Waters, V. L. (1999). Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Front Biosci* **4**, D433-456.
99. Wikler, M., Bush, K., Cockerill, F., Dudley, M., Eliopoulos, G., Hardy, D., Hecht, D., Hindler, J., Patel, J. B., Powell, M., Turnidge, J., Weinstein, M. P. & Zimmer, B. L. (2008). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* **28**, 0273-3099.

100. Wong-Beringer, A. (2001). Therapeutic challenges associated with extended-spectrum, beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmacotherapy* **21**, 583-592.
101. Wullt, B. (2003). The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. *Int J Antimicrob Agents* **21**, 605-621.
102. Yamamoto, S., Nakano, M., Terai, A., Yuri, K., Nakata, K., Nair, G. B., Kurazono, H. & Ogawa, O. (2001). The presence of the virulence island containing the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. *J Urol* **165**, 1347-1351.
103. Yu, V. L., Hansen, D. S., Ko, W. C., Sagnimeni, A., Klugman, K. P., von Gottberg, A., Goossens, H., Wagener, M. M. & Benedi, V. J. (2007). Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. *Emerg Infect Dis* **13**, 986-993.
104. Zahar, J. R., Lecuit, M., Carbonnelle, E., Ribadeau-Dumas, F., Nassif, X. & Lortholary, O. (2007). Is it time to reconsider initial antibiotic treatment strategies for severe urinary tract infections in Europe? *Clinical Microbiology and Infection* **13**, 219-221.

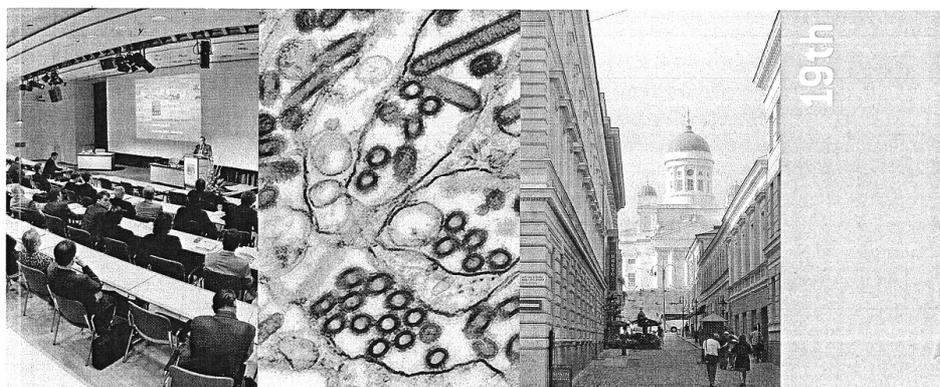
**ANEXO 1. PROGRAMA FINAL DO 19º EUROPEAN CONGRESS OF CLINICAL  
MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES (ECCMID)**



Final Programme  
European Congress of  
Clinical Microbiology  
and Infectious Diseases

**Helsinki, Finland  
16–19 May 2009**

**ECCMID**



Poster Sessions

Sunday, 17 May

- P1185** Risk factors for catheter-related colonization and catheter-related bloodstream infection in chronic haemodialysis patients with cuffed tunneled central venous catheters  
A. Aguinaga\*, J.L. del Pozo, N. García-Fernández, A. Serrera, M. Alonso, F. Guillén-Grima, J. Leiva (Pamplona, ES)
- P1186** 30-day mortality in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* bloodstream infection in a Leicester cohort of patients; Panton-Valentine leukocidin gene prevalence in the same cohort  
S. Sharma\*, D. Jenkins (Leicester, UK)
- P1187** Risk factors for methicillin resistance and factors associated with in-hospital mortality during *Staphylococcus aureus* blood stream infection: an observational study  
M. Revest, P. Tattevin\*, P.Y. Donnio, F. Fily, A. Cady, C. Arvieux, Y. Le Tulzo, C. Michelet (Rennes, FR)
- P1188** Risk factors and outcome of carbapenem resistant Gram-negative bacteraemia in critically ill patients  
M. Pratikaki, E. Platsouka\*, C. Routsis, C. Sotiropoulou, C. Roussos, O. Paniara (Athens, GR)
- P1189** Nosocomial bacteraemia due to Gram-negative bacilli: risk factors for mortality  
M.G. Gözel, A. Erbay\*, H. Bodur, S.S. Eren, N. Balaban (Ankara, TR)
- P1190** Nosocomial versus community-acquired bloodstream infections in hospitalized patients  
M. Kati, M. Kompoti\*, S. Drimis, O. Zarkotou, C. Kopsari, K. Dagalaki, D. Voutsinas (Athens, GR)
- P1191** Incidence, clinical, microbiological features and outcome of bloodstream infections in patients undergoing haemodialysis  
D. Kofteridis, M. Fysaraki, A. Valachis, M. Christofaki\*, I. Aristeidou, C. Mattheou, E. Daphnis, G. Samonis (Heraklion Crete, GR)
- P1192** Nosocomial bloodstream infections in neurosurgical patients. A 5-year study  
P. Tsitsopoulos, E. Iosifidis\*, C. Antachopoulos, I. Anagnostopoulos, M. Tsivitanidou, E. Roilides, P. Tsitsopoulos (Thessaloniki, GR)
- P1193** Enterococcal bacteraemia in a Swiss tertiary-care hospital: epidemiologic risk factors and outcome  
U. von Both\*, R. Walti, C. Ruef (Zurich, CH)
- P1194** Growth inhibition of micro-organisms involved in catheter-related infections by an antimicrobial transparent IV dressing containing chlorhexidine gluconate  
D.L. Schwab, L.K. Olson, M.E. Palka-Santini\* (St. Paul, US; Neuss, DE)
- 
- 13.30 – 14.30** ESBLs, AmpCs & others in Enterobacteriaceae: genes, plasmids & clones – part 2
- 
- P1195** Heterogeneous population structure by MLST of extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates  
A. Valverde\*, T.M. Coque, L. Martinez-Martinez, F. Baquero, R. Canton (Madrid, Santander, ES)
- P1196** Ciprofloxacin-resistant and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* from extra-intestinal infections in Italy  
M. Cerquetti\*, M. Giufrè, A. Garcia-Fernández, M. Accogli, D. Fortini, I. Luzzi, A. Carattoli (Rome, IT)
- P1197** Replicon typing of plasmids from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase  
C. Caneiras, F. Nunes, L. Lito, J. Melo Cristino, M. Salgado, A. Duarte\* (Lisbon, PT)
- P1198** CTX-M-15 flanked by ISEcp1 and orf477 is the most frequent ESBL type in *E. coli* and *K. pneumoniae* from Bochum, Germany  
M. Kaase\*, Y. Peters, F. Szabados, A. Anders, T. Sakinc, S. Gatermann (Bochum, DE)
- P1199** Diversity of CTX-M gene environments in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* nosocomial strains isolated from Russia  
N. Fursova\*, S. Pryamchuk, I. Abaev, N. Shishkova, E. Pecherskikh, A. Kruglov, S. Sidorenko, E. Svetoch, L. Weigel, J. Rasheed (Obolensk, Moscow, RU; Atlanta, US)
- P1200** Characterization of IncHI2 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamase genes  
A. García-Fernández\*, A. Carattoli (Rome, IT)
- P1201** Dispersal and persistence of TEM-4 in Spain: a plasmid-clone paradigm  
Á. Novais\*, R. Cantón, A. Valverde, F. Baquero, T.M. Coque (Madrid, ES)
- P1202** Updated epidemiology of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacter* isolates in a university hospital in Madrid, Spain [2001–2007]  
R. Paniagua\*, A. Valverde, F. Baquero, T.M. Coque, R. Cantón (Madrid, ES)

Poster Sessions

Sunday, 17 May

- 13.30 – 14.30** Central nervous system infections
- P1221** Implementation of adjunctive dexamethasone improves outcome in pneumococcal meningitis  
M.C. Brouwer\*, J. de Gans, S.G.B. Heckenberg, L. Spanjaard, D. van de Beek (Amsterdam, NL)
- P1222** Central nervous system involvement is common in acute Puumala virus infection  
S.-M. Mähönen\*, T. Sironen, O. Vapalahti, E. Pääkkö, A. Karttunen, N. Hautala, V. Glumoff, O. Vainio, H. Kauma, A. Vaheri, A. Plyusnin, T. Hautala (Oulu, Helsinki, FI)
- P1223** In vitro comparison of bacterial permeability of different epidural catheter filters  
A. Sener\*, Y. Erkin, A. Tasdogan, E. Dokumaci, Z. Elar (Izmir, Canakkale, TR)
- P1224** High doses of cefotaxime for cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis in adults. A 19-year experience  
I. Cabello\*, C. Cabellos, F. Tubau, R. Verdaguier, J. Liñares, F. Gudiol, P. Viladrich (L'Hospitalet de Llobregat, ES)
- P1225** Models of predicting the risk of brain herniation in bacterial meningitis  
C.N. Meyer, S. Augustesen\* (Roskilde, Holbæk, DK)
- P1226** Brain herniation and the use of CT-scanning in acute bacterial meningitis  
C.N. Meyer\*, S. Augustesen (Roskilde, Holbæk, DK)
- P1227** Laboratory predictors of meningitis in scrub typhus  
D.M. Kim\* (Gwang-Joo, KR)
- P1228** Meningococcal meningitis: a review of laboratory features during an 8-year period in a general hospital  
P Giannopoulou, N. Charalambaki, I. Grafakos, A. Kyraisa, G. Tzanakaki, J. Kremastinou, E. Trikka-Graphakos\* (Athens, GR)
- P1229** *Listeria monocytogenes* meningitis: clinical characteristics and outcomes  
O. Dzipova\*, J. Benes, S. Polivkova (Prague, CZ)
- 13.30 – 14.30** Pathogenesis of infections caused by Gram-negative bacteria and mycobacteria
- P1230** Fibronectin stimulates *Escherichia coli* phagocytosis by microglial cells  
S. Ribes\*, S. Ebert, T. Regen, N. Adam, S. Bunkowski, U.K. Hanisch, S. Hammerschmidt, R. Nau (Göttingen, Greifswald, DE)
- P1231** A recombination hotspot with several genomic islands and a high number of putative pili operons in the chromosome of an epidemic *Enterobacter hormaechei*  
A. Paauw, M.A. Leverstein-van Hall\*, J. Verhoef, A.C. Fluit (Utrecht, NL)
- P1232** The siderophore yersiniabactin produced by the high-pathogenicity island of Enterobacteriaceae reduces the oxidative stress response of polymorphonuclear leukocytes  
A. Paauw, M.A. Leverstein-van Hall\*, J. Verhoef, A.C. Fluit (Utrecht, NL)
- P1233** The genotoxin producing *E. coli* in the intestinal microbiota; a new view on commensalism  
F.L. Nowrouzian\* (Gothenburg, SE)
- P1234** The influence of some probiotic cultures supernatants on the growth rate and virulence expression of several selected enteroaggregative *E. coli* clinical strains  
V. Lazar, Y. Miyazaki, T. Hanawa, M.C. Chifiriuc, L.M. Ditu, L. Marutescu\*, C. Bleotu, S. Kamiya (Bucharest, RO; Tokyo, JP)
- P1235** Low virulence associated with fluoroquinolone resistance of uropathogenic *Escherichia coli* strains  
J. Vranes\*, I. Herljevic, M. Senjug, I. Butic, M. Anusic, T. Marijan, V. Leskovic, A. Mlinaric-Dzepina (Zagreb, HR)
- P1236** Endemic clone *Escherichia coli* harboring ECP common pilus versus an outbreak clone in a patient from a hospital, Lisbon  
F. Nunes\*, T. Amares, L. Lito, J. Melo Cristino, M. Jose Salgado, M. Santos, A. Duarte (Lisbon, PT)
- P1237** Potential role of *Escherichia coli* common pilus in persistence of clinical isolates producing extended-spectrum beta-lactamase from bacteraemia and urinary tract infection  
C. Caneiras, F. Nunes, J. Pissarra\*, L. Lito, J. Melo Cristino, M. Jose Salgado, A. Duarte (Lisbon, PT)
- P1238** Influence of glycosaminoglycans on *Proteus mirabilis*-induced urolithiasis  
A. Torzewska\*, A. Rozalski (Lodz, PL)
- P1239** Heat shock-induced phage shock protein A increases *Salmonella typhimurium* virulence in BALB/c mice  
N. Ordouzadeh\*, A. Shoaie Hassani (Tehran, Fars, IR)

**ANEXO 2. RESUMO DA COMUNICAÇÃO** “Replicon typing of plasmids from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase”

**Replicon typing of plasmids from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum b-lactamase**

C. Caneiras<sup>a</sup>, F. Nunes<sup>a</sup>, L. Lito<sup>b</sup>, J. Melo-Cristino<sup>b</sup>, M. Salgado<sup>b</sup> and A. Duarte<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Lisboa, Av Forças Armadas 1649-019, Lisboa, Portugal

<sup>b</sup>Laboratory of Microbiology, Hospital de Santa Maria, Faculty of Medicine, University of Lisboa, Lisboa, Portugal

**Objectives:** The aim of this study was to investigate the relatedness of replicons involved in the emergence and spread of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* carrying the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene. **Methods:** *E. coli* (n= 30) and *K. pneumoniae* (n=16) representative clinical isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum b-lactamases (ESBLs) were collected between 2001 and 2007 in a Hospital Santa Maria, in Lisboa. Plasmid replicons were determined using the PCR-based replicon typing scheme described by Carattoli et al (2005) with specific primers for 18 plasmid replicons. **Results:** Among the *E. coli* isolates the most frequent plasmid incompatibility group was Inc F 73.3% (22/30) with FI A and FI B replicons found on two and four isolates, respectively. Several other combinations involving F replicon were found, namely A/C, II, N and Y plasmid replicons. In *K. pneumoniae* clinical isolates were found only the IncHII plasmid incompatibility group (10/16, 62.5%). The remaining 6 isolates were negative for all the replicons tested. **Conclusions:** In *E. coli* isolates the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> genes are carried by plasmid incompatibility group Inc F. Overall, it is important to note a high degree of variability in plasmid profiles observed among 30 *E. coli* isolates, with 13 different combinations. In 16 *K. pneumoniae* CTX-M-15 ESBL carried the IncHII replicons and none belonged to the IncF group. Despite the critical role of plasmids in horizontal gene transfer, this study has suggested that the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> genes cannot be readily transmitted from *E. coli* to *K. pneumoniae*.

**(3) Keywords: plasmid, replication controls, ESBL producers**

**ANEXO 3. RESUMO DA COMUNICAÇÃO** “Potential role of *Escherichia coli* common pilus in persistence of clinical isolates producing extended-spectrum beta-lactamase from bacteraemia and urinary tract infection”

Potential role of *Escherichia coli* common pilus in persistence of clinical isolates producing extended-spectrum beta-lactamase from bacteraemia and urinary tract infection

C. Caneiras<sup>a</sup>, F. Nunes<sup>a</sup>, J. Pissarra<sup>a</sup>, L. Lito<sup>b</sup>, J. Melo-Cristino<sup>b</sup>, M. Salgado<sup>b</sup> and A. Duarte<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Lisboa, Av Forças Armadas 1649-019, Lisboa, Portugal

<sup>b</sup>Laboratory of Microbiology, Hospital de Santa Maria, Faculty of Medicine, University of Lisboa, Lisboa, Portugal

**Objectives:** Ecp is a pilus-adherence factor that is crucial to the virulence of *E. coli* O157 in humans and is also carried by commensal strains of *E. coli*. The role of the above noted virulence factor in extraintestinal pathogenic **E. coli** and the etiology of *E. coli* bacteremia remains unclear in spite of the urinary tract infection (UTI) seems to be the most frequent causative source. We examined both blood and urine isolates considering their clonal profile, phylogenetic groups and virulence factor *E. coli* common pilus (EcpA). **Methods:** ESBL *E. coli* clinical isolates in urine (n= 103) and blood (n= 70) were collected between 2001 and 2007 in a Central Hospital in Lisboa and were phylogenetically grouped. 45 blood isolates and 26 simultaneous clinical isolates recovered from 12 patients with both urine and blood sample were then analyzed to randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR patterns obtained with primer M13 and screened by PCR for EcpA virulence factor gene. **Results:** The majority representatives of the epidemic *E. coli* strains belonged to the phylogenetic group B2 (62,5% urine Vs 65,71% blood) as did 17,50% and 18,57% urine and blood isolates belonged to virulence group D. Surprisingly was the fact that equal frequency was detected to commensal phylogenetic group A (15,00% urine Vs 12,86% blood), usually associated with low invasive capacity compared with virulence group D ( $p < 0,8036$ , 95IC0,6663-1,836). The B1 phylogenetic group represent only 5 and 2,86% of urine and blood isolates. RAPD M13 profile of 45 blood isolates showed a predominant clone among the *Escherichia coli* collection (57,78%, pattern A) while 42% were distributed to B-F patterns. Within predominant and persistent (2002-2007) clone A the phylogenetic group B2 was prevalent although co-exist with A phylogenetic group. Among the B-F RAPD patterns all phylogenetic groups were represented. In 91,11% (41/45) of blood isolates was detected the EcpA gene. The four isolates that lacked the EcpA

adherence factor were from non frequent clonal profiles. Also all the 26 isolates recovered from 12 patients with UTI and then bacteremia present the EcpA gene. There is also a case-study with the Ec19 isolate at 08/2001 from urine and four years later (04/2004) is isolated the Ec231 with the same clonal A pattern in the blood sample. Both carried the EcpA gene. **Conclusions:** Bacteremia and ITU are common associated only with virulent extra-intestinal phylogenetic B2 group although the present study demonstrate high frequency of commensal phylogenetic group A in both urine and blood isolates. This study suggest that the gastrointestinal tract can be a relevant primary source for UTI and bacteremia, wheter it was from a urinary trac focus or not. As described to intestinal persistence and virulence to *E. coli* O157, pathogenic *E. coli* strains may provide to use EcpA to mimic commensal *E. coli* and provide themselves with an ecological advantage for host colonization and evasion of the immune system.

**Keywords:** *E. coli* common pilus (EcpA), persistence, commensal