

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**DETERMINANTES GENÉTICOS DE VIRULÊNCIA BACTERIANA
E SUA RELAÇÃO COM AS INFECÇÕES URINÁRIAS
COMO CAUSA PRIMÁRIA DE BACTERÉMIAS**

Filipa Andreia Portugal Nunes

Dissertação orientada pelos Professores Doutores
Aida Duarte (Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa)
Mário Santos (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR HUMANA

2009

"Messieurs, c'est les microbes
qui auront le dernier mot"

Louis Pasteur

Agradecimentos:

À Professora Aida Duarte, pela orientação de todo o projecto, apoio e motivação que sempre me transmitiu;

A toda a equipa do Laboratório de Controlo Microbiológico, em especial à Dra Alexandra Silva e à Paula Machado, pela ajuda e companheirismo;

À Dra Luísa Jordão, por tudo o que me ensinou;

Ao Professor James Johnson e à Doutora Alison D. O'Brian, que me enviaram os controlos positivos para os factores de virulência de *E.coli*;

À Associação para o Desenvolvimento do Ensino e Investigação em Microbiologia (ADEIM), que financiou o projecto.

Resumo

As infecções urinárias e as bacterémias são muitas vezes originadas por *Enterobacteriaceae* multirresistentes, principalmente quando se tratam de infecções associadas aos cuidados de saúde. Este estudo pretende caracterizar as estirpes de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* do hospital de Santa Maria, em Lisboa, isoladas a partir de uro e hemoculturas do mesmo doente. Vinte e oito isolados clínicos de *E.coli* e treze de *K.pneumoniae*, de doze e seis doentes, respectivamente, foram estudados em termos de perfil genético, genes de resistência antibacteriana e ambiente genético em que se inserem, determinantes genéticos de virulência e plasmídeos transportados, além do grupo filogenético, ilhas de patogenicidade e perfil alélico obtido por MLST para *E.coli*.

Verificou-se que enquanto para *E.coli* existiam apenas duas estirpes isoladas a partir do sangue e da urina do mesmo doente, para *K.pneumoniae* foram identificadas seis.

A estirpe de *E.coli* responsável pela maioria das infecções tem uma elevada prevalência no hospital desde 2000 e já foi identificada através de MLST como ST131 em vários países. Pertence ao grupo filogenético B2, possui vários genes de resistência, entre eles *bla*_{CTX-M-15} transportado em plasmídeos IncF e é virulenta, estando alguns operões organizados em ilhas de patogenicidade. O pílus ECP parece ser um dos responsáveis pelo seu sucesso, permitindo a sua permanência no organismo hospedeiro durante longos períodos de tempo, enquanto as fímbrias do tipo 1 lhe conferem a capacidade de internalização no epitélio da bexiga, protegendo-a da acção dos antibacterianos.

A maioria dos isolados de *K.pneumoniae* também são produtores de β -lactamases de espectro alargado CTX-M-type, codificadas principalmente em plasmídeos IncHI1, mas também em IncFIA.

A resistência às quinolonas deve-se não só a mutações nas zonas QRDR de *gyrA* e *parC* em *E.coli* e provavelmente em *K.pneumoniae*, mas também aos genes *aac(6')-Ib-cr* em *E.coli* e *qnr* em *K.pneumoniae*.

Palavras-chave: *E.coli*, *K.pneumoniae*, virulência, β -lactamases, *replicon typing*

Abstract

Urinary tract infections and bacteremia, in particular health care acquired infections, are usually associated with multiresistant *Enterobacteriaceae* strains.

In this study, we characterize *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains from hospital of Santa Maria, Lisboa, isolated from urine and blood of the same patient. Twenty-eight *E.coli* and thirteen *K.pneumoniae* isolates, from twelve and six patients, respectively, were analyzed in terms of genetic profile, antibiotic resistant genes and its genetic context, virulence genetic determinants and plasmids carried by each one. We also determined phylogenetic group, allelic profile given by MLST and searched for pathogenicity islands in *E.coli* isolates.

While in *E.coli* there were only two strains isolated both from blood and urine in the same patient, in *K.pneumoniae* there were six.

The *E.coli* strain responsible for most infections has high prevalence in the hospital since 2000 and had been identified as ST131 by MLST in several countries. It belongs to phylogenetic group B2, harbor several antibiotic resistant genes, in particular *bla*_{CTX-M-15} carried in IncF plasmids, and it is virulent, with some of the operons organized in pathogenicity islands. ECP pilus seems to be one of the responsible for its success, allowing its maintenance in the patient's organism during long periods of time, so as type 1 fimbriae, which allow the internalization in bladder epithelial cells, escaping from antibiotics action.

Most *K.pneumoniae* isolates were also extended-spectrum β -lactamase CTX-M-type producers, whose genes were mainly carried in IncHI1 plasmids, but also in IncFIA plasmids.

Quinolone resistance is given not only by mutations in QRDR on *gyrA* and *parC* genes in *E.coli* and probably in *K.pneumoniae*, but also by *aac(6')-Ib-cr* in *E.coli* and *qnr* in *K.pneumoniae*.

Key-words: *E.coli*, *K.pneumoniae*, virulence, β -lactamases, replicon typing

Índice

| | |
|--|----|
| Introdução..... | 7 |
| Objectivo..... | 12 |
| Métodos..... | 12 |
| Isolados clínicos | 12 |
| Determinação do perfil de resistência aos antibióticos | 12 |
| Extracção de DNA e PCR | 13 |
| Caracterização genotípica dos isolados | 13 |
| Caracterização filogenética das estirpes de <i>Escherichia coli</i> | 13 |
| Identificação dos determinantes genéticos de resistência a antibióticos..... | 14 |
| Determinação do ambiente genético dos genes de resistência..... | 14 |
| Identificação dos plasmídeos transportadores de β -lactamases | 14 |
| Identificação dos determinantes genéticos de virulência | 15 |
| Identificação de ilhas de patogenicidade em <i>Escherichia coli</i> | 16 |
| Determinação da capacidade hemolítica dos isolados | 16 |
| Sequenciação e análise das sequências nucleotídicas | 16 |
| Resultados..... | 16 |
| Discussão | 26 |
| Conclusão..... | 34 |
| Referências bibliográficas | 34 |
| Anexos..... | 37 |

Introdução

As infecções associadas aos cuidados de saúde são uma preocupação mundial, tendo sido reconhecidas pela Organização Mundial de Saúde como uma das maiores causas de mortalidade e morbidade, afectando a prestação de cuidados aos doentes, pondo em risco a segurança dos profissionais e utentes e aumentando os custos do sistema de saúde ⁽¹⁾. Nos hospitais portugueses têm uma prevalência de 8,4%, aproximando-se dos números da maioria dos países ⁽¹⁾.

Dentro das bactérias Gram-negativas, as da família *Enterobacteriaceae*, nomeadamente *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, são as principais responsáveis por estas infecções devido em parte à sua grande capacidade adaptativa. O fenótipo multirresistente das populações microbianas hospitalares endémicas, aliado a sistemas imunitários debilitados dos doentes e aos procedimentos invasivos a que estes estão sujeitos aumentam a dificuldade de tratamento das infecções, surgindo por isso a necessidade de uma antibioterapia o mais específica e eficaz possível ^(2,3).

Os antibióticos têm diversos mecanismos de acção antibacteriana: os β -lactâmicos – penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos – inibem a síntese do peptidoglicano da parede celular, os aminoglicósidos, tetraciclina e macrólidos ligam-se às subunidades ribossomais inibindo a síntese proteica, as quinolonas impedem a replicação do DNA por interacção com a DNA girase ou a topoisomerase IV e as sulfonamidas inibem a síntese do folato, essencial na formação de purinas e alguns aminoácidos.

Os β -lactâmicos são um dos grupos de antibióticos mais usados na terapia, principalmente quando se tratam de infecções por *Enterobacteriaceae*, devido à sua elevada eficácia e baixa toxicidade para o Homem ⁽⁴⁾. Deste modo, os organismos produtores de enzimas β -lactamases, que têm a capacidade de hidrolizar o anel β -lactâmico, são muito problemáticos do ponto de vista clínico. Em termos funcionais, estas enzimas dividem-se em quatro classes: 1 (cefalosporinases), 2 (penicilinases inibidas pelo ácido clavulânico), 3 (metalo- β -lactamases) e 4 (penicilinases não inibidas pelo ácido clavulânico) ⁽⁵⁾. Na classe 2 definem-se ainda vários subgrupos, sendo na subdivisão 2be do subgrupo 2b que se encontram as β -lactamases de espectro alargado (ESBL), que conferem resistência às cefalosporinas de 1ª, 2ª e 3ª geração e ao aztreonam ⁽⁵⁾. Inicialmente, derivaram de mutações nos genes codificantes das β -lactamases TEM-1, TEM-2 e SHV-1, mas hoje em dia já são conhecidas mais de 200, sendo os principais tipos as SHV, TEM, CTX-M, OXA e PER. Até à década de 90, as TEM e SHV eram as ESBL mais comuns e estavam principalmente associadas a *K.pneumoniae*, mas em poucos anos a prevalência de CTX-M aumentou consideravelmente essencialmente em *E.coli*, sendo agora as mais comuns, tanto

em infecções nosocomiais como da comunidade ⁽⁶⁾. Outro tipo de β -lactamases que conferem resistência às cefalosporinas de 3ª geração são as AmpC, pertencentes à classe 1, que se distinguem das ESBL por não serem inibidas pelo ácido clavulânico mas sim pela cloxacilina ⁽⁷⁾.

As quinolonas e fluoroquinolonas – que derivam das primeiras por adição de fluorina ao anel central – são outro grupo de antibióticos muito usado no tratamento de infecções por microrganismos Gram-negativos, principalmente quando se tratam de infecções urinárias nosocomiais ⁽⁸⁾, tendo-se verificado que actua essencialmente sobre a DNA girase, enquanto nos microrganismos Gram-positivos o alvo é principalmente a topoisomerase IV ⁽⁸⁾. A resistência a estes antibióticos pode ser conferida tanto por mutações nos genes codificantes das subunidades da DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) e da topoisomerase IV (*parC* e *parE*) como por genes plasmídicos como *qnrA*, *B* ou *S* e *aac(6')-Ib-cr*. Relativamente aos genes cromossomais, para que o microrganismo apresente um fenótipo resistente é necessário que ocorra pelo menos uma mutação na região determinante de resistência a quinolonas (QRDR) de *gyrA* – que interage com o DNA – verificando-se que mutações adicionais em *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* contribuem para o aumento da resistência ⁽⁹⁾. Os *hotspots* para estas mutações são nos aminoácidos Ser83 (a mais comum em *E.coli*) e Asp87 da subunidade A da DNA girase e nos aminoácidos Ser80 e Glu84 da subunidade C da topoisomerase IV ⁽¹⁰⁾. Quanto aos genes plasmídicos *qnrA*, *B* ou *S*, comuns em *K.pneumoniae*, codificam pentapéptidos que competem com as quinolonas e fluoroquinolonas pela ligação à DNA girase e à topoisomerase IV, protegendo-as e conferindo um baixo nível de resistência ⁽¹¹⁾. *aac(6')-Ib-cr*, também plasmídico, é uma variante do gene *aac(6')-Ib* que codifica a enzima aminoglicosido-acetiltransferase, com a capacidade de acetilar algumas quinolonas, reduzindo a sua actividade, devido às substituições Trp102Arg e Asp179Tyr ⁽¹²⁾.

Os genes de resistência a antibióticos encontram-se muitas vezes associados a elementos móveis (transposões ou integrões) e/ou plasmídeos, o que facilita a sua disseminação. Relativamente aos transposões, verifica-se que as sequências de inserção *ISEcp1*, *IS903* e *IS26* estão muitas vezes associadas a genes *bla_{CTX-M}* em *E.coli* e *K.pneumoniae* ⁽¹³⁾. Em Portugal, já foram identificadas a *ISEcp1* a montante e a *IS903* a jusante de *bla_{CTX-M}* em isolados de *E.coli*, tal como o que se verifica com as estirpes de outros países ⁽¹⁴⁾. Os integrões mais comuns são os de classe I, constituídos por dois segmentos de DNA conservados separados por uma região variável, codificando muitas vezes genes de resistência. O segmento conservado a 5' (5'-CS) contém o gene para a integrase (*intl*), o local de inserção *attI* e dois promotores para os genes da região variável; o segmento conservado a 3' (3'-CS) codifica os genes de resistência a sulfonamidas e a compostos quaternários de amónio (*sull* e *qacE Δ 1*) e a ORF5 ^(15,16).

O sistema de classificação de plasmídeos mais usado actualmente baseia-se na incompatibilidade das origens de replicação, ou seja, caso dois plasmídeos com a mesma origem de replicação se encontrem numa célula apenas um é transmitido à descendência, o que permite a sua organização por grupos de incompatibilidade. A forma mais simples de os identificar é através da técnica de *replicon typing*, que pesquisa os dezoito replicões mais comuns em *Enterobacteriaceae* através de cinco PCR-multiplex e três PCR-simplex ⁽¹⁷⁾. Estudos recentes indicam que em *E.coli* os genes *bla*_{CTX-M} estão maioritariamente codificados em plasmídeos IncF ⁽⁶⁾, não existindo ainda dados sobre *K.pneumoniae*.

As infecções urinárias são das infecções associadas aos cuidados de saúde mais frequentes e têm sido apontadas como uma das principais causas de bacterémias ^(18,19). Pensa-se que este tipo de infecções se inicie com a colonização da bexiga, ascendendo depois aos rins, onde os microrganismos invadem os tecidos até atingirem a corrente sanguínea ⁽¹⁹⁾. Assim, a passagem do sistema urinário para o sanguíneo implica que as bactérias tenham a capacidade de aderir às células hospedeiras, penetrar nos tecidos e manter-se num meio desfavorável e com actividade bactericida como é o sangue. Para que tal ocorra, têm de existir factores tanto ao nível do hospedeiro como do microrganismo que potenciem o processo.

As fímbrias do tipo 1, codificadas no operão *fim*, são conhecidas por mediarem a ligação e invasão do epitélio da bexiga através da adesina FimH – cujo receptor são as unidades terminais manosiladas de uroplaquina Ia e os receptores de integrinas β -1 e α -3, expressas abundantemente no epitélio urinário – e estão muito associadas a estirpes de *E.coli* uropatogénicas e *K.pneumoniae* isoladas de cistites ⁽²⁰⁾. Em *K.pneumoniae* são também conhecidas as fímbrias de tipo 3, codificadas no operão *mrk*, que promovem a ligação às células endoteliais e dos epitélios respiratório e renal, através da adesina MrkD – que tem como receptor o colagénio da matriz extracelular – mas o seu papel no estabelecimento das infecções urinárias ainda não está bem determinado ⁽²¹⁾. Em *E.coli*, as fímbrias do tipo P, do operão *pap*, têm sido associadas à ocorrência de pielonefrites, sabendo-se que a sua abundância está relacionada com a severidade destas infecções. A adesina PapG reconhece resíduos de Gal α (1-4)Gal, presentes em eritrócitos e em células das vias urinárias superiores, nomeadamente dos rins ⁽²⁰⁾. A estreita relação entre o rim e a corrente sanguínea sugere que possam ter uma elevada prevalência nas estirpes que conseguem penetrar na corrente sanguínea a partir do sistema urinário. *E.coli* tem ainda outro tipo de fímbrias envolvidas na adesão às células da bexiga, rim, endoteliais e eritrócitos, designadas por fímbrias do tipo S – cuja adesina SfaS é responsável pelo reconhecimento de resíduos de ácido siálico nos receptores – codificadas no operão *sfa* ⁽²²⁾.

A necessidade de Fe³⁺, muito importante no metabolismo das células procariontas, pode ser um dos factores que levem à passagem de um microrganismo do sistema urinário

para o sanguíneo. Neste caso, os microrganismos devem ter a capacidade de produzir sideróforos como a aerobactina – existente tanto em *E.coli* como em *K.pneumoniae* – cujas enzimas que intervêm na sua síntese, assim como o receptor de membrana, estão codificados no operão *iucABCDiutA* ^(23,24). É também de esperar que produzam hemolisinas, de forma a libertar o Fe³⁺ contido nos eritrócitos. Em *E.coli*, a α -hemolisina, codificada no gene *hlyA* do operão *hly*, tem a capacidade não só de lisar eritrócitos, como também células endoteliais e do epitélio renal, monócitos e granulócitos, assim como de desencadear a apoptose ⁽²⁵⁾. Em *K.pneumoniae*, é conhecida a hemolisina Khe, mas pouco se sabe acerca do seu mecanismo de acção ⁽²⁶⁾.

Nas estirpes de *E.coli*, existe ainda outro factor de virulência que pode ter um papel importante na passagem do sistema urinário para o sistema sanguíneo: o CNF-1 (*cytotoxic necrotizing factor 1*), ou factor necrotizante 1. Esta toxina penetra na célula hospedeira e pode levar à necrose ou apoptose, dependendo da concentração. Por um lado, promove a degradação do epitélio do aparelho urinário, e por outro inibe a acção dos neutrófilos, contribuindo para a manutenção e disseminação dos microrganismos nos tecidos ⁽²⁷⁾.

Pouco se sabe acerca da recentemente descoberta proteína Usp (*uropathogenic specific protein*), mas verificou-se que está associada a estirpes de *E.coli* uropatogénicas (UPEC). Esta hipotética colicina ⁽²⁸⁾ é muito comum em isolados de bacterémias com origem em infecções urinárias em doentes imunocomprometidos ⁽²⁹⁾, o que indica que pode ter um papel importante no processo.

Recentemente foi também descrito o pílus ECP (*E.coli common pilus*, também conhecido por *yagZ* ou *matB*), responsável pela adesão dos microrganismos comensais e patogénicos aos enterócitos ^(30,31,32). Sabendo que o cólon é o reservatório das estirpes de *E.coli* responsáveis por infecções urinárias recorrentes ⁽³³⁾, a adesina EcpA pode ter um papel determinante na manutenção no organismo hospedeiro.

Os factores de virulência estão muitas vezes organizados em ilhas de patogenicidade. Estas regiões genómicas, que podem variar entre 10 e 200 kbs, caracterizam-se por estarem presentes apenas nas estirpes patogénicas, terem um conteúdo G + C diferente, serem instáveis e na maioria das vezes estarem adjacentes a genes para tRNAs e flanqueadas por repetições directas ^(25,34). Em estirpes de *E.coli* uropatogénicas, as ilhas de patogenicidade mais estudadas são PAI I e II identificada em *E.coli* J96, PAI I e II em *E.coli* CFT073 e PAI I a IV em *E.coli* 536, verificando-se que a PAI IV₅₃₆ é a mais representada em estirpes urinárias ^(25,34). Os factores de virulência codificados em cada uma estão listados na tabela I.

Tabela I: Factores de virulência codificados nas principais ilhas de patogenicidade em estirpes de *E.coli* uropatogénicas

| PAI | Factores de virulência |
|----------------------|--|
| I ₅₃₆ | α-hemolisina, fímbrias CS12- <i>like</i> e F17- <i>like</i> |
| II ₅₃₆ | α-hemolisina, fímbrias relacionadas com P, adesinas Hek e hemaglutininas- <i>like</i> |
| III ₅₃₆ | Fímbrias S, sistema de sideróforos salmoquelina, adesina Sap e protease de hemoglobina |
| IV ₅₃₆ | Sistema de sideróforos yersiniabactina |
| I _{J96} | α-hemolisina, fímbrias P |
| II _{J96} | α-hemolisina, fímbrias Prs e CNF-1 |
| I _{CFT073} | α-hemolisina, fímbrias P, aerobactina, sistema de transporte de carboidratos |
| II _{CFT073} | Fímbrias P e genes reguladores do metabolismo do ferro |

Vários estudos tentaram estabelecer uma relação entre os quatro principais grupos filogenéticos de *E.coli* (A, B1, B2 e D), a resistência a antibióticos e a virulência. Picard *et al.* foram os primeiros a reconhecer o grupo B2 como o mais virulento e A e B1 como essencialmente comensais ⁽³⁵⁾ e Johnson *et al*, 2005. verificaram que o grupo B2 é o mais comum em estirpes isoladas a partir de infecções urinárias ⁽³⁶⁾. Estudos recentes sugerem que os microrganismos resistentes às quinolonas têm menos factores de virulência que as susceptíveis, existindo controvérsia acerca de este fenómeno se dever ou não à maior virulência do grupo B2, ao qual pertencem grande parte das estirpes sensíveis ⁽³⁷⁾.

Hoje em dia recorre-se cada vez mais ao *Multilocus Sequence Typing* (MLST) para caracterizar isolados bacterianos e estabelecer facilmente relações entre eles. Esta técnica baseia-se na análise das sequências de fragmentos internos de genes *housekeeping*, que consoante as alterações nucleotídicas fornecem um perfil alélico para cada isolado. Estes perfis são cruzados numa base de dados internacional, facilitando a troca de informação à escala global e permitindo o estudo da disseminação das estirpes à escala global ^(38,39). No entanto, o facto de várias instituições se basearem na amplificação de diferentes fragmentos torna-se uma barreira à troca de informação. A aplicação desta técnica em isolados recolhidos em Portugal permitiria não só distinguir clones bacterianos, como também identificar surtos e estirpes endémicas de cada hospital e realizar estudos epidemiológicos a nível nacional e mesmo internacional.

Objectivo

Este estudo teve como objectivo a caracterização das estirpes de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* do hospital de Santa Maria, em Lisboa, responsáveis por infecções urinárias e bacterémias no mesmo doente, em termos de perfil genético, determinantes genéticos de virulência e resistência e ambiente genético em que se inserem, grupo filogenético (para *E.coli*) e presença de plasmídeos.

Métodos

Isolados clínicos

Para este estudo usaram-se isolados clínicos cujos doentes apresentassem no mínimo uma amostra recolhida a partir da urina e outra do sangue, da mesma espécie bacteriana, num intervalo de tempo relativamente curto. Assim, seleccionaram-se vinte e oito isolados de *Escherichia coli* – treze provenientes de uroculturas, catorze de hemoculturas e um de pús – e treze de *Klebsiella pneumoniae* – sete de uroculturas e seis de hemoculturas – de doze e seis doentes, respectivamente, recolhidos entre 1999 e 2007 no Hospital de Santa Maria, em Lisboa. A sua identificação foi efectuada pelo sistema automatizado do Laboratório de Bacteriologia do hospital em questão.

Determinação do perfil de resistência aos antibióticos

Testou-se a susceptibilidade de cada isolado aos antimicrobianos segundo o método de difusão em disco (Kirby-Bauer), usando como meio de cultura agar Müller-Hinton e os discos de antibióticos amoxicilina com ácido clavulânico (20/10 µg), ciprofloxacina (5 µg), ceftazidina (30 µg), cefoxitina (30 µg), cefotaxima (30 µg), imipenemo (10 µg) e gentamicina (10 µg). Os halos de inibição foram interpretados de acordo com os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* ⁽⁴⁰⁾.

Para os isolados resistentes à cefoxitina, testou-se ainda a sensibilidade aos antimicrobianos inibindo a acção das cefalosporinases, por realização do antibiograma adicionando 20 µl de cloxacilina (10 mg/mL) a cada disco de antibiótico.

Determinaram-se também as concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos a que os isolados apresentavam alguma resistência numa amostra de sete isolados de *E.coli* e seis de *K.pneumoniae*, em agar Müller-Hinton, usando tiras de Etest[®] (AB BIODISK).

Extracção de DNA e PCR

Extraiu-se o DNA total de cada isolado pelo método de *boiling-centrifugation*, que consiste na lise pelo calor de uma suspensão bacteriana densa, a 94°C durante 10 minutos, seguida da remoção dos resíduos celulares por centrifugação a 12 000 rpm durante 2 minutos, recolhendo-se o sobrenadante. O DNA foi posteriormente quantificado através do espectrofotómetro *NanoDrop™ 2000* (Thermo SCIENTIFIC) ou do fluorómetro *Qubit™* (Invitrogen).

As reacções de PCR desde estudo foram efectuadas num volume total de 25 µL, usando *Ready-To-Go PCR Analysis Beads* ou o kit *DyNAzyme™ II DNA Polymerase* (Finnzymes), preparados segundo os protocolos dos fabricantes, nos termocicladores *Biometra® T-Personal* e *TGradient*.

Caracterização genotípica dos isolados

Para obter os perfis genéticos de cada isolado, usou-se a técnica de *RAPD M13 DNA fingerprinting* ⁽⁴¹⁾, usando *Ready-To-Go RAPD Analysis Beads* (GE Healthcare).

De modo a clarificar os resultados, realizou-se o *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), descrito por Maslow *et al.* ⁽⁴²⁾, para desassete dos isolados – nove de *K.pneumoniae* e oito de *E.coli* – usando a enzima de restrição *XbaI* para digerir o DNA *overnight*.

Recorreu-se ainda ao *Multilocus Sequence Typing* para doze dos isolados de *E.coli*, segundo dois esquemas já descritos ^(38,39). O primeiro, usado no Institute Pasteur, baseia-se na sequenciação de fragmentos dos genes *housekeeping dinB, icdA, pabB, polB, putP, trpA, trpB* e *uidA* ⁽³⁹⁾, enquanto o segundo, desenvolvido na University College Cork, usa fragmentos de *adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA* e *recA* ⁽³⁸⁾. Os primers usados no primeiro esquema foram os descritos pelos autores ⁽³⁹⁾, e para o segundo escolheram-se os da tabela SI, em anexo, a partir dos descritos no site oficial http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi_html. As sequências nucleotídicas obtidas foram posteriormente comparadas com as já existentes nas respectivas bases de dados (<http://www.pasteur.fr/mlst> e <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>).

Caracterização filogenética das estirpes de *Escherichia coli*

Determinou-se o grupo filogenético dos isolados de *E.coli* através de um PCR multiplex, de acordo com Clermont *et al.* ⁽⁴³⁾, usando *Ready-To-Go PCR Analysis Beads* (GE Healthcare).

Identificação dos determinantes genéticos de resistência a antibióticos

A presença dos genes codificantes das enzimas β -lactamases sugeridas pelos antibiótipos de cada isolado foi confirmada através de reacções de PCR usando primers e condições de reacção específicas (tabela SII, em anexo) e posterior sequenciação dos produtos amplificados. Para os genes *bla*_{CTX-M-type}, seguiu-se o procedimento descrito por Conceição *et al.* ⁽⁴⁴⁾, enquanto para *bla*_{AmpC-type} e *bla*_{TEM-type} se desenharam primers com base nas sequências nucleotídicas existentes na base de dados Genbank (*bla*_{AmpC-type}: AB108683, AY533245 e AF492449.1; *bla*_{TEM-type}: DQ174113).

Pesquisou-se ainda a presença dos genes *qnrA*, *B* e *S* e dos alelos de enzimas conhecidos por conferirem resistência às quinolonas, nomeadamente *gyrA*, *parC* e *aac(6')-Ib*, numa amostra de cinco isolados de *E.coli* e três de *K.pneumoniae* resistentes a estes antibióticos. Para *aac(6')-Ib* desenharam-se os primers usando como base as sequências existentes no Genbank (EF100892) e usaram-se as condições de reacção descritas na tabela SII em anexo. Já para *qnrA*, *B* e *C*, *gyrA* e *parC*, seguiram-se os procedimentos de Lindgren *et al.* e Wang *et al.* ^(45,46), respectivamente. As sequências dos primers usados, assim como as condições de cada reacção estão descritas na tabela SII, em anexo.

Determinação do ambiente genético dos genes de resistência

Investigou-se a presença dos dois tipos de sequências de inserção frequentemente associadas aos genes *bla*_{CTX-M-type}, *ISEcp1* e *IS903*, a montante e a jusante do gene, em quatro isolados de *E.coli* e três de *K.pneumoniae* com o gene *bla*_{CTX-M-15} identificado. Para perquisar a existência destas sequências a montante, usou-se um primer *forward* para a sequência de inserção e o *reverse* já usado para amplificar o gene *bla*_{CTX-M-15}, e *vice-versa* para a pesquisa a jusante. Os primers para *ISEcp1 forward* e *IS903 reverse* estão descritos por Eckert *et al.* ⁽¹³⁾, sendo os restantes desenhados de acordo com as sequências disponíveis no Genbank (*ISEcp1*: FM246884 e FJ621586; *IS903*: AF454633) (tabela SIII, em anexo).

Foi ainda pesquisada a presença de integrões de classe I para cinco isolados de *E.coli* e quatro de *K.pneumoniae*, de acordo com Lévesque *et al.* ⁽¹⁵⁾ (tabela SIII).

As sequências dos primers usados e as condições de cada reacção estão descritas na tabela SIII, em anexo.

Identificação dos plasmídeos transportadores de β -lactamases

Para cada isolado, efectuou-se a pesquisa dos dezoito replicões mais comuns em *Enterobacteriaceae*, segundo a técnica de *replicon typing* desenvolvida por Carattoli *et al.* ⁽¹⁷⁾.

Posteriormente, foram seleccionados quatro isolados de *E.coli* e três de *K.pneumoniae* representativos de cada estirpe, aos quais se extraiu o DNA total através do kit *Wizard Genomic[®] DNA Purification* (Promega) para proceder à transformação de células competentes por electroporação (*E.coli* DH5 α), choque térmico (*E.coli* One Shot[®] TOP10 – Invitrogen) e conjugação (*E.coli* TOPO10 e *E.coli* K802N).

Para a transformação por electroporação, adicionou-se 1 μ L de DNA (100ng/ μ L) a 40 μ L de células *E.coli* DH5 α electrocompetentes, sempre em gelo, e electroporou-se a 1,8V e 200m Ω . Adicionaram-se 500 μ L de meio SOC e incubou-se durante 2h a 37°C com agitação, plaqueando-se depois em meio Plate Count Agar com cefotaxima (1mg/mL) e incubando *over-night* a 37°C. Como controlo usou-se 1 μ L do vector pUC19 (0,1ng/mL).

Para a transformação por choque térmico, efectuada segundo o protocolo do fabricante, usou-se a estirpe *E.coli* One Shot[®] TOP10 (Invitrogen) electrocompetente.

Na conjugação usaram-se duas estirpes receptoras *lac⁻*, *E.coli* TOPO10 e *E.coli* K802N, em contraste com as estirpes dadoras, *lac⁺*. Inoculou-se 1mL de meio líquido *Brain Heart Infusion* com 1mL das estirpes dadora e receptora crescidas *over-night* e em paralelo plaquearam-se 100 μ L de ambas em meio Brain Heart Infusion Agar, incubando-as a 25°C *over-night*. Posteriormente, fez-se uma suspensão com as colónias que cresceram em meio sólido e plaqueou-se meio de Drigalsky – diferencial para *lac⁺* e *lac⁻* – com cefotaxima (1mg/mL), assim como o inóculo crescido em meio líquido.

Fez-se o antibiograma das estirpes transformantes como já descrito, e determinou-se a concentração mínima inibitória dos antibióticos cefoxitima, ceftazidina, gentamicina e amoxicilina com ácido clavulânico para cada uma, em agar Müller-Hinton, usando tiras de Etest[®] (AB BIODISK). Extraíram-se ainda os plasmídeos usando o kit *JETstar 2.0 Plasmid Purification MINI* (Genomed) e correram-se num gel de agarose a 0,6%, de modo a determinar o seu tamanho.

Identificação dos determinantes genéticos de virulência

Para *E.coli*, pesquisou-se a presença de sete factores de virulência (*fimH*, *papC*, *sfaD-E*, *cnf-1*, *hlyA* e *usp*) e de *ecpA* em todos os isolados através de reacções de PCR usando primers e condições de reacção específicas (tabela SIV, em anexo) e posterior sequenciação dos produtos amplificados. Para *fimH*, *cnf-1*, *iucC* e *hlyA*, seguiu-se o procedimento descrito por Usein *et al.* ⁽⁴⁷⁾, enquanto para *papC*, *sfaD-E*, *ecpA* e *usp* se desenharam novos primers com base nas sequências nucleotídicas da base de dados Genbank (*papC*:Y00529; *sfaD-E*: X1664; *ecpA*: NC_007946, NC_008253, NC_004431, NC_002655, NC_002695 e NC_000913; *usp*: AB027193 e AB056440). Como controlos positivos para *cnf-1*, *sfaD-E*, *hlyA* e *usp*, usaram-se as estirpes de *E.coli* CP9, L31, J96 e

V27, respectivamente, cedidas pelo Professor James Johnson e pela Doutora Alison D. O'Brian.

Para os isolados de *K.pneumoniae*, pesquisou-se a presença dos factores de virulência *fimH*, *mrkD*, *iucC* e *khe* (tabela SIV). Para *iucC* usaram-se os mesmos primers e condições de reacção de *E.coli* ⁽⁴⁷⁾ e para *fimH* procedeu-se de acordo com Stahlhut *et al.* ⁽⁴⁸⁾. Os primers para *mrkD* e *khe* foram desenhados de acordo com as sequências disponíveis no Genbank (*mrkD*: M2456 e M55912; *khe*: AF293352).

Identificação de ilhas de patogenicidade em *E.coli*

Para detectar a presença das oito ilhas de patogenicidade mais estudadas em estirpes de *E.coli* uropatogénicas – PAI I_{J96}, II_{J96}, I_{CFT073}, II_{CFT073}, I₅₃₆, II₅₃₆, III₅₃₆ e IV₅₃₆ – realizaram-se dois PCRs multiplex de acordo com Sabaté *et al.* em cinco isolados representativos ⁽³⁴⁾.

Determinação da capacidade hemolítica dos isolados

A capacidade hemolítica de oito dos isolados de *E.coli* e de todos os de *K.pneumoniae* foi testada por repicagem das colónias em gelose de sangue de carneiro e incubação over-night a 37°C.

Sequenciação e análise das sequências nucleotídicas

Os produtos de PCR para sequenciação foram purificados através do kit *JETquick Spin Column* (Genomed) e ambas as cadeias foram sequenciadas pelo serviço da MacroGen Korea.

As sequências nucleotídicas foram analisadas e comparadas com as existentes na base de dados Genbank, recorrendo aos programas informáticos BLASTN e ClustalW, disponíveis *online*.

Resultados

Relativamente a *Escherichia coli*, verificou-se que vinte e cinco dos vinte e oito isolados – doze provenientes de urinas, doze de sangue e um de pús – apresentavam resistência à cefotaxima e resistência ou resistência intermédia à ceftazidina (figura 1a), típico da presença de uma β -lactamase do tipo CTX-M, o que foi confirmado por PCR (figura 1d), verificando-se que as sequências nucleotídicas apresentavam entre 99 e 100% de homologia com o gene *bla*_{CTX-M-15}. Todos estes isolados eram também resistentes à

ciprofloxacina e alguns à gentamicina e à amoxicilina com ácido clavulânico. Determinaram-se as concentrações mínimas inibitórias para cinco deles, representativos de cada antibiotipo, verificando-se que eram de >256 µg/mL para a cefotaxima, entre 64 e 24 µg/mL para a ceftazidina e >32 µg/mL para a ciprofloxacina. Nos três isolados resistentes à gentamicina, a sua concentração mínima inibitória variou entre >1024 e 64 µg/mL e nos dois sensíveis foi de 0,5 µg/mL. Para a amoxicilina com ácido clavulânico, os valores variaram entre 6 e 32 µg/mL.

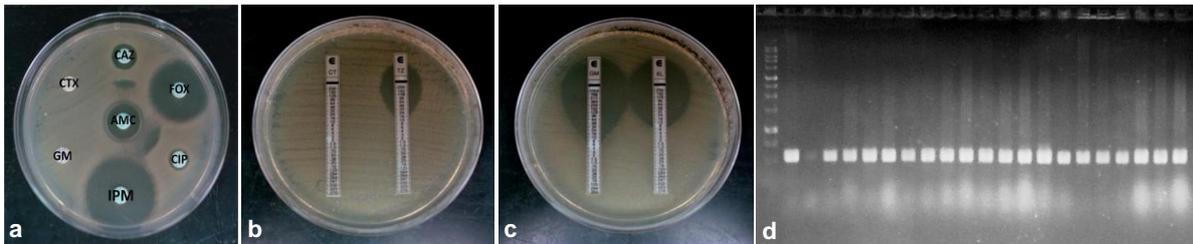


Figura 1: Perfil de resistência dos isolados de *E.coli* com o perfil genético B. a) Antibiograma usando discos dos antibióticos amoxicilina com ácido clavulânico (AMC), cefotaxima (CTX), ceftazidina (CAZ), ceftoxitina (FOX), ciprofloxacina (CIP), imipenemo (IPM) e gentamicina (GM); b e c) Determinação das concentrações mínimas inibitórias de cefotaxima (CT), ceftazidina (TZ), gentamicina (GM) e amoxicilina com ácido clavulânico (XL) por Etest® numa estirpe de *E.coli* DH5α transformada com o plasmídeo transportando *bla*_{CTX-M-15}; d) Corrida dos produtos de PCR para amplificação dos genes *bla*_{CTX-M-type} em gel de electroforese.

Os perfis genéticos obtidos por *RAPD M13 DNA fingerprint* e PFGE mostraram que vinte e dois dos vinte e cinco isolados correspondiam à mesma estirpe – perfil genético designado por B – e três, do mesmo doente, foram identificados como uma estirpe diferente – perfil genético A (figura 2a e 2b).

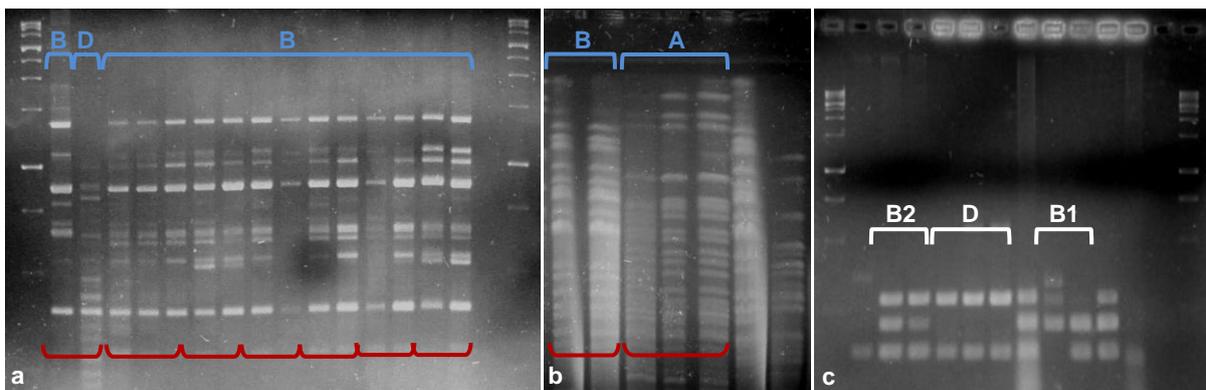


Figura 2: Exemplos de perfis genéticos obtidos por a) *RAPD M13 DNA fingerprint* e b) PFGE e c) grupos filogenéticos para os isolados de *E.coli*. Cada traço a vermelho representa os isolados do mesmo doente

Todos os isolados do clone com o perfil genético B pertenciam ao grupo filogenético B2 (figura 2c), e dos sete factores de virulência pesquisados apenas apresentavam *fimH* e *iucC*, tendo *ecpA* sido também positivo, com homologias de 98,98%, 100% e 97,13%, respectivamente. Um destes isolados foi escolhido para a pesquisa das ilhas de patogenicidade, tendo o resultado sido positivo para PAI I_{CFT073}, PAI II_{CFT073} e PAI IV₅₃₆.

Através de técnica de *replicon typing*, verificou-se que catorze dos vinte e dois isolados com perfil genético B transportavam um plasmídeo cujo replicação apresentava 99,54% de homologia com FIA e um deles tinha ainda uma origem de replicação do tipo Y (homologia de 100%). Quatro isolados transportavam um plasmídeo do grupo de incompatibilidade IncFIB (homologia de 100%), dois apresentavam ambas as origens de replicação e em dois nenhum dos replicões pesquisados foi detectado.

Escolheram-se três destes isolados, um com FIA (*E.coli* 381FFUL), um com FIB (*E.coli* 538FFUL) e um com ambas as origens de replicação (*E.coli* 342FFUL), para proceder à transferência dos plasmídeos para estirpes de *E.coli* DH5α competentes sensíveis aos antibióticos testados. No entanto, apesar de se terem recorrido a diversas técnicas – transformação por electroporação e por choque térmico e conjugação – apenas se conseguiu transferir o plasmídeo da *E.coli* 381FFUL por electroporação. Embora este não seja visível no gel da figura 3a (poço 3), confirmou-se a presença do gene *bla*_{CTX-M-15} e da origem de replicação FIA por PCR na estirpe *E.coli* DH5α(p381FFUL) (figura 3b, poços 2 e 7), e a aquisição de resistência à cefotaxima, ceftazidina e gentamicina, mantendo a sensibilidade à amoxicilina com ácido clavulânico, sendo as concentrações mínimas inibitórias de >256, 64, 12 e 8 µg/mL, respectivamente (figura 1b e 1c).

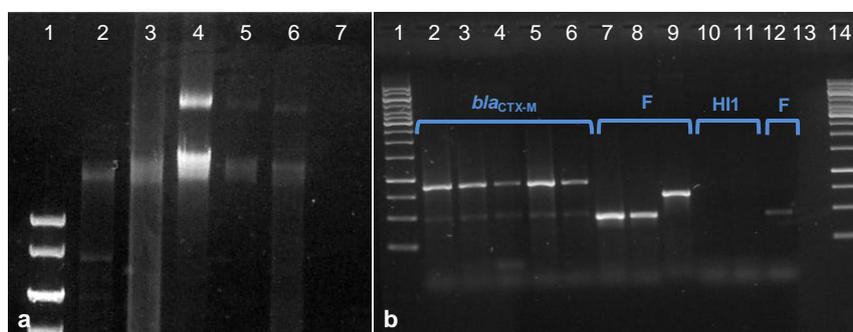


Figura 3: a) Corrida dos plasmídeos extraídos das estirpes DH5α transformadas (1e 2- marcador molecular, 3- *E.coli* DH5α(p381FFUL), 4- *E.coli* DH5α transformada com o plasmídeo do isolado com o perfil genético A, 5 e 6- *E.coli* DH5α transformadas com plasmídeos IncHI1 dos isolados de *K.pneumoniae*, 7- *E.coli* DH5α transformada com o plasmídeo IncFIA do isolado de *K.pneumoniae*); b) Amplificação dos genes *bla*_{CTX-M-type} (2 a 6) e dos replicões (7- FIA de DH5α(p381FFUL), 8 e 9- FIA e FIB de *E.coli* DH5α transformada com o plasmídeo do isolado com o perfil genético A, 10 e 11- HI1 de *E.coli* DH5α transformadas com plasmídeos IncHI1 dos isolados de *K.pneumoniae*, 12-FIA de *E.coli* DH5α transformada com o plasmídeo IncFIA do isolado de *K.pneumoniae*) das estirpes transformadas com os plasmídeos.

Nestes três isolados foram também pesquisadas sequências de inserção e integrões de classe I, verificando-se que *E.coli* 381FFUL e *E.coli* 342FFUL apresentavam ISEcp1 a montante do gene *bla*_{CTX-M-15}. No isolado *E.coli* 538FFUL foi identificado um integrão com os genes *dfrA12* e *aadA2* (homologias de 93,12% e 90,98%, respectivamente) e no *E.coli* 342FFUL foi amplificado um com cerca de 750 pb.

Por fim, determinou-se a razão da resistência às quinolonas nestes três isolados, pesquisando os genes *qnrA*, *B* e *S* e os alelos de *gyrA*, *parC* e *aac(6')-Ib*. Nenhum deles apresentava *qnrA*, *B* ou *S*, mas os isolados *E.coli* 381FFUL e *E.coli* 342FFUL possuíam o alelo *aac(6')-Ib-cr*, com homologias de 93,92 e 87,43%, respectivamente. Quanto aos produtos dos genes cromossomais, os três tinham as substituições Ser83Leu e Asp87Asn em GyrA e Ser80Ile e Glu84Val em ParC.

Relativamente aos três isolados com o perfil genético A, verificou-se que pertenciam ao grupo filogenético D e apresentavam o factor de virulência *fimH* e a adesina *ecpA*. A pesquisa de ilhas de patogenicidade num destes isolados foi positiva para PAI I_{CF7073} e PAI IV₅₃₆ e o *replicon typing* revelou que os três apresentavam plasmídeos dos grupos de incompatibilidade IncFIA e IncFIB, sendo que um deles apresentava também IncN (99,84% de homologia). Um destes isolados foi usado para transformar uma estirpe DH5α sensível por electroporação, verificando-se que esta adquiriu o gene *bla*_{CTX-M-15} e as origens de replicação FIA e FIB (figura 3b, poços 3, 8 e 9), assim como resistência à cefotaxima e à ceftazidina e manteve a sensibilidade à amoxicilina com ácido clavulânico, com concentrações mínimas inibitórias de >256, 64 e 4 µg/mL, respectivamente. No gel de corrida dos produtos de extracção de plasmídeos é possível visualizar apenas um, que se estima ter aproximadamente 150 kb (figura 3a, poço 4). Neste isolado, identificou-se ainda uma sequência de inserção ISEcp1 a montante do gene *bla*_{CTX-M-15} e um integrão com os genes *dfrA17* e *aadA5*. Não possuía os genes *qnrA*, *B* ou *S* nem *aac(6')-Ib*, mas GyrA apresentava as substituições Ser83Leu e Asp87Asn e ParC Ser80Ile.

Dois dos vinte e oito isolados apresentavam resistência à cefoxitina e à amoxicilina com ácido clavulânico, indicando a presença de um gene *bla*_{AmpC-type}, o que foi confirmado por PCR. Um deles, isolado de urina, apresentava também resistência à cefotaxima e à ceftazidina (figura 4a) e transportava um *bla*_{AmpC} com 100% de homologia com *ampC-EC6*, descrita por Mammeri *et al.* ⁽⁴⁹⁾. Com a adição de cloxacilina, este isolado passou a apresentar sensibilidade a todos os antibióticos testados (figura 4b). As concentrações mínimas inibitórias (sem cloxacilina) foram de >256 µg/mL para a cefoxitina, 32 µg/mL para a cefotaxima, 64 µg/mL para a ceftazidina e 16 µg/mL para a amoxicilina com ácido clavulânico. O perfil genético deste isolado era diferente, designado por C, e pertencia ao grupo filogenético B1 (figura 2c). Nenhum dos oito factores de virulência pesquisados foi

detectado, no entanto foi identificada a ilha de patogenicidade PAI I_{J96}, e verificou-se que a pesquisa de origens de replicação foi também negativa.

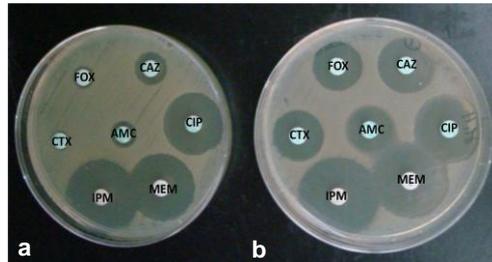


Figura 4: Antibiograma do isolado de *E.coli* com o perfil genético C a) sem cloxacilina e b) com cloxacilina, usando discos dos antibióticos amoxicilina com ácido clavulânico (AMC), cefotaxima (CTX), ceftazidina (CAZ), cefoxitina (FOX), ciprofloxacina (CIP), imipenemo (IPM) e meropenemo (MEM)

Quanto ao segundo isolado, de uma hemocultura, apresentava ainda resistência à cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina e gentamicina, com concentrações mínimas inibitórias de 16 µg/mL, 64 µg/mL, >32 µg/mL e 24 µg/mL, respectivamente, >256 µg/mL para a cefoxitina e 32 µg/mL para a amoxicilina com ácido clavulânico. Por PCR, verificou-se que o gene *bla*_{AmpC} tinha 98,89% de homologia com *ampC-EC8* ⁽⁴⁹⁾. Com a adição de cloxacilina, o isolado apenas se manteve resistente à ciprofloxacina e à gentamicina. O seu perfil genético, diferente de todos os anteriores, foi designado por E, e pertencia ao grupo filogenético D (figura 2c). Relativamente a factores de virulência, apresentava os genes *papC*, *fimH* e *iucC*, assim como *ecpA* e as ilhas de patogenicidade PAI I_{CFT073} e PAI IV₅₃₆. Foi identificada uma origem de replicação FIA e um integrão com os genes *dfrA17* e *aadA5*, com homologias de 99,58% e 98,89% (figura 2c, 6º poço). A resistência deste isolado às quinolonas é devida às substituições Ser83Leu e Asp87Asn em GyrA e Ser80Ile e Glu84Val em ParC, não apresentando nenhum gene *qnr* ou *aac(6')-Ib-cr*.

O último dos vinte e oito isolados de *E.coli* estudados era sensível a todos os antibióticos, tinha um perfil genético designado por D (figura 2a) e pertencia ao grupo filogenético D (figura 2c). Apresentava os factores de virulência *fimH* e *iucC* e a adesina *ecpA*, mas nenhuma das ilhas de patogenicidade pesquisadas foi detectada, e por *replicon typing* identificaram-se dois replicões: FIB e A/C.

Para confirmar os resultados obtidos por *RAPD M13 DNA fingerprint* e PFGE e estabelecer uma relação entre as estirpes de *E.coli* estudadas e as já identificadas noutros países, recorreu-se a dois esquemas de MLST de modo a determinar os perfis alélicos de

cada clone. De facto, verificou-se que nos 12 isolados escolhidos cada perfil genético obtido por *RAPD M13 DNA fingerprint* e PFGE correspondia a um perfil alélico de MLST (tabela II).

Tabela II: Perfis alélicos obtidos através dos dois esquemas de MLST usados

| Perfil genético | Perfil Alélico | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------------------|--------------|------------------|--------------|----------------|---------------|-----------------|
| | MLST Institute Pasteur | | | | | | | | MLST University College Cork | | | | | | |
| | <i>dinB</i> | <i>icdA</i> | <i>pabB</i> | <i>polB</i> | <i>putP</i> | <i>trpA</i> | <i>trpB</i> | <i>uidA</i> | <i>adk</i> | <i>fumC</i> | <i>gyrB</i> | <i>icd</i> | <i>mdh</i> | <i>purA</i> | <i>recA</i> |
| A | 30 | 45 | 33 | 37 | 27 | 34 | 24 | 9 | 92 (100%) | 4 (100%) | 103/157 (98%) | 87 (93%) | 140 (88%) | 58 (100%) | 44 (96%) |
| B | 9 | 1 | 15 | 7 | 4 | 9 | 6 | 9 | 53 (100%) | 40 (100%) | 47 (100%) | 13 (100%) | 36 (100%) | 28 (100%) | 29 (100%) |
| C | INC | INC | 15 | INC | 149 | INC | INC | INC | 45 (99%) | INC | 36 (87%) | INC | 56 (89%) | 119 (85%) | INC |
| D | 22 | 41 | 21 | 3 | 23 | 23 | 20 | 18 | 6 (99%) | 190 (97%) | 5 (100%) | 28 (100%) | 1/126 (98%) | 135 (100%) | INC |
| E | 18 | 8 | 112 | 20 | 66 | 63 | 56 | 52 | 18 (100%) | 106 (98%) | 17 (100%) | 6 (100%) | 4 (92%) | 5 (100%) | 29/127 (85%) |

INC: sequenciação inconclusiva

Os isolados com o perfil genético B apresentavam uma correspondência exacta com ST43 do esquema do Institute Pasteur e com ST131 da University College Cork. Quanto às outras estirpes, nenhum dos perfis alélicos estava descrito nas bases de dados, mas verificou-se que os isolados com os perfis genéticos A, D e E apresentavam perfis alélicos muito próximos de ST93, ST42/305 e ST161 do esquema do Institute Pasteur. De salientar ainda que para o isolado com o perfil C, seis das sequências do esquema do Institute Pasteur e três do da University College Cork foram inconclusivas, assim como uma da estirpe com o perfil D para o esquema da University College Cork (tabela II).

De acrescentar é ainda o facto de nenhum dos isolados de *E.coli* ter a capacidade de hemolisar os eritrócitos de carneiro, como se pode verificar na figura 5.



Figura 5: Teste à capacidade de hemólise dos isolados de *E.coli* e *K.pneumoniae* em gelose de sangue de carneiro

Onze dos doze doentes com isolados de *E.coli* apresentavam o clone ST131 (doentes 1-9, 11 e 12, tabela III). Em dez destes, foi isolado tanto da urina como do sangue,

Tabela III: Características dos isolados de *E.coli* recolhidos de cada doente

| Doente | Isolado | Produto biológico | Perfil genético | Grupo filogenético | β -lactamase | Sequências de inserção | Resistência às quinolonas | Integrões | Factores de virulência | Ilhas de patogenicidade | Origens de replicação |
|--------|---------|-------------------|-----------------|--------------------|--------------------------------|---|---|-----------------------|---|---------------------------------|-----------------------|
| 1 | 381 | urina | B | B2 | <i>bla</i> _{CTX-M-15} | ISEcp1 a montante de <i>bla</i> _{CTX-M-15} | <i>aac(6)-Ib-cr</i> <i>gyrA parC</i> | * | <i>fimH</i> <i>iucC</i> <i>ecpA</i> | I CFT073 II CFT073 IV 536 | FIA |
| | 382 | sangue | | | | # | # | # | # | | |
| 2 | 453 | urina | B | B2 | <i>bla</i> _{CTX-M-15} | # | # | # | <i>fimH</i> <i>iucC</i> <i>ecpA</i> | # | * |
| | 454 | sangue | | | | # | # | # | # | | |
| 3 | 538 | urina | B | B2 | <i>bla</i> _{CTX-M-15} | * | <i>gyrA parC</i> | <i>dfrA12 + aadA2</i> | <i>fimH</i> <i>iucC</i> <i>ecpA</i> | # | FIB |
| | 539 | sangue | | | | # | # | # | # | | |
| 4 | 572 | urina | B | B2 | <i>bla</i> _{CTX-M-15} | # | # | # | <i>fimH</i> <i>iucC</i> <i>ecpA</i> | # | FIA |
| | 573 | sangue | | | | # | # | # | # | | |
| 5 | 351 | urina | B | B2 | <i>bla</i> _{CTX-M-15} | # | # | # | <i>fimH</i> <i>iucC</i> <i>ecpA</i> | # | FIB |
| | 360 | sangue | | | | # | # | # | # | | |
| 6 | 613 | sangue | B | B2 | <i>bla</i> _{CTX-M-15} | # | # | # | <i>fimH</i> <i>iucC</i> <i>ecpA</i> | # | FIA |
| | 641 | urina | | | | # | # | # | # | | |
| 7 | 342 | urina | B | B2 | <i>bla</i> _{CTX-M-15} | ISEcp1 a montante de <i>bla</i> _{CTX-M-15} | <i>aac(6)-Ib-cr</i> <i>gyrA parC</i> | <750 pb | <i>fimH</i> <i>iucC</i> <i>ecpA</i> | # | FIA FIB |
| | 368 | sangue | | | | # | # | # | # | | |
| 8 | 49 | urina | B | B2 | <i>bla</i> _{CTX-M-15} | # | # | # | <i>fimH</i> <i>iucC</i> <i>ecpA</i> | # | FIA |
| | 87 | sangue | | | | # | # | # | # | | |
| 9 | 297 | urina | B | B2 | <i>bla</i> _{CTX-M-15} | # | # | # | <i>fimH</i> <i>iucC</i> <i>ecpA</i> | # | FIA |
| | 346 | sangue | | | | # | # | # | # | | |
| | 355 | pús | | | | # | # | # | # | | |
| 10 | 1434 | urina | A | D | <i>bla</i> _{CTX-M-15} | ISEcp1 a montante de <i>bla</i> _{CTX-M-15} | <i>gyrA parC</i> | <i>dfrA17 + aadA5</i> | <i>fimH</i> <i>ecpA</i> | I CFT073 IV 536 | FIA FIB |
| | 1435 | sangue | | | | # | # | # | # | | |
| | 1456 | sangue | | | | # | # | # | # | | |
| 11 | 16 | urina | B | B2 | <i>bla</i> _{CTX-M-15} | # | # | # | <i>fimH</i> <i>iucC</i> <i>ecpA</i> | # | FIA |
| | 227 | sangue | | | | # | # | # | # | | |
| | 232 | urina | C | B1 | <i>bla</i> _{AmpC-EC6} | # | # | # | * | I J96 | * |
| 12 | 140 | urina | B | B2 | <i>bla</i> _{CTX-M-15} | # | # | # | <i>fimH</i> <i>iucC</i> | # | * |
| | 144 | sangue | D | D | * | # | # | # | <i>fimH</i> <i>iucC</i> | * | FIB A/C |
| | 237 | sangue | E | D | <i>bla</i> _{AmpC-EC8} | # | <i>gyrA parC</i> | <i>dfrA17 + aadA5</i> | <i>papC</i> <i>fimH</i> <i>iucC</i> | I CFT073 IV 536 | FIA |

* Não detectado; # Não pesquisado

verificando-se que em quatro as colheitas foram em simultâneo (doentes 1-4) e nos restantes tiveram semanas, meses ou mesmo anos de intervalo, com o primeiro isolado correspondente à urina em cinco deles (doentes 5, 7-9 e 11). No doente 9, o clone ST131 foi ainda identificado uma terceira vez, a partir do pús. O doente 11 tem um terceiro isolado de urina diferente e o doente 12 apresenta apenas um isolado de urina do clone ST131 e dois isolados de sangue colhidos posteriormente com perfis genéticos diferentes. O único doente que não apresenta o clone ST131 (doente 10) tem três isolados da estirpe com o perfil genético A, dois colhidos simultaneamente de urina e sangue e um terceiro de sangue um mês depois.

Relativamente a *Klebsiella pneumoniae*, verificou-se que dos treze isolados estudados, quatro eram sensíveis a todos os antibióticos testados. Três eram resistentes ou de resistência intermédia à ceftazidina, resistentes à gentamicina e sensíveis à amoxicilina com ácido clavulânico, o que sugere a presença de uma β -lactamase do tipo TEM (figura 6a). De facto, confirmou-se por PCR que estes isolados apresentavam um gene com 100% de homologia com *bla*_{TEM-10} (figura 6b). As concentrações mínimas inibitórias foram de 0,75 μ g/mL para a cefotaxima, 96 μ g/mL para a ceftazidina, 128 μ g/mL para a gentamicina e 12 μ g/mL para a amoxicilina com ácido clavulânico (tabela IV).

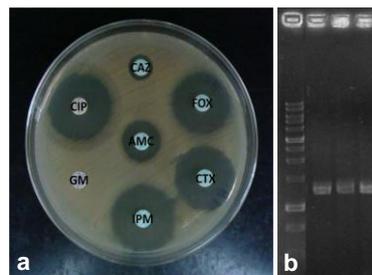


Figura 6: Isolados de *K.pneumoniae* com *bla*_{TEM-10}. a) Antibiograma usando discos dos antibióticos amoxicilina com ácido clavulânico (AMC), cefotaxima (CTX), ceftazidina (CAZ), cefoxitina (FOX), ciprofloxacina (CIP), imipenemo (IPM) e gentamicina (GM); b) Corrida dos produtos de PCR para amplificação dos genes *bla*_{TEM-type} em gel de electroforese

Cinco dos isolados apresentavam resistência à cefotaxima e resistência intermédia à ceftazidina o que, como foi dito anteriormente, é um perfil de resistência típico da presença uma β -lactamase do tipo CTX-M. Eram ainda resistentes à ciprofloxacina e à gentamicina e três deles à amoxicilina com ácido clavulânico. Um sexto isolado apresentava resistência apenas à ciprofloxacina e à gentamicina. Em dois destes, incluindo o último descrito, foi identificado o gene *bla*_{CTX-M-15} com homologias entre 98,40% e 100%; noutros dois o gene *bla*_{CTX-M-28} (homologias de 99,80 e 99,88%) e nos dois restantes não se conseguiu determinar se o gene se tratava de *bla*_{CTX-M-15} ou *bla*_{CTX-M-28}, visto que estes variam apenas

numa mutação no final da cadeia. As concentrações mínimas inibitórias de quatro destes isolados, representativos de cada perfil de resistência, estão sumarizadas na tabela IV.

Tabela IV: Concentrações mínimas inibitórias para isolados de *K.pneumoniae* multirresistentes, assim como para os respectivos plasmídeos nas estirpes de *E.coli* DH5 α transformadas

| Isolado | Gene | Isolado | | | | | Plasmídeo | | | |
|---------|-----------------------------------|---------|-----|-------|-----|-----|-----------|-----|----|-----|
| | | CTX | CAZ | GM | AMC | CIP | CTX | CAZ | GM | AMC |
| 1263 | <i>bla</i> _{CTX-M-15} | 0,5 | 1 | 64 | 16 | >32 | # | # | # | # |
| 1264 | | >256 | 32 | 128 | 16 | # | 64 | 64 | 8 | 8 |
| 1092 | <i>bla</i> _{CTX-M-15/28} | >256 | 48 | 128 | 12 | # | >256 | 64 | 12 | 6 |
| 931 | <i>bla</i> _{CTX-M-28} | >256 | 12 | >1024 | 8 | >32 | 128 | 48 | 16 | 4 |
| 776 | <i>bla</i> _{TEM-10} | 0,75 | 96 | 128 | 12 | # | # | # | # | # |

Não determinado

Através de *RAPD M13 DNA fingerprint* e PFGE, identificaram-se seis perfis genéticos diferentes (de α a ζ), cada um correspondente aos isolados de um doente (figura 7a e b). Não se detectou nenhum factor de virulência em qualquer das amostras estudadas, e nenhuma teve a capacidade de hemolisar os eritrócitos do sangue de carneiro (figura 5).

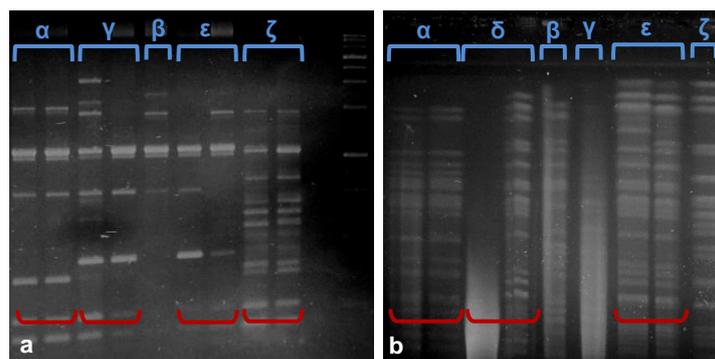


Figura 7: Perfis genéticos de isolados de *K.pneumoniae* obtidos por a) *RAPD M13 DNA fingerprint* e b) PFGE. Os traços vermelhos correspondem a isolados do mesmo doente

Por *replicon typing*, identificaram-se quatro isolados com origens de replicação 100% homólogas de IncHI1, correspondentes aos que possuíam os genes *bla*_{CTX-M-28} e *bla*_{CTX-M-15/28}, e dois com replicões FIA, portadores de *bla*_{CTX-M-15}, sendo que a pesquisa foi negativa para os isolados com o *bla*_{TEM-10} e sensíveis aos antibióticos testados.

Escolheram-se três dos isolados positivos para origens de replicação, um representante de cada clone, para proceder à transferência dos plasmídeos para estirpes de *E.coli* DH5 α electrocompetentes sensíveis aos antibióticos. Relativamente ao isolado com

IncHI1 e *bla*_{CTX-M-28}, verificou-se que a estirpe transformada adquiriu de facto um plasmídeo com aproximadamente 150kbs (figura 3a, poço 5) e um gene *bla*_{CTX-M-type} (figura 3b, poço 4), assim como resistência à cefotaxima, ceftazidina e gentamicina, mas manteve a sensibilidade à amoxicilina com ácido clavulânico – com as concentrações mínimas inibitórias de 128, 48, 16 e 4 µg/mL, respectivamente (tabela IV) – mas não foi possível amplificar a origem de replicação HI1 (figura 3b, poço 10). Quanto ao isolado com um replicação HI1 e o gene *bla*_{CTX-M-15/28}, também neste caso a estirpe transformada passou a ser resistente à cefotaxima, ceftazidina e gentamicina, mas manteve a sensibilidade à amoxicilina com ácido clavulânico – com as concentrações mínimas inibitórias de >256, 64, 12 e 6 µg/mL, respectivamente (tabela IV) – e adquiriu um gene *bla*_{CTX-M-type} (figura 3b, poço 5) e um plasmídeo com 150kbs (figura 3a, poço 6), apesar de não se ter amplificado a respectiva origem de replicação (figura 3b, poço 11). Em relação ao isolado com o replicação FIA e *bla*_{CTX-M-15}, embora não seja visível o plasmídeo extraído da estirpe transformada (figura 3a, poço 7), esta adquiriu um gene *bla*_{CTX-M-type} e uma origem de replicação FIA (figura 3b, poços 6 e 12), assim como resistência à cefotaxima e ceftazidina, mas manteve a sensibilidade à gentamicina e à amoxicilina com ácido clavulânico, com as concentrações mínimas inibitórias de 64, 32, 8 e 8 µg/mL (tabela IV).

Efectuou-se a ainda pesquisa de sequências de inserção e de integroes de classe I nestes três isolados, tendo-se obtidos resultados negativos para todos. Pesquisaram-se também os integroes para um dos produtores da β-lactamase de espectro alargado TEM-10, amplificando-se um com os genes de resistência *aadB1* e *dfrA15*, com 99,25% e 97,70% de homologia, respectivamente.

Os genes e alelos que conferem resistência às quinolonas foram também pesquisados nos mesmos três isolados escolhidos para transformação, visto serem resistentes a estes antibióticos. No entanto, em nenhum deles foi possível amplificar o gene *gyrA*, visto que os primers foram desenhados especificamente para *E.coli*, não apresentando uma homologia de 100% para *K.pneumoniae*. Relativamente a ParC, apresentava as substituições Ser80Ile e Glu84Val nas amostras com *bla*_{CTX-M-28} e *bla*_{CTX-M-15/28}, sendo a sequenciação do gene no isolado portador de *bla*_{CTX-M-15} inconclusiva. Nenhum apresentava *aac(6)-Ib*, mas dois dos isolados tinham genes do tipo *qnr*: *qnrB1* no isolado com *bla*_{CTX-M-28} e *qnrS1* no que possuía *bla*_{CTX-M-15}, ambos com 100% de homologia.

Em termos de doentes, dois deles (doentes 1 e 2, tabela V) apresentavam dois isolados sensíveis aos antibióticos testados. Os do doente 1, colhidos no mesmo dia, apresentavam o perfil genético α, enquanto que os do doente 2 com o perfil β, foram isolados com mês e meio de intervalo, sendo o primeiro o do sangue. O doente 3 (tabela V) tinha três isolados com o perfil genético γ, portadores de *bla*_{TEM-10}, os dois primeiros colhidos a partir da urina com um mês de intervalo e o último a partir do sangue passados

quinze dias. Os do doente 4 (tabela V), com *bla*_{CTX-M-28}, apresentam o perfil genético δ e foram colhidos com nove dias de diferença, sendo o primeiro o de urocultura. O doente 5 (tabela V) tinha dois isolados *bla*_{CTX-M-15/28} com o perfil genético ϵ , o primeiro colhido do sangue e o segundo da urina três meses depois, e o último doente (6, tabela V) possui dois isolados com o perfil genético ζ e o gene *bla*_{CTX-M-15} colhidos simultaneamente.

Tabela V: Características dos isolados de *K.pneumoniae* recolhidos de cada doente

| Doente | Isolado | Produto biológico | Perfil genético | β -lactamase | Sequências de inserção | Genes de resistência às quinolonas | Integrões | Factores de virulência | Origens de replicação |
|--------|---------|-------------------|-----------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------------------|--------------------------------|------------------------|-----------------------|
| 1 | 1208 | urina | α | # | # | # | # | * | * |
| | 1209 | sangue | | | | | | | |
| 2 | 901 | sangue | β | # | # | # | # | * | * |
| | 907 | urina | | | | | | | |
| 3 | 774 | urina | γ | <i>bla</i> _{TEM-10} | # | # | # | * | * |
| | 775 | urina | | | | | <i>aadB1+</i> <i>dfrA15</i> | | |
| | 776 | sangue | | | | | # | | |
| 4 | 931 | urina | δ | <i>bla</i> _{CTX-M-28} | * | <i>parC</i> <i>qnrB1</i> | * | * | HI1 |
| | 935 | sangue | | | # | # | | | |
| 5 | 1092 | sangue | ϵ | <i>bla</i> _{CTX-M-15/28} | * | <i>parC</i> | * | * | HI1 |
| | 1119 | urina | | | # | # | | | |
| 6 | 1263 | urina | ζ | <i>bla</i> _{CTX-M-15} | * | <i>qnrS1</i> | * | * | FIA |
| | 1264 | sangue | | | # | # | | | |

* Não detectado; # Não pesquisado

Discussão

Relativamente aos resultados obtidos para *E.coli*, verifica-se que existe um clone predominante, com o perfil genético B (vinte e dois em vinte e oito isolados), que segundo o esquema de MLST da University College Cork corresponde à estirpe ST131, já descrita noutros países ⁽⁵⁰⁾. Os restantes isolados pertencem aos perfis genéticos A, C, D e E. A predominância do clone B (ST131) reflecte-se obviamente na prevalência dos seus factores de virulência e de resistência, assim como de outras características.

Assim, verifica-se que o grupo filogenético B2, ao qual correspondem apenas os isolados do clone B, é o mais representado, seguido do grupo D, com os clones A, D e E, e do grupo B1, apenas com o isolado C, sendo que nenhuma amostra pertence ao grupo A. Estes resultados estão de acordo com o esperado, já que vários estudos têm apontado o grupo filogenético B2 como o mais virulento, seguido do D, e mais representado em estirpes uropatógenicas ^(35,36).

Vinte e cinco dos isolados, correspondentes aos perfis genéticos A e B apresentavam a ESBL CTX-M-15, considerada como uma das mais prevalentes ⁽⁶⁾. Seguindo o historial dos isolados multirresistentes recolhidos no Hospital de Santa Maria desde 1999, verifica-se que foi identificada pela primeira vez no final de 2000, tornando-se cada vez mais frequente em detrimento das TEM-type (Professora Aida Duarte, comunicação pessoal), demonstrando que Portugal segue a tendência mundial. Esta enzima derivou da CTX-M-3 pela substituição Asp240Gly, que lhe confere um aumento da resistência à ceftazidina comparativamente às outras CTX-M-type ⁽⁵⁰⁾, dando-lhe uma vantagem evolutiva que pode ser a razão do seu sucesso. Yu *et al.* descreveram-na como apresentando uma concentração mínima inibitória >256 µg/mL para a cefotaxima e >128 µg/mL para a ceftazidina ⁽⁵¹⁾, no entanto as estirpes isoladas ou transformadas com os plasmídeos codificando o gene *bla*_{CTX-M-15} apresentaram valores entre 256 e 64 µg/mL para a cefotaxima e 64 e 28 µg/mL para a ceftazidina. Segundo Coque *et al.*, esta enzima tem-se espalhado pelo globo através de duas estirpes de *E.coli*, ST131 e ST405, ambas já descritas em Portugal ⁽⁵⁰⁾. Também no hospital de Santa Maria o gene *bla*_{CTX-M-15} está presente na *E.coli* ST131 e pelo menos noutra estirpe pertencente ao grupo filogenético D, tal como ST405.

As β-lactamases de espectro alargado, como CTX-M-type e TEM-type, são inibidas pelo ácido clavulânico, mas alguns dos isolados portadores destas enzimas apresentavam resistência à amoxicilina com ácido clavulânico, o que demonstra que também devem codificar uma β-lactamase TEM resistente aos inibidores, conhecidas por IRTs. De facto, as estirpes DH5α transformadas com os plasmídeos que transportavam *bla*_{CTX-M-15} apresentam sensibilidade à amoxicilina com ácido clavulânico, com concentrações mínimas inibitórias entre 4 e 8 µg/mL, independentemente de a estirpe dadora ser ou não resistente.

Dois dos isolados codificavam enzimas do tipo AmpC homólogas de AmpC-EC6 e AmpC-EC8, descritas por Mammeri *et al.* em *E.coli* ⁽⁴⁹⁾. Segundo os autores, há uma relação entre o grupo filogenético e o tipo de AmpC, e de facto AmpC-EC8 está presente num isolado do grupo filogenético D também neste estudo, mas já AmpC-EC6 foi descrito num isolado do grupo filogenético B2 e neste caso está presente num B1, tido como predominantemente comensal. É de salientar que na presença de cloxacilina, estas estirpes apresentam sensibilidade às cefalosporinas, o que demonstra que não codificam outras β-lactamases (ESBL) cujo fenótipo seria mascarado pela expressão da cefalosporinase AmpC.

Apenas um dos isolados apresentava sensibilidade a todos os antibióticos testados, podendo tratar-se de uma estirpe associada a infecções da comunidade.

Relativamente aos genes e alelos que conferem resistência às quinolonas, verificou-se que todos os isolados de *E.coli* em que foi feita a pesquisa apresentavam as

substituições Ser83Leu e Asp87Asn em GyrA, e à excepção do isolado com o perfil genético A, que só apresentava Ser80Ile, tinham as substituições Ser80Ile e Glu84Val em ParC. Estas mutações têm sido apontadas como as que conferem maior resistência às quinolonas⁽¹⁰⁾, principalmente em *gyrA*, já que se tratam de microrganismos Gram-negativos. Dois dos três isolados com o perfil genético B (ST131) apresentavam ainda alelo *aac(6)-Ib-cr*, não tendo sido identificados outros genes plasmídicos de resistência a quinolonas frequentes em *K.pneumoniae* (*qnrA*, *B* ou *S*).

É de salientar que, segundo alguns autores, o grupo filogenético B2 está tipicamente associado a estirpes sensíveis a quinolonas, o que neste estudo não se verifica⁽³⁷⁾. Assim, será mais plausível pensar nas características de um determinado grupo filogenético em termos geográficos, podendo dizer-se que em Portugal, pelo menos no hospital de Santa Maria, o grupo B2 apresenta isolados resistentes às quinolonas e fluoroquinolonas.

Nos isolados de *E.coli*, os factores de virulência mais prevalentes foram *fimH* e *iucC* em vinte e sete e vinte e quatro isolados, sendo o gene *ecpA* também muito frequente, estando presente em vinte e seis destes. Apenas um isolado foi positivo para *papC*, e os restantes factores de virulência não foram detectados em nenhuma das amostras. Tendo em conta que as estirpes com factores de virulência pertencem aos grupos filogenéticos B2 e D, confirma-se que de facto estes estão associados a estirpes virulentas. No entanto, contrariamente ao que tem sido sugerido, nas estirpes de *E.coli* deste estudo uma maior resistência não é sinónimo de menor virulência, e *vice-versa*.

Os factores de virulência encontrados nestas estirpes são os mais frequentes em isolados de infecções urinárias. As fímbrias de tipo 1 permitem a adesão das *E.coli* ao epitélio da bexiga e posterior invasão do tecido, as fímbrias P possibilitam a colonização dos rins e a aerobactina facilita a obtenção do ião Fe^{3+} . EcpA, por sua vez, é responsável pela adesão aos enterócitos e mimetismo da flora comensal, o que indica que os clones com os perfis genéticos A e B (com *ecpA*) têm a capacidade de permanecer no intestino, tido como o reservatório das estirpes patogénicas responsáveis por infecções recorrentes.

O clone com o perfil genético A apresenta as ilhas de patogenicidade PAI IV₅₃₆, codificante do sistema de produção da yersiniabactina, e PAI I_{CFT073}, com genes para α -hemolisina, fímbrias P, aerobactina e sistema de transporte de carboidratos. No entanto, a pesquisa dos genes *hlyA*, *papC* e *iucC* foi negativa, o que pode ser justificado pelo facto de os primers para a detecção da PAI I_{CFT073} amplificarem uma zona específica na região terminal a 5', sendo possível que tenham ocorrido deleções de outras regiões. Por outro lado, verifica-se que o gene *hlyA* é pouco conservado, e consequentemente os primers usados para a sua detecção não apresentam 100% de homologia com todas as variantes alélicas, podendo estes isolados apresentar uma com baixa afinidade para os primers, não amplificando. O facto de nenhuma das estirpes ter hemolisado os eritrócitos do sangue de

carneiro não comprova que o gene não esteja presente, nem mesmo que a enzima em causa não tenha a capacidade de lisar eritrócitos humanos, deixando a última hipótese em aberto. Situação comum ocorre para o clone com o perfil genético B, positivo para as ilhas de patogenicidade PAI IV₅₃₆, PAI I_{CFT073} e PAI II_{CFT073} (com os genes para as fímbrias P e reguladores do metabolismo do ferro, em que os primers emparelham no gene codificante da enterobactina) cujos PCRs para amplificação dos genes *papC* e *hlyA* foram negativos. O isolado portador de *bla*_{AmpC-EC6}, com o perfil genético C, negativo para todos os factores de virulência estudados, apresenta um resultado positivo para PAI I_{J96}, com os genes para a α -hemolisina e as fímbrias P. Os primers reconhecem um alelo do gene *papGI* específico desta ilha de patogenicidade, mas o isolado não apresenta *papC*, portanto o operão está incompleto, não ocorrendo provavelmente a expressão do pílus P. Não foram identificadas ilhas de patogenicidade no isolado com o perfil genético D, sensível para os antibióticos testados, mas para o correspondente ao perfil genético E identificaram-se as PAI IV₅₃₆ e PAI I_{CFT073}, apesar do gene *hlyA* não ter amplificado.

Assim, facilmente se conclui que este método de detecção de ilhas de patogenicidade é de facto rápido, mas só pode ser usado como uma primeira abordagem, indicando a possível existência de uma determinada ilha. Apesar de amplificarem zonas específicas para cada uma, podem ocorrer vários eventos de deleção ou inserção após a sua aquisição por uma determinada estirpe, modificando-a de tal forma que já não possa ser considerada a mesma PAI. Deste modo, não se pode concluir que nos isolados em questão estão presentes as ilhas de patogenicidade cujos resultados foram positivos, mas a amplificação dos seus fragmentos típicos sugere que pelo menos estas já estiveram presentes ou que existem outras ainda não descritas que partilham de certas características com as já conhecidas. Estes dados apontam mais uma vez para o carácter virulento dos isolados em estudo, já que as ilhas de patogenicidade, e portanto os seus fragmentos característicos, só existem em estirpes patogénicas. Verificou-se ainda que os amplicões mais comuns nestes isolados são os correspondentes às PAI IV₅₃₆ (a mais comum em estirpes isoladas a partir de infecções do tracto urinário) e PAI I_{CFT073}, e que a maioria dos clones apresentava ilhas de patogenicidade típicas de diferentes estirpes, nomeadamente de *E.coli* CFT073 e 536, o que demonstra a dinâmica da transferência horizontal destes fragmentos.

Relativamente aos grupos de incompatibilidade dos plasmídeos detectados em *E.coli*, vinte isolados foram positivos para IncFIA, dez para IncFIB, um para IncN, um para IncY e um para IncA/C, portanto pode dizer-se que os plasmídeos da família IncF são predominantes. Dos vinte e dois isolados com perfil genético B (ST131), catorze apresentavam FIA, quatro FIB e dois transportavam ambas as origens de replicação; já os isolados correspondentes ao perfil A apresentavam tanto FIA como FIB. Tendo em conta a

presença de *bla*_{CTX-M-15} nestes isolados, os plasmídeos IncF apresentavam-se como fortes candidatos à sua codificação. Através da transferência dos plasmídeos de um dos isolados apenas com FIA (perfil B) e de um com FIA e FIB (perfil A) para uma estirpe de *E.coli* DH5 α sensível, comprovou-se que de facto transportam o gene *bla*_{CTX-M-15}. O produto de extracção de plasmídeos da estirpe transformada com FIA e FIB apresenta um resultado de PCR positivo para ambas as origens de replicação, mas apenas uma banda no gel de corrida dos plasmídeos, sendo provável que os isolados positivos para FIA e FIB apresentem apenas um plasmídeo com ambas as origens de replicação, mas também é possível que existam dois, um de cada grupo de incompatibilidade, com o mesmo tamanho aproximado. Este(s) plasmídeo(s) têm cerca de 150kbs, o que explica a dificuldade de transferência, e tendo em conta que pertencem ao grupo F prevê-se que tenham um baixo número de cópias por célula. Não foi possível confirmar a presença de *bla*_{CTX-M-15} nos plasmídeos IncFIB, já que a transferência do plasmídeo para uma estirpe sensível não teve sucesso, mas é muito provável que se verifique tendo em conta que são os únicos plasmídeos identificados em vários isolados com *bla*_{CTX-M-15}.

Em duas amostras positivas para *bla*_{CTX-M-15} não foram identificadas origens de replicação, o que pode ser justificado pela inserção do gene no cromossoma seguido da perda do plasmídeo. De facto, no isolado com FIA e nos isolados com FIA e FIB usados na transformação foram identificadas sequências de inserção do tipo *ISEcp1* a montante de *bla*_{CTX-M-15}, confirmando a capacidade de mobilidade deste gene.

No isolado com o perfil genético C não foram identificadas origens de replicação, o que confirma a localização cromossomal do gene *bla*_{AmpC-EC6}. Já o isolado com o perfil genético E, positivo para *bla*_{AmpC-EC8}, apresenta IncFIA, logo o fenótipo de resistência às cefalosporinas tanto pode ser devido a uma cópia do gene no plasmídeo como à sobreexpressão do gene cromossomal. O isolado com o perfil D apresentava duas origens de replicação, e apresentava sensibilidade aos antibióticos testados.

Em três dos quatro isolados de *E.coli* em que se pesquisaram integrões os resultados foram positivos. Verificou-se que as enzimas codificadas na zona variável de cada um eram diferentes, o que demonstra a elevada capacidade de aquisição e perda de genes destes elementos móveis. No entanto, todos eles conferiam resistência, os da família *dfrA* – codificantes da dihidrofolato redutase – ao trimetopim e os da *aadA* – codificantes da aminoglicósido adeniltransferase – aos aminoglicosídeos, justificando a resistência dos isolados à gentamicina.

Onze dos doze doentes com isolados de *E.coli* apresentavam a mesma estirpe na urina e no sangue, tratando-se provavelmente de infecções com a mesma origem. Destes, dez correspondem ao clone com o perfil genético B (ST131), conhecido no hospital de Santa Maria desde 2000 como o mais prevalente e predominante, sendo responsável por um

elevado número de infecções nosocomiais, portanto trata-se de uma estirpe endémica do hospital. A *E.coli* ST131 já foi identificada em vários países – nomeadamente França, Suíça, Portugal, Espanha, Reino Unido, Itália, Turquia, Canadá, Índia, Coreia, Kuwait e Líbano ^(50,52) – verificando-se que efectivamente pertence ao grupo filogenético B2 e possui *bla*_{CTX-M-15} com *ISEcp1* a montante. Este gene está codificado em plasmídeos com o replicação FII (não detectado nos isolados do hospital de Santa Maria), às vezes em combinação com FIA e/ou FIB, cujas dimensões podem variar entre 85 e 160 kbs ⁽⁵⁰⁾. A maioria destes isolados apresentavam os factores de virulência *fimH*, *sat* (toxina), *fyuA* (receptor para a yersiniabactina) *usp*, *malX* (gene específico da PAI I_{CF7073}), *iha* (receptor de sideróforos), *kpsM II* (exportação de polissacarídeos através da membrana citoplasmática), *iutA* (receptor da aerobactina) e *ompT* (protease T da membrana externa) ⁽⁵²⁾. De facto, ST131 é uma estirpe virulenta e resistente, associada a infecções do tracto urinário ⁽⁵⁰⁾, e que tem grande sucesso não só em Portugal como também noutros países. Esta vantagem evolutiva deve-se não só aos vários factores de virulência e genes que conferem resistência a diferentes classes de antibióticos que codifica, como também aos plasmídeos IncF, conhecidos pela sua elevada capacidade de recombinação entre si e portanto grande variedade, permitindo a adaptação a diferentes ambientes.

Nalguns doentes, o clone ST131 foi recolhida a partir de urina e de sangue com semanas, meses ou anos de intervalo, demonstrando ter a capacidade de se manter no organismo do hospedeiro durante longos períodos de tempo, originando infecções recorrentes. Verifica-se ainda que nalguns casos o primeiro isolado é proveniente de urocultura e o segundo de hemocultura, estando de acordo com a noção de que as infecções urinárias são a principal causa das bacterémias, existindo mesmo um doente com o primeiro isolado de urocultura, o segundo de hemocultura e um terceiro de pús, demonstrando a disseminação da infecção tendo como foco primário o tracto urinário.

Tanto o clone ST131 como a estirpe com o perfil genético A – que também e manteve no organismo do hospedeiro durante um mês – apresentam os genes *fimH* e *ecpA*. Tendo em conta o papel do *E.coli common pilus* (ECP) na manutenção e mimetismo dos microrganismos no intestino (o reservatório de estirpes patogénicas responsáveis por infecções recorrentes) e o facto de estes isolados terem a capacidade de se manterem no organismo hospedeiro durante longos períodos de tempo, pode dizer-se que este pílus parece ser determinante para o sucesso das estirpes em questão. As fímbrias do tipo 1 também têm um papel importante, já que é conhecida a sua capacidade de promover internalização nas células do epitélio da bexiga, permitindo não só um fácil acesso à corrente sanguínea como também uma protecção em relação à antibioterapia. Assim, estes microrganismos parecem ter a capacidade de passar arbitrariamente para os sistemas urinário, digestivo e sanguíneo conforme as necessidades, mantendo-se no organismo

hospedeiro durante longos períodos de tempo, o que aumenta as hipóteses de transmissão e lhes confere um elevado sucesso evolutivo.

Quanto a *Klebsiella pneumoniae*, apesar de o número de isolados presentes no estudo ser menor do que para *E.coli*, existe uma maior variabilidade, já que a cada doente corresponde um clone, no total de 6, e todos foram recolhidos tanto na urina como no sangue.

Também em *K.pneumoniae* os genes de resistência $bla_{\text{CTX-M-type}}$ parecem ser predominantes, de acordo com a tendência global, mas neste caso identificou-se não só $bla_{\text{CTX-M-15}}$ como também $bla_{\text{CTX-M-28}}$. Estes genes diferem apenas no aminoácido 289 (Asp ou Thr), o que é suficiente para fazer variar a susceptibilidade à ceftazidina. De facto, a concentração mínima inibitória deste antibiótico para o gene $bla_{\text{CTX-M-28}}$ foi apenas de 12 µg/mL na estirpe selvagem e de 48 µg/mL na estirpe transformada com o respectivo plasmídeo, enquanto para $bla_{\text{CTX-M-15}}$ variou entre 24 e 64 µg/mL. Visto que a única diferença nucleotídica entre os dois genes ocorre apenas no final da cadeia, no caso de a sequenciação não abranger essa zona não é possível distingui-los, tal como aconteceu com os dois genes identificados como $bla_{\text{CTX-M-15/28}}$. No entanto, por comparação das concentrações mínimas inibitórias para a ceftazidina conferidas por este gene (48 µg/mL no isolado clínico e 64 µg/mL na estirpe transformada com o respectivo plasmídeo), com as dos genes $bla_{\text{CTX-M-15}}$ e $bla_{\text{CTX-M-28}}$ conclui-se-se que os isolados apresentam $bla_{\text{CTX-M-15}}$.

Um dado surpreendente neste estudo foi o facto de um isolado com um gene apresentando 100% de homologia com $bla_{\text{CTX-M-15}}$ não ser resistente às cefalosporinas de terceira geração, parecendo ter ocorrido a inibição da sua expressão, o que se pode dever a mutações no promotor. Tendo em conta que esta mesma estirpe foi isolada no mesmo dia a partir do sangue apresentando uma expressão normal da enzima, pode concluir-se que a mutação ocorreu após a recolha.

Contrariamente a *E.coli*, não foram identificadas sequências de inserção a montante ou a jusante de $bla_{\text{CTX-M-15}}$, o que pode indicar que de facto não existem ou que simplesmente estão mais afastadas do gene do que em *E.coli*, não sendo possível a sua amplificação através do método usado. O único integrão detectado, com os genes *aadB1* (que confere resistência aos aminoglicósidos, justificando a resistência à gentamicina) e *dfrA15*, pertencia ao isolado codificante da β-lactamase de espectro alargado TEM-10, verificando-se que as estirpes com enzimas CTX-M-type não apresentavam nenhum.

Quanto aos genes e alelos de resistência às quinolonas, verificou-se que pelo menos dois isolados apresentavam as substituições Ser80Ile e Glu84Val em ParC, tal como em *E.coli*, conhecidas por aumentarem o fenótipo de resistência às quinolonas caso *gyrA* esteja mutado. Verificou-se ainda que, contrariamente a *E.coli*, nenhum dos isolados apresentava *aac-(6)-Ib-cr*, mas dois dos três testados possuíam genes do tipo *qnr*, nomeadamente

qnrB1 e *qnrS1*, que conferem um baixo grau de resistência às quinolonas. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, que apontam para a existência de *aac(6)-Ib-cr* essencialmente em *E.coli* e *qnr* em *K.pneumoniae*. Tendo em conta que as concentrações mínimas inibitórias para a ciprofloxacina foram superiores a 32 µg/mL para todos os isolados testados, as mutações em *parC* conjuntamente com os genes *qnr* não parecem ser suficientes para conferirem este fenótipo, presumindo-se portanto que *gyrA* esteja mutado nas regiões QRDR nestas estirpes.

Relativamente aos factores de virulência, nenhum foi detectado, mas pelo facto de não ter sido possível usar controlos positivos não se pode concluir que os genes não estão presentes. Por outro lado, os conhecimentos relativamente a factores de virulência em *K.pneumoniae* ainda estão muito atrasados comparativamente a *E.coli*, e poucos foram caracterizados e associados a infecções de tracto urinário ou a bacterémias, sendo provável que estas estirpes sejam virulentas mas os seus determinantes genéticos de virulência ainda não tenham sido identificados. Quanto ao facto de não terem capacidade de hemolisar os eritrócitos do sangue de carneiro, não demonstra que não o façam para eritrócitos humanos, podendo estar presente uma hemolisina apesar de não detectada, tal como em *E.coli*.

Os resultados da técnica de *replicon typing* demonstram que os isolados com *bla*_{CTX-M-28} e *bla*_{CTX-M-15/28} apresentam plasmídeos com replicões IncHI1 e os que possuem *bla*_{CTX-M-15} apresentam origens de replicação FIA. Assim, em *K.pneumoniae* os genes de resistência *bla*_{CTX-M-type} parecem ser transportados essencialmente por plasmídeos IncHI1, mas também por IncFIA, deixando em aberto a possibilidade de transferência horizontal deste último entre *E.coli* e *K.pneumoniae*. Tendo em conta que nas estirpes transformadas por plasmídeos com os genes *bla*_{CTX-M-28} e *bla*_{CTX-M-15/28} a amplificação de IncHI1 não foi possível, é legítimo supor que estes genes não estejam codificados nos plasmídeo IncHI1, mas sim noutros cuja origem de replicação não é detectada pela técnica. No entanto, é pouco provável que os quatro isolados com *bla*_{CTX-M-28} e *bla*_{CTX-M-15/28} tenham um único plasmídeo identificado, o mesmo em todos, e que não seja o portador dos genes *bla*_{CTX-M-type}. Já nos isolados que possuem *bla*_{TEM-10} não foi detectada nenhuma origem de replicação, portanto este gene parece ter uma localização cromossomal.

Também as estirpes de *K.pneumoniae* parecem ter a capacidade de permanecer no organismo hospedeiro durante meses, tal como *E.coli*, portanto é possível que nestes microrganismos exista um pílus homólogo a ECP que lhes permita permanecer no cólon e mimetizar a flora comensal. De facto, está identificado no Genbank um gene de *K.pneumoniae* designado *matB* (outro nome para *ecpA*) com 98% de homologia com *ecpA* de *E.coli*, cuja função poderá ser determinada em estudos futuros.

Existem ainda dois casos de doentes (2 e 5, tabela IV) em que o primeiro isolado recolhido foi o de hemocultura e não o de urucultura, podendo dizer-se que estes

microrganismos também têm a capacidade de passar entre os sistemas urinário, digestivo e sanguíneo conforme as necessidades, tal como acontece em *E.coli*.

Por limitações de tempo e de amostragem, algumas questões ficaram ainda por responder no final deste estudo, principalmente em relação a *K.pneumoniae*, cuja literatura não é tão vasta como para *E.coli*. Este trabalho poderá servir de base para a elaboração de projectos futuros de determinação do papel das fímbrias de tipo 1 e ECP na manutenção dos microrganismos no hospedeiro e de caracterização dos plasmídeos de cada uma das estirpes deste hospital.

Conclusão

Verificou-se que no hospital de Santa Maria existe um clone de *E.coli* (ST131) endémico desde 2000. Este clone pertence ao grupo filogenético B2, é produtor da β -lactamase de espectro alargado CTX-M-15, codificada em plasmídeos IncFIA, IncFIB ou com ambos os replicões, e o seu genoma codifica genes de resistência a várias classes de antibióticos e factores de virulência, muitos deles organizados em ilhas de patogenicidade. A sua capacidade de permanecer no organismo hospedeiro durante longos períodos de tempo pode ser conferida pelas fímbrias ECP ao nível do tracto intestinal e de tipo 1 no tracto urinário. De salientar ainda que tanto a resistência como a virulência parecem ser cruciais para o sucesso de uma estirpe nosocomial.

Referências bibliográficas

1. Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção Associada aos Cuidados de Saúde (PNCI), 2007, Direcção-Geral da Saúde
2. Tumbarello M *et al.* 2006. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(2):498-504
3. Kang CI *et al.* 2004. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(12):4574-4581
4. Sousa JC 2005. Manual de Antibióticos Antibacterianos. Ed. Universidade Fernando Pessoa, Porto, p.107
5. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. 1995. *Antimicrob Agents Chemother* **39**(6):1211-1233
6. Marcadé G. *et al.* 2009. *J Antimicrob Chemother* **63**, 67–71
7. Paterson DL, Bonomo RA. 2005. *Clin Microbiol Rev*, **18**(4):657-686
8. Oliphant CM, Green GM. 2002. *Am Fam Physician* **65**(3):455-464

9. Jacoby GA. 2005. *Clin Infect Dis* **41**(Suppl 2):S120-126
10. Takahashi A *et al.* 2009 *J Clin Microbiol* **47**(3):791-795
11. Robicsek A *et al.* 2006. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(8):2872-2874
12. Robicsek A *et al.* 2006. *Nature Med* **12**(1):83-88
13. Eckert C *et al.* 2004. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(4):1249-1255
14. Mendonça N *et al.* 2007. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(6):1946-1955
15. Lévesque C *et al.* 1995. *Antimicrob Agents Chemother* **39**(1):185-191
16. Caratolli A. 2001. *Vet Res* **32**:243-259
17. Carattoli A *et al.* 2005. *J Microbiol Methods* **63**:219-228
18. Marques N, Araújo F, Ducla-Soares JL. 2005. *Medicina Interna*, **12**(4):203-208
19. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004. *Nat Rev Microbiol* **2**:123-140
20. Ruiz J *et al.* 2002. *J Clin Microbiol* **40**(12):4445-4449
21. Jagnow J, Clegg S. 2003. *Microbiology* **149**: 2397-2405
22. Mulvey MA. 2002. *Cell Microbiol* **4**(5):257-271
23. Lawlor MS, O'Connor C, Miller VL. 2007. *Infect Immun* **75**(3):1463-1472
24. Panina EM, Mironov AA, Gelfand MS. 2001. *Nucleic Acids Res* **29**(24): 5195-5206
25. Schmidt H, Hensel M. 2004. *Clin Microbiol Rev* **17**(1):14-56
26. Yin-Ching C *et al.* 2002. *Microb Pathog* **33**(1):1-6
27. Smith YC *et al.* 2008. *Infect Immun* **76**(7):2978-2990
28. Parret A, De Mot R. 2002. *Microbiology* **148**:1604-1606
29. Rijavec M *et al.* 2008. *J Med Microbiol* **57**:1329-1334
30. Rendón MA *et al.* 2007. *Proc Natl Acad Sci* **104**(25):10637-10642
31. Pouttu R *et al.* 2001. *J Bacteriol* **183**:4727-4736
32. Saldaña Z *et al.* 2009. *J Bacteriol* **191**(11):3451-3461
33. Russo TA *et al.* 1995. *J Infect Dis* **172**:440-445
34. Sabaté M *et al.* 2006. *Clin Microbiol Infect* **12**(9): 880-886
35. Picard B *et al.* 1999. *Infect Immun* **67**:546-553
36. Johnson JR *et al.* 2005. *J Clin Microbiol* **43**(12):6064-6072
37. Piatti G *et al.* 2008. *J Clin Microbiol* **46**(2):480-487
38. Wirth T *et al.* 2006. *Mol Microbiol* **60**(5):1136-1151
39. Jaureguy F *et al.* 2008. *BMC Genomics*, **9**:560
40. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 18th Informational Supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 2008, M100-**S18**: 34-38.
41. Grundmann HJ *et al.* 1997. *J Clin Microbiol* **35**(12):3071-3077
42. Maslow J N, Slutsky A M, Arbeit R D. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. *In: Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and*

Applications (Persing D H, Smith T F, Tenover F C, White T J , Eds.). 1993, pp. 563-572, *American Society for Microbiology*, Washington, DC.

43. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000. *Appl Environ Microbiol* **66**:4555-4558
44. Conceição T *et al.* 2005. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(1): 477-478
45. Lindgren P, Karlsson A, Hughes D. 2003. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(10):3222-3232
46. Wang A *et al.* 2008. *BMC Infectious Diseases* **8**:68
47. Usein C *et al.* 2001. *J Cell Mol Med* **5**(3):303-310
48. Stahlhut SG *et al.* 2009. *J Bacteriol* **91**(6):1941-50
49. Mammeri H *et al.* 2006. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(7): 2573-2576
50. Coque TM *et al.* 2008. *Emerg Infect Dis* **14**(2):195-200
51. Yu W *et al.* 2004. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(1): 362-363
52. Nicolas-Chanoine M *et al.* 2008. *J Antimicrob Chemother* **61**: 273-281

Anexos

Tabela SI: Primers escolhidos para o *Multilocus Sequence Typing* desenvolvido na Universidade College Cork

| Gene | Primers | Tamanho do fragmento |
|-------------|---|----------------------|
| <i>adk</i> | F: 5'-ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG-3' | 583 pb |
| | R: 5'-CCGTCAACTTTCGCGTATTT-3' | |
| <i>fumC</i> | F: 5'-TCA CAGGTGCGCA GCGCTTC-3' | 806 pb |
| | R: 5'-GTA CGCAGCGAAAAA GATTC-3' | |
| <i>gyrB</i> | F: 5'-TCGGCGACA CGGATGACGGC-3' | 911 pb |
| | R: 5'-ATCA GGCCTTCACGCGCATC-3' | |
| <i>icd</i> | F: 5'-ATGAAA GTAAAGTA GTTGTCCGGACA-3' | 878 pb |
| | R: 5'-GGACGCA GCA GGATCTGT-3' | |
| <i>mdh</i> | F: 5'-ATGAAAGTCGCA GTCCTCGCGCTGCTGGCGG-3' | 932 pb |
| | R: 5'-TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATA TCTTTCTT-3' | |
| <i>purA</i> | F: 5'-CGCGCTGATGAAA GAGATGA-3' | 816 pb |
| | R: 5'-CATA CGGTAAGCCA CGCAGA-3' | |
| <i>recA</i> | F: 5'-CGCA TTCGCTTTA CCCTGACC-3' | 780 pb |
| | R: 5'-TCGTGAAA TCTACGGACCGGA-3' | |

F: forward primer; R: reverse primer

Tabela SII: Primers e condições das reacções de PCR para amplificação dos genes de resistência

| Gene | Primers | Reacção de PCR | | | | Tamanho do ampliação | Ref. |
|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------|--------------|---------------|----------------|----------------------|-------------------------|
| | | Desnaturação inicial | Nº de ciclos | Ciclos | Extensão final | | |
| <i>bla_{CTX-M-type}</i> | F: 5'-SCSATGTGCAGYACCAAGTAA-3' | 94°C, 3 min | 20 | 94°C, 1 min | 72°C, 7 min | 490 pb | Conceição <i>et al.</i> |
| | R: 5'-CCGCRATATGRTTGGTGGTG-3' | | | 61°C, 1 min | | | |
| <i>bla_{CTX-M-1}</i> | F: 5'-ATGGTTAAAAATCACTGCGYC-3' | 94°C, 3 min | 35 | 94°C, 1 min | 72°C, 7 min | 850 pb | |
| | R: 5'-TTACAAACCGTCGGTG-3' | | | 60°C, 1 min | | | |
| <i>bla_{TEM-type}</i> | F: 5'-CACTCAAGGATGTATTGTG-3' | 95°C, 3 min | 35 | 94°C, 90s | 70°C, 9 min | 1000 pb | Presente estudo |
| | R: 5'-GGTGCCTCACTGATTAAGCAATTGGTAA-3' | | | 56°C, 90s | | | |
| <i>bla_{AmpC-type}</i> | F: 5'-ATGTTCAAAACGACGCTCTG-3' | 94°C, 3 min | 35 | 94°C, 1 min | 72°C, 7 min | 1000 pb | Presente estudo |
| | R: 5'-CGGTAACCTCGCTGGATTG-3' | | | 60°C, 1 min | | | |
| <i>qnrA</i> | F: 5'-GATAAAGTTTTTCAGCAAAGAGG-3' | 94°C, 10 min | 32 | 95°C, 45s | 72°C, 10 min | 500 pb | Wang <i>et al.</i> |
| | R: 5'-GATCGGCAAAGGTCAGGTCA-3' | | | 53°C, 45s | | | |
| <i>qnrB</i> | F: 5'-GATCGTGAAAGCCAGAAAGG-3' | 94°C, 10 min | 32 | 95°C, 45s | 72°C, 10 min | 500 pb | |
| | R: 5'-CGAYGCTGGTAGTTGTCC-3' | | | 53°C, 45s | | | |
| <i>qnrS</i> | F: 5'-ACGACATTCGTCAACTGCAA-3' | 94°C, 10 min | 32 | 95°C, 45s | 72°C, 10 min | 400 pb | |
| | R: 5'-TAAATTGGCAACCTGTAGGC-3' | | | 53°C, 45s | | | 72°C, 1 min |
| <i>gyrA</i> | F: 5'-GAGCTCCTATCTGGATTAT-3' | 95°C, 5 min | 32 | 94°C, 15s | 72°C, 8 min | 700 pb | Lindgren <i>et al.</i> |
| | R: 5'-GAGCGCGGATATACACCTT-3' | | | 53°C, 20s | | | |
| <i>parC</i> | F: 5'-GACCGTGCGGTTGCCGTTTAT-3' | 95°C, 5 min | 32 | 94°C, 15s | 72°C, 8 min | 800 pb | |
| | R: 5'-GTGGTAGCGAAGAA GTGGTT-3' | | | 53°C, 20s | | | |
| <i>aac</i> | F: 5'-TGACAAACGCAAAAACAAG-3' | 95°C, 3 min | 25 | 95°C, 1 min | 72°C, 7 min | 550 pb | Presente estudo |
| | R: 5'-TTAGGCACTACTGCGTGTTC-3' | | | 55,5°C, 1 min | | | |

F: forward primer; R: reverse primer

Tabela SIII: Primers e condições das reacções de PCR para amplificação das sequências de inserção e dos intgrões de classe I

| Gene | Primers | Reacção de PCR | | | | Ref. |
|------------------------|--------------------------------|----------------------|--------------|---|----------------|------------------------|
| | | Desnaturação inicial | Nº de ciclos | Ciclos | Extensão final | |
| <i>ISEcp1</i> | F: 5'-AAAAATGATTGAAAGGTGGT-3' | 95°C, 3 min | 29 | 95°C, 1 min 49°C, 1 min 72°C, 1 min | 72°C, 10 min | Eckert <i>et al.</i> |
| | R: 5'-CCGTGACACTGTTTCAGGTT-3' | 95°C, 3 min | 29 | 95°C, 1 min 61°C, 1 min 72°C, 1 min | 72°C, 10 min | Presente estudo |
| <i>IS903</i> | F: 5'-TGGACAAACAGATTACACCCG-3' | 95°C, 3 min | 30 | 95°C, 1 min 52,5°C, 1 min 72°C, 1 min | 72°C, 10 min | Presente estudo |
| | R: 5'-CGTTGTAACTGTTGTCCA-3' | 95°C, 3 min | 36 | 95°C, 1 min 56°C, 1 min 72°C, 1 min | 72°C, 10 min | Eckert <i>et al.</i> |
| Integração de classe I | F: 5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3' | 94°C, 11 min | 45 | 94°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C, 5 min | 72°C, 10 min | Lévesque <i>et al.</i> |
| | R: 5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3' | | | | | |

F: forward primer; R: reverse primer

Tabela SIV: Primers e condições das reacções de PCR para amplificação dos genes de virulência

| Gene | Primers | Reacção de PCR | | | | Tamanho do amplicão | Ref. |
|-------------------------------|--------------------------------------|----------------------|--------------|---|----------------|---------------------|------------------------|
| | | Desnaturação inicial | Nº de ciclos | Ciclos | Extensão final | | |
| <i>fimH</i> <i>E.coli</i> | F: 5'-AACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTG-3' | 94°C, 10 min | 25 | 94°C, 30s 60°C, 30s 72°C, 1 min | 72°C, 10 min | 465 pb | Usein <i>et al.</i> |
| | R: 5'-ATTGCGTACCAAGCATTAGCAATGTCC-3' | | | | | | |
| <i>papC</i> | F: 5'-GAGTTATACGGGAGCCAGCCT-3' | 94°C, 10 min | 25 | 94°C, 30s 60°C, 30s 72°C, 1 min | 72°C, 10 min | 1200 pb | Presente estudo |
| | R: 5'-GGAAGCACTGACGCCAAAGA-3' | | | | | | |
| <i>sfaD-E</i> | F: 5'-GTCAGATAATACGGCGTGGGA-3' | 94°C, 5 min | 25 | 94°C, 2 min 65°C, 1 min 72°C, 2 min | 72°C, 10 min | 330 pb | Presente estudo |
| | R: 5'-GCAGTCTTGCCCTGTCAGACA-3' | | | | | | |
| <i>ecpA</i> | F: 5'-AAGCTGTTGTGACGCCAC-3' | 94°C, 10 min | 30 | 94°C, 1 min 53°C, 1 min 72°C, 1 min | 72°C, 10 min | 300 pb | Presente estudo |
| | R: 5'-GAAACCATCTGTGCGGTG-3' | | | | | | |
| <i>cnf-1</i> | F: 5'-TTATATAGTCGTCAAGATGGA-3' | 94°C, 5 min | 25 | 94°C, 30s 51°C, 30s 72°C, 2 min | 72°C, 10 min | 700 pb | Usein <i>et al.</i> |
| | R: 5'-CACTAAGCTTTACAATAATTGA-3' | | | | | | |
| <i>hlyA</i> | F: 5'-AGATTCTTGGGCA TGTA TCCT-3' | 94°C, 5 min | 25 | 94°C, 30s 56°C, 30s 72°C, 2 min | 72°C, 10 min | 550 pb | Usein <i>et al.</i> |
| | R: 5'-TTGCTTTGCAGACTGTAGTGT-3' | | | | | | |
| <i>usp</i> | F: 5'-CCGAGTAGTGTGTTGGCGAC-3' | 94°C, 10 min | 30 | 95°C, 1 min 53°C, 1 min 72°C, 2 min | 72°C, 10 min | 1000 pb | Presente estudo |
| | R: 5'-GTCGGGGCGTAA CAATCCT-3' | | | | | | |
| <i>iucC</i> | F: 5'-AAACCTGGCTTACGCAACTGT-3' | 94°C, 5 min | 25 | 94°C, 30s 58°C, 30s 72°C, 2 min | 72°C, 10 min | 400 pb | Usein <i>et al.</i> |
| | R: 5'-ACCCGTCTGCAAA TCATGGAT-3' | | | | | | |
| <i>fimH</i> <i>K.pneum</i> | F: 5'-CACGCAAGGCCACCATTC-3' | 94°C, 5 min | 25 | 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C, 1 min | 72°C, 10 min | 900 pb | Stahlhut <i>et al.</i> |
| | R: 5'-GCTCAGAA TCACA TCGGTAAC-3' | | | | | | |
| <i>mrkD</i> | F: 5'-TTGTTGCTGCTGTTTGGTTC-3' | 94°C, 10 min | 25 | 94°C, 30s 58°C, 1 min 72°C, 1 min | 72°C, 10 min | 600 pb | Presente estudo |
| | R: 5'-CGAGTTTCTGCTTTGTAATG-3' | | | | | | |
| <i>khe</i> | F: 5'-ACCGTCTGCCGATTTAAT-3' | 94°C, 10 min | 25 | 94°C, 30s 60°C, 30s 72°C, 90s | 72°C, 10 min | 600 pb | Presente estudo |
| | R: 5'-GATAAACACAGGCGCATAGTG-3' | | | | | | |

F: forward primer; R: reverse primer