

**Daniela Jones Antunes Dias**

**Estudo dos Principais Mecanismos de  
Resistência aos Antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em  
Bactérias Patogénicas de Gram negativo**

**LISBOA**

**2009**

**nº de arquivo**

**“Copyright”**

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**

**Daniela Jones Dias**

**Estudo dos principais mecanismos de  
resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em  
bactérias patogénicas de Gram negativo**

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre  
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade  
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

**Orientadora:**

Doutora Maria Manuela Marin Caniça  
(INSA)

**Co-orientadora:**

Doutora Eugénia Maria Nunes Ferreira  
(INSA)

**LISBOA**

**2009**

## ***Agradecimentos***

Doutora Manuela Caniça e Doutora Eugénia Ferreira,

Obrigada por terem aceite orientar este meu percurso, pela disponibilidade permanente para me ajudar e pela generosidade com que partilharam comigo os vossos conhecimentos.

Professora Ilda Sanches,

Obrigada pelo acompanhamento e pelo apoio durante estes dois anos.

Vera Manageiro,

Obrigada por todo o trabalho com o SHV-99 que antecedeu o meu próprio estudo e pela preparação das células electrocompetentes. Obrigada por me ajudares e ensinares tudo o que podias sem esperar nada em troca e por partilhares quase tudo comigo, incluindo o cacifo!

David Félix, Germana Domingues, Nuno Mendonça, Ricardo Dias, Doutora Paula Lavado, Raquel Barbosa, D. Deolinda,

Obrigada por partilharem comigo o espaço e o tempo. Obrigada pelos conselhos, pelas conversas, pelos favores, pelas partidas. Obrigada ainda à D. Deolinda por saber sempre onde está tudo naquele laboratório.

Pais, irmão, Cláudia, Avó e *pioelhos*

Obrigada a todos por aturarem as minhas alterações de humor e por perguntarem *o que fizeste hoje* mesmo sabendo que não vão perceber a resposta. Obrigada à Bruna e à Mariazinha por irromperem pela casa aos gritos, o que, oportunamente, me permitiu distrair e descansar da escrita.

Às minhas siamesas,

Obrigada só por serem as maiores, gostarem de *singstar* e jantaradas, perceberem as minhas conversas bacterianas e por me desejarem “felizes aniversários” cheios de meio LB.

Carlos,

Obrigada por seres *meu oceano breve e branco, minha secreta embarcação, meu vento favorável, minha vária, sempre incerta navegação*. Isso diz tudo.

Doutora Manuela Caniça e Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge,  
Obrigada por me terem proporcionado todas as condições necessárias à realização deste trabalho.

---

---

## Sumário

A resistência aos antibióticos é um problema global e emergente, sendo as  $\beta$ -lactamases o principal mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em bactérias de Gram negativo. O principal objectivo deste trabalho consistiu em avaliar a diversidade das  $\beta$ -lactamases produzidas por um grupo de 126 bactérias de Gram negativo, isoladas no período de 2004 a 2008 em diversos ambientes clínicos, em particular as  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBL), AmpC e carbapenemases.

O teste de susceptibilidade aos antibióticos, permitiu determinar a expressão fenotípica das  $\beta$ -lactamases produzidas pelos isolados em estudo e dirigiu ainda a pesquisa molecular dos genes que codificam essas enzimas, os genes *bla*, de acordo com esse fenótipo. As  $\beta$ -lactamases ESBL, identificadas por sequenciação nucleotídica daqueles genes e análise bioinformática, eram da família TEM (TEM-10, TEM-24 e TEM-52), SHV (SHV-12), CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-15 e CTX-M-32) e GES-1, sendo CTX-M-15 as enzimas mais comuns. Entre o total de isolados estudados 81 eram produtores desta enzima CTX-M-15, encontrando-se disseminada entre as várias espécies, provenientes de várias regiões do país o que, associado a dados anteriores, sugere a sua disseminação crescente, eventualmente clonal, nomeadamente a nível hospitalar. Aí verificou-se existir disseminada por vários serviços. Entre as  $\beta$ -lactamases de classe A de Ambler, foram ainda detectadas as penicilinases SHV-1, TEM-1 e SHV-28, estando relacionadas com falsos fenótipos ESBL identificados, devido a provável hiperprodução.

A caracterização bioquímica de  $\beta$ -lactamases AmpC cromossómicas, realizada por focagem isoelétrica, permitiu confirmar a expressão destas enzimas, tendo sido verificado que as estirpes de *Pseudomonas*, *Citrobacter* e *Enterobacter* spp co-produziam ainda  $\beta$ -lactamases CTX-M-14, CTX-M-15, SHV e TEM-tipo, focalizando em pIs pré-definidos. Entre as  $\beta$ -lactamases de classe C, foram ainda detectadas as AmpC plasmídicas DHA-1 e CMY-2, nunca antes descritas em Portugal.

A avaliação dos parâmetros cinéticos para a nova enzima, SHV-99, revelou uma maior afinidade ( $K_m$ ) para as penicilinas, cefalosporinas de terceira geração e aztreonam, o que nos leva a sugerir que substituições aminoácidas na posição 104 de Ambler podem estar envolvidas no reconhecimento e discriminação dos substratos.

Em conclusão, a co-expressão frequente de duas ou mais  $\beta$ -lactamases nos isolados deste estudo, a diversidade de famílias de  $\beta$ -lactamases identificadas, nomeadamente em diferentes espécies, e a resistência a diferentes antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que lhes está associada, partilhando sobretudo fenótipos de multirresistência, constitui um panorama preocupante que interessa valorizar em termos de saúde pública.

---



---

**Índice**

<i>Agradecimentos</i>	<i>i</i>
<i>Sumário</i>	<i>iii</i>
<i>Índice</i>	<i>v</i>
<b>I. Introdução</b>	1
1. Perspectiva global	1
2. Agentes antimicrobianos: antibióticos $\beta$ -lactâmicos	1
2.1. Mecanismo de acção dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos	3
2.2. Origem da resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos	5
2.3. Mecanismos de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos	5
2.3.1. Modificação do alvo	5
2.3.2. Bombas de efluxo	6
2.3.3. Alteração da permeabilidade	6
2.3.4. Produção de enzimas	7
3. $\beta$ -Lactamases	7
3.1. As diversas classificações	8
3.2. As principais famílias	9
3.2.1. $\beta$ -Lactamases TEM (Classe A)	10
3.2.2. $\beta$ -lactamases SHV (Classe A)	11
3.2.3. $\beta$ -lactamases CTX (Classe A)	12
3.2.4. $\beta$ -lactamases AmpC (Classe C)	14
3.2.5. $\beta$ -lactamases OXA (Classe D)	16
3.2.6. Carbapenemases (Classes A, B e D)	17
4. Objectivos	18
<b>II. Material e Métodos</b>	20
1. Isolados bacterianos	20
2. Caracterização fenotípica	23
2.1. Teste de susceptibilidade aos antibióticos	23
2.2. Teste de sinergia com meropenem	24
2.3. Transferência plasmídica	25
2.3.1. Conjugação	25
2.3.2. Transformação por electroporação	26



---

---

2.3.2.1.Extracção de DNA plasmídico	26
2.3.2.2.Electroporação	27
3. Caracterização bioquímica	27
3.1. Identificação de $\beta$ -lactamases	27
3.1.1. Extracção de $\beta$ -lactamases por sonicação	27
3.1.2. Pesquisa de actividade enzimática	28
3.1.3. Focagem isoeléctrica	28
3.1.3.1.Preparação do gel de migração	28
3.1.3.2.Migração	28
3.1.3.3.Preparação do gel de revelação	29
3.2. Cinética enzimática	29
3.2.1. Extracção e purificação de $\beta$ -lactamases	29
3.2.2. Determinação de constantes cinéticas por acidimetria	30
4. Caracterização genotípica	31
4.1. Extracção e quantificação de DNA	32
4.2. Detecção de genes <i>bla</i>	32
4.3. Purificação de produtos de PCR	34
4.4. Sequenciação automática pós-PCR	35
<b>III. Resultados</b>	36
1. Caracterização fenotípica dos isolados	36
2. Caracterização genotípica dos isolados	37
3. Identificação dos mecanismos de resistência responsáveis pela expressão fenotípica dos isolados	39
3.1. $\beta$ -lactamases de classe A	39
3.1.1. Relação fenótipo vs tipo de ESBL	44
3.1.2. Análise de mutações pontuais nos genes que codificam $\beta$ -lactamases de classe A	45
3.1.3. Análise de mutações silenciosas no suporte genético dos genes <i>bla</i> <sub>TEM</sub> e <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	48
3.1.4. Distribuição dos isolados produtores de TEM, SHV, CTX-M e GES por serviço hospitalar	49
3.2. $\beta$ -lactamases de classe C e carbapenemases	51
3.2.1. Caracterização fenotípica	51

3.2.2. Avaliação da expressão de AmpC cromossômica	52
3.2.3. Caracterização molecular de genes ampC	53
4. Transferência plasmídica de genes bla	54
5. Avaliação da multirresistência	54
6. Propriedades bioquímicas de SHV-99	57
<b>IV. Discussão</b>	60
V. Bibliografia	72
VI. Anexos	
Anexo i.	
Anexo ii.	
Anexo iii.	
Anexo iv.	

## **I. Introdução**

### **1. Perspectiva global**

Foi com a descoberta da penicilina e das sulfamidas, em 1928 e 1932, respectivamente, que se iniciou o processo de síntese comercial de antibióticos e sua administração terapêutica. Ao longo do tempo, estes fármacos contribuíram para o controlo das infecções de forma generalizada e provaram ser uma mais-valia a nível clínico (Livermore, 2003; Levy, 1998).

Porém, o impacto causado pelos antibióticos foi muito além do contributo notável a nível de saúde pública, pois a sua acção na vida microbiana, ao longo dos anos, causou a emergência de agentes patogénicos resistentes a estes e outros agentes biocidas. Várias décadas após a identificação dos primeiros casos de resistência aos antibióticos, este tema continua a constituir um desafio global em termos de saúde pública (Kummerer, 2003).

### **2. Agentes antimicrobianos: antibióticos $\beta$ -lactâmicos**

Para compreender os mecanismos de resistência das bactérias a um antibiótico deve conhecer-se a sua estrutura e mecanismo de acção. Um antibiótico é um composto natural que mata uma bactéria ou inibe o seu crescimento. Actualmente, os antibióticos e os quimioterápicos estão incluídos no conceito de antimicrobianos. Uma vez que as opiniões se dividem quanto à aplicação destes conceitos, ao longo deste trabalho utilizaremos, de forma corrente, o termo antibiótico.

Os antibióticos actuam através da inibição de processos essenciais à multiplicação da célula bacteriana e, em última instância, à sua sobrevivência. Podem ser classificados em diferentes grupos em função da sua estrutura alvo na célula bacteriana, diferenciando-se em inibidores da membrana citoplasmática, inibidores da síntese de ácidos nucleicos, inibidores de síntese proteica e inibidores da síntese da parede celular (Murray *et al.*, 2005).

Entre os mecanismos de acção antimicrobiana, a inibição da síntese da parede bacteriana é executada pelos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, entre outros. Sendo este grupo de antibióticos um dos mais utilizados, nomeadamente em Portugal, os mecanismos de resistência que lhe estão associados serão a temática central deste trabalho (Donowitz e Mandell, 1988; Muller *et al.*, 2007).

Efectivamente, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos destacam-se dos demais pela sua relevância na terapêutica clínica. Este estatuto deve-se, essencialmente, a uma propriedade

importante – ausência de toxicidade para organismos eucariotas – pois estes antibióticos possuem como local de acção uma estrutura que existe unicamente em bactérias – o peptidoglicano.

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são constituídos estruturalmente pelo anel  $\beta$ -lactâmico, o qual dá o nome ao grupo. Este anel pode apresentar-se isolado, como é o caso particular dos monobactâmicos ou conjugado com outro anel, resultando em estruturas bicíclicas (*Tabela 1*).

**Tabela 1.** Classes de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, subclasses, exemplos e estrutura química.

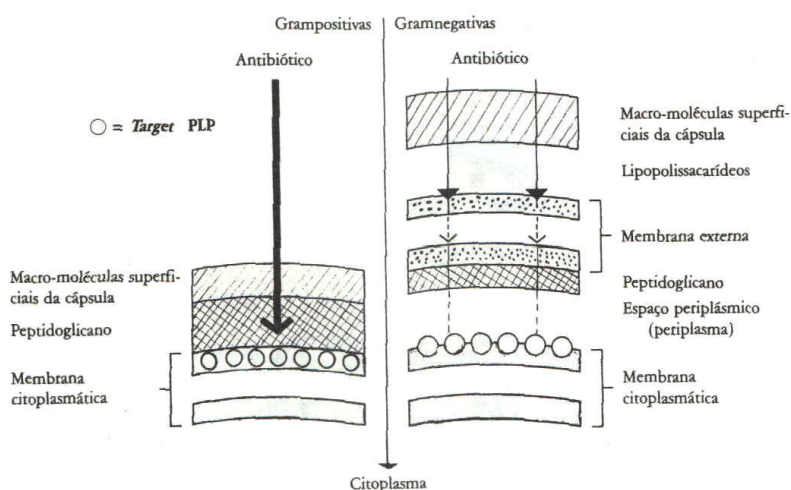
Classe	Subclasse	Exemplo	Estrutura química (Classe)
<b>Penicilinas</b>	Penicilinas	penicilina	
	Aminopenicilinas	amoxicilina, ampicilina	
	Ureidopenicilinas	piperacilina	
	Carboxipenicilinas	ticarcilina	
	Penicilinas resistentes às penicilinases	cloxacilina, meticilina,	
	Amidinopenicilina	meciliname	
<b>Cefemes</b>	Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> geração	cefalotina, cefazolina	
	Cefalosporinas 2 <sup>a</sup> geração	cefuroxima	
	Cefalosporinas 3 <sup>a</sup> geração	cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona	
	Cefalosporinas 4 <sup>a</sup> geração	cefepima	
	Cefamicina	cefoxitina	
<b>Monobactâmicos</b>	-	aztreonam	
<b>Penemes</b>	Carbapenemes	ertapenem, imipenem, meropenem	

As penicilinas surgem como um exemplo no qual o anel  $\beta$ -lactâmico se encontra unido a um anel de tiazolidina, enquanto nas cefalosporinas aquele anel existe associado a um anel de dihidrotiazina. Por fim, a classe dos carbapenemes exhibe uma cadeia lateral hidroxietil associada ao anel  $\beta$ -lactâmico (Donowitz e Mandell, 1988; Murray *et al.*, 2005; Normark e Normark, 2002).

De uma forma geral, é a constituição dos radicais referenciados como R e R' que dita as propriedades das diferentes classes de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que existem disponíveis para a prática clínica (Donowitz e Mandell, 1988).

### 2.1. Mecanismo de acção dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos

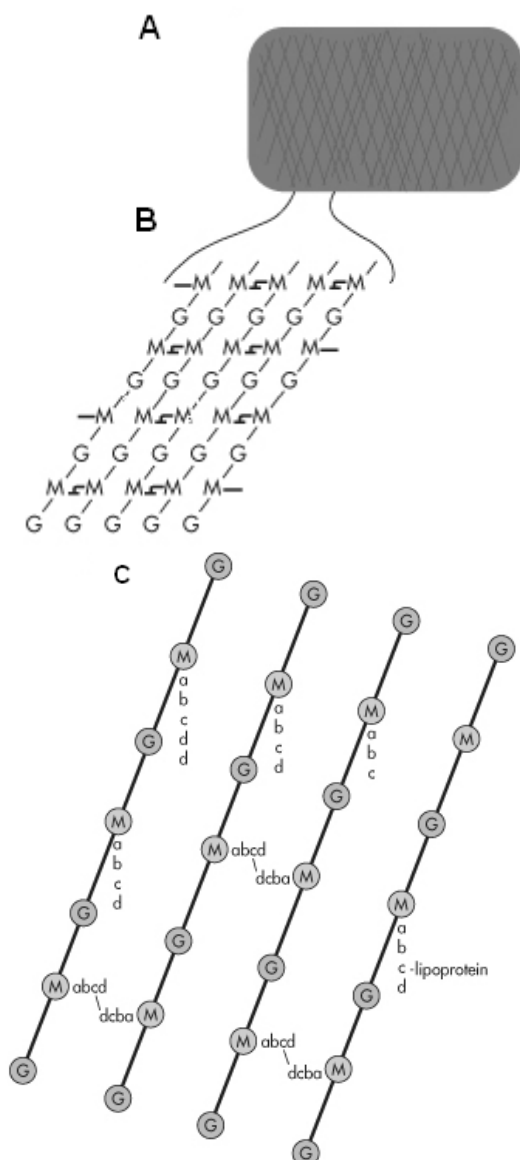
A penetração dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos na célula bacteriana está directamente relacionada com a parede. Nas bactérias de Gram positivo o peptidoglicano é o principal constituinte da parede celular, surgindo como um heteropolímero de composição complexa que confere resistência mecânica à parede. Neste caso, a membrana citoplasmática, encontra-se justaposta à parede e é nesta estrutura que estão inseridos, no folheto externo, os alvos dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos – PBP (*Penicilin Binding Proteins*) (*Figura 1*). Nas bactérias de Gram negativo, por sua vez, a parede celular apresenta-se mais estratificada, sendo constituída por camadas de lipopolissacarídeos e fosfolípidos, onde se inserem poros constituídos por



**Figura 1.** Diagrama representativo da parede de bactérias de Gram positivo e de Gram negativo (extraído de Pato, 1989).

proteínas (as porinas) sob as quais se encontra a camada de peptidoglicano. Entre esta camada e a membrana citoplasmática confina-se o espaço periplásmico (*Figura 1*). É no folheto externo da membrana citoplasmática que se localizam as PBPs (Murray *et al.*, 2005; Normark e Normark, 2002).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos impedem a síntese das pontes peptídicas entre as cadeias justapostas que constituem o peptidoglicano, inibindo a síntese deste composto. Este componente da parede bacteriana é constituído por cadeias nas quais existe uma unidade repetitiva, a qual compreende moléculas alternadas de N-acetilglucosamina e de ácido N-acetilmurâmico. As cadeias lineares, por sua vez, são ligadas por filamentos laterais de aminoácidos que promovem a união entre os ácidos N-acetilmurâmicos. Existem quatro



aminoácidos L e D alternados, sendo os mais comuns: L-alanina, D-alanina, ácido D-glutâmico, D-glutamina e L-lisina ou ácido diaminopimélico (DAP) (Figura 2). Nas bactérias de Gram negativo, a ligação interpeptídica localiza-se entre o grupo amina do DAP e o grupo carboxilo da D-alanina. Tal ligação, que conduz à eliminação do terminal D-alanina, é vulgarmente denominada por reacção de transpeptidação. As transpeptidases ou PBPs actuam com o acil-D-alanil-D-alanina, originando um complexo enzima-acil-D-alanil e promovendo a eliminação do terminal D-alanina. Estas enzimas podem ser inibidas pelos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, que actuam como análogos do referido complexo. Uma vez ligados entre si, os intervenientes formam um complexo inibindo a síntese das ligações interpeptídicas do peptidoglicano crescente o que, em última instância, desencadeia a lise da célula bacteriana (Murray *et al.*, 2005; Pato, 1989).

**Figura 2.** Representação geral do peptidoglicano. **A.** O peptidoglicano forma uma rede à volta da célula. **B.** O peptidoglicano consiste num polímero com cadeias associadas por ligações peptídicas. **C.** Representação da estrutura do peptidoglicano de *Escherichia coli*. DAP, o aminoácido na terceira posição do péptido (c), está directamente ligado ao terminal Alanina (d) da outra cadeia. (a) Glutamina; (b) Lisina; G, N-acetilglucosamina; M, ácido N-acetilmurâmico (Adaptado de Murray *et al.*, 2005).

## 2.2. Origem da resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos

No contexto da resistência aos antibióticos, os organismos procariotas podem apresentar um de três fenótipos fundamentais: resistência intrínseca, resistência adquirida ou susceptibilidade. A resistência intrínseca é a resistência natural exibida por todos os exemplares de determinada espécie. A título de exemplo, os organismos do género *Enterobacter* são naturalmente resistentes à cefoxitina, fenótipo que surge devido à produção de uma  $\beta$ -lactamase AmpC cromossômica (Honore *et al.*, 1986, Cavallo *et al.*, 2008).

A resistência adquirida aos antibióticos, por sua vez, pode resultar da mutação de genes reguladores ou estruturais, da aquisição de genes de resistência veiculados por elementos genéticos móveis ou da combinação de ambos os mecanismos. O fenótipo resultante da resistência adquirida não irá estar presente em todos os indivíduos da mesma espécie, existirá apenas nos indivíduos de uma linhagem bacteriana que derive de um organismo susceptível. A aquisição de genes de resistência faz-se, muitas vezes, através de elementos móveis, tais como plasmídeos, transposões ou integrões. Os genes que codificam  $\beta$ -lactamases surgem como exemplo de genes que são, muitos deles, disseminados por plasmídeos, os quais podem ser facilmente adquiridos por diversas bactérias patogénicas (transferência horizontal). Naturalmente, a susceptibilidade aos antibióticos resulta da ausência total de mecanismos de resistência que possibilitem a sobrevivência das bactérias na presença de determinados compostos (Harbottle *et al.*, 2006).

## 2.3. Mecanismos de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos

A resistência dos agentes patogénicos aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos tem vindo a aumentar continuamente e, devido a algumas más práticas a eles associados, parece superar o ritmo a que novos antibióticos têm sido descobertos e sintetizados. Preocupante é a notável adaptação das bactérias patogénicas a essas resistências. A resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos pode resultar de modificações do alvo do antibiótico (as PBPs), impermeabilidade da membrana citoplasmática, existência de proteínas de efluxo, ou ainda inactivação enzimática do antibiótico (Nikaido, 2009).

### 2.3.1. Modificação do alvo

Um dos mecanismos através dos quais as bactérias se tornam resistentes aos antibióticos surge através de substituições aminoácidas na proteína que constitui o alvo do antibiótico, as PBPs. Na maioria dos casos, a proteína torna-se menos susceptível à ligação

com o agente antimicrobiano. Embora este facto tenha sido observado em bactérias de Gram negativo, o mecanismo de resistência é particularmente notório em bactérias de Gram positivo. A modificação destas transpeptidases pode ser conseguida por um de quatro mecanismos: 1. substituição aminoacídica, que promove a diminuição da afinidade entre antibiótico e PBP; 2. aquisição de novas PBPs; 3. existência de proteínas resultantes da recombinação entre genes que codificam PBP's associadas à expressão de susceptibilidade e PBP's que conduzem à resistência ao antibiótico; 4. hiperprodução da proteína com consequente aumento do nível de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Georgopapadakou e Liu, 1980).

### **2.3.2. Bombas de efluxo**

O efluxo do agente antimicrobiano pode conferir um nível residual de resistência. Este mecanismo pode não ser suficiente para expressar resistência clínica, porém, em conjunto com outros mecanismos pode estar na origem de falências terapêuticas.

A especificidade do antibiótico pode variar em função da bomba de efluxo. A resistência é frequentemente causada pelo aumento da síntese das proteínas que, no seu conjunto constituem a bomba, devido, por exemplo, a mutações que ocorrem nos repressores transcricionais destas proteínas. As mutações que ocorrem nestes genes podem também levar a um aumento da eficiência do transporte dos antibióticos para o exterior da célula. A título de exemplo, o sistema MexA-MexB-OprD, em *Pseudomonas aeruginosa*, pode estar associado à resistência ao meropenem. As bombas de efluxo podem ter afinidade para diversos antibióticos, pelo que estão frequentemente associadas a multirresistência (Harbottle *et al.*, 2006).

### **2.3.3. Alteração da permeabilidade**

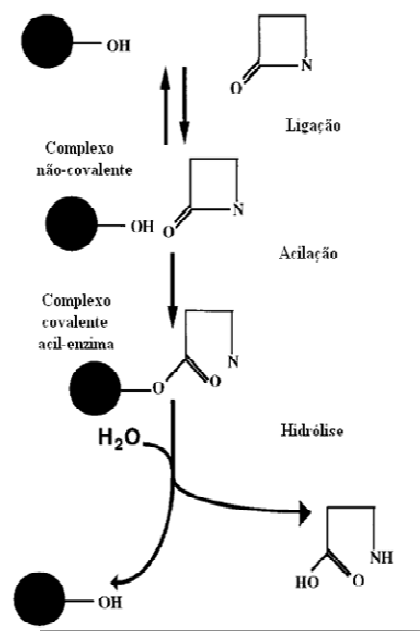
A resistência aos antibióticos é também frequentemente associada à diminuição da permeabilidade que ocorre na membrana exterior das bactérias de Gram negativo. O fluxo de moléculas para o interior da célula é assegurado através de complexos de proteínas de membrana, denominadas OMPs (*Outer Membrane Proteins*), os quais formam canais. A passagem de moléculas para o interior da célula é influenciada pela sua carga, estrutura e dimensão. Os antibióticos são algumas das moléculas que utilizam este percurso para atingir o interior da célula bacteriana ou, no caso dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, o espaço periplásmico. Em *Escherichia coli*, por exemplo, as proteínas OmpF, OmpC e OmpE são vulgarmente associadas a resistência aos antibióticos. A perda de função destas proteínas, por mutação dos



genes homónimos, pode efectivamente causar a diminuição da susceptibilidade a vários antibióticos (Livermore, 2003).

### 2.3.4. Produção de enzimas

A degradação de antibióticos por enzimas constitui o principal mecanismo de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, sendo aquela hidrólise produzida por  $\beta$ -lactamases, no espaço periplásmico, as quais promovem a clivagem do anel  $\beta$ -lactâmico. As  $\beta$ -lactamases podem actuar por dois mecanismos: 1. utilização de iões de zinco capazes de desencadear a ruptura do anel  $\beta$ -lactâmico no caso das metalo- $\beta$ -lactamases; 2. utilização da via éster-serina (Figura 3), no caso das restantes classes de  $\beta$ -lactamases. Neste caso, a enzima associa-se ao antibiótico de uma forma não-covalente, o que resulta num complexo de *Michaelis* não-covalente. Numa segunda etapa, ocorre o ataque ao anel  $\beta$ -lactâmico, por parte do grupo hidróxilo da cadeia lateral de um resíduo serina do sítio activo da enzima, originando um acil-éster covalente. A hidrólise deste éster vai por fim libertar a enzima, que se encontra activa e disponível para hidrolisar outras moléculas de antibiótico, enquanto o antibiótico se encontra hidrolisado e inactivo (Figura 3) (Livermore, 1995).



**Figura 3.** Processo de hidrólise de um antibiótico  $\beta$ -lactâmico por uma enzima com centro catalítico de serina (adaptado de Livermore, 1995).

## 3. $\beta$ -Lactamases

A primeira  $\beta$ -lactamase a ser identificada foi localizada num isolado de *E. coli*, antes ainda da utilização generalizada da penicilina na prática clínica (Abraham e Chain, 1940).

Seguiu-se a emergência e posterior disseminação de penicilinas plasmídicas identificadas em várias espécies bacterianas. De facto, parece ter sido devido à pressão de selecção causada pela secreção de agentes biocidas por parte de microrganismos ambientais, que surgiram as primeiras enzimas resistentes a agentes antimicrobianos. A origem destas proteínas parece estar associada às próprias PBPs, pois existe uma grande homologia entre ambas (Ghuysen, 1991).

A produção de  $\beta$ -lactamases constitui o mecanismo mais comum de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e o mais representativo em bactérias de Gram negativo, tendo apresentado, ao longo dos anos, um impacto considerável na actividade daqueles antibióticos.

Abordaremos as características de algumas das principais famílias destas enzimas e destacaremos o contributo que têm tido na actividade dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e, conseqüentemente, em saúde pública (Livermore, 1995; Wright, 2003).

### 3.1. As diversas classificações

Ao longo do tempo, têm sido propostas várias classificações para as  $\beta$ -lactamases, tendo cada uma delas surgido devido à necessidade de preencher lacunas deixadas pelas classificações anteriores e com o intuito de caracterizar e aí integrar novas  $\beta$ -lactamases. Estas classificações dividem as enzimas de acordo com a sua estrutura molecular, perfil de hidrólise e resposta aos inibidores (*Tabela 2*).

**Tabela 2.** Evolução da classificação molecular e funcional das  $\beta$ -lactamases (adaptado de Samaha-Kfoury e Araj, 2003)

Ano	Autor	Base da classificação
1968	Sawai <i>et al</i>	Cefalosporinas vs penicilinas como substratos
1973	Richmond e Sykes	Perfil de substrato alargado; sugestão de cinco grupos (Ia-d, II, III, IV e V)
1976	Richmond e Matthew	Distinção das enzimas plasmídicas através de pI
1980	Ambler	Separação das enzimas em quatro classes moleculares (A-D)
1981	Mitsuhashi e Inoue	Adição da categoria “ $\beta$ -lactamase que hidrolisa cefuroxima”
1989	Bush	Expansão do perfil de substratos, inserção da reacção com ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), correlação entre classificação molecular e funcional.
1995	Bush, Jacoby e Medeiros	Expansão do esquema de Bush; uso de factores moleculares, bioquímicos e sequência nucleotídica. Sugestão de classificação em quatro grupos (1-4) com base no espectro de actividade.

Em posição de destaque encontram-se as classes moleculares definidas por Ambler e os grupos funcionais estabelecidos por Bush, duas classificações em vigor nos dias de hoje (*Tabela 3*) (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995).

São cerca de sete centenas as  $\beta$ -lactamases identificadas e classificadas segundo as quatro classes moleculares de Ambler e de acordo com os grupos funcionais de Bush, Jacoby e Medeiros (<http://www.lahey.org/Studies>).

As enzimas de classe A e C são as mais comuns e possuem um resíduo serina no centro activo, à semelhança das  $\beta$ -lactamases de classe D. O seu mecanismo de acção tem como base aquele resíduo, o qual está ausente nas enzimas de classe B, as metalo- $\beta$ -

lactamases, para as quais é requerido um íon Zinco ( $Zn^{2+}$ ), ou outro metal pesado, no seu centro activo para a actividade de catálise (*Tabela 3*) (Livermore, 1995).

### 3.2. As principais famílias

Após esta breve introdução sobre a designação das diferentes classes e grupos das  $\beta$ -lactamases, iremos abordar as famílias de  $\beta$ -lactamases que apresentam relevância para este trabalho.

**Tabela 3.** Classificação das  $\beta$ -lactamases bacterianas (Adaptado de Bush *et al.*, 1995)

Grupo Bush- Jacoby- Medeiros	Classe Molecular	Perfil de hidrólise	Perfil de inibição		Enzimas representativas
			Ácido Clavulânico	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	-	-	AmpC, MIR-1
2a	A	Penicilinas	+	-	Penicilinases de Gram positivos
2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilinas, Cefalosporinas, Monobactâmicos	+	-	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6, K1 de <i>Klebsiella oxytoca</i>
2br	A	Penicilinas	±	-	TEM-30 a TEM-36, TRC-1
2c	A	Penicilinas, Carbenicilinas	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penicilinas, Cloxacilina	±	-	OXA-1 a OXA-11, PSE-2
2e	A	Cefalosporinas	+	-	Cefalosporinase de <i>Proteus vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemes	+	-	NMC-A de <i>Enterobacter cloacae</i> , SME-1 de <i>Serratia marcescens</i>
3	B	Maioria $\beta$ -lactâmicos, incluindo Carbapenemes	-	+	L1 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , CcrA de <i>Bacteroides fragilis</i>
4	ND	Penicilinas	-	?	Penicilinase de <i>Burkholderia cepacia</i>

ND, Não determinado.

### 3.2.1. $\beta$ -Lactamases TEM (Classe A)

A enzima TEM-1, da qual derivam as restantes  $\beta$ -lactamases tipo TEM (de Temoniera, nome de doente), é a  $\beta$ -lactamase mais frequentemente detectada em bactérias de Gram negativo. Esta enzima foi a primeira  $\beta$ -lactamase mediada por plasmídeos a ser descrita neste grupo bacteriano, facto que favoreceu a sua rápida disseminação a nível global. Actualmente, pode ser encontrada em várias espécies de *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*. A título de exemplo, estima-se que 90% da resistência à ampicilina em *E. coli* seja devida à produção da  $\beta$ -lactamase TEM (Livermore, 1995).

A enzima parental do grupo TEM apresenta a capacidade de hidrolisar penicilinas e, eventualmente, cefalosporinas de primeira geração, como cefalotina e cefaloridina. As enzimas TEM integram-se nos grupos 2b, 2be, e 2br da classificação de Bush-Jacoby-Medeiros, dependendo se se trata de penicilinases, de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado (ESBL) ou de  $\beta$ -lactamases resistentes a inibidores (*Inhibitor Resistant TEM* ou IRT), respectivamente. TEM-2, a segunda enzima parental, embora derivada de TEM-1, possui uma única substituição aminoacídica (Gln39Lys) em relação àquela  $\beta$ -lactamase, a qual causa uma alteração do pI de 5,4 para 5,6. No entanto, esta substituição não causa qualquer alteração no perfil hidrolítico da enzima (Chaibi, *et al.*, 1996).

A  $\beta$ -lactamase TEM-3 foi a primeira ESBL descrita nesta família (Barthélémy, 1985). A designação ESBL engloba as enzimas que são responsáveis por fenótipos de resistência às cefalosporinas de terceira geração (tais como cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona) e por sinergia com os inibidores de  $\beta$ -lactamases, como o ácido clavulânico.

Hoje em dia, existem 175 enzimas da família TEM: algumas destas enzimas conferem fenótipos de resistência aos inibidores, no entanto, a maioria são ESBL (<http://www.lahey.org/Studies>).

As propriedades catalíticas das enzimas TEM variam de acordo com as substituições aminoacídicas que afectam directamente o sítio activo e, portanto, resultam das alterações nucleotídicas que ocorrem em posições específicas do gene *bla*<sub>TEM</sub> que as codifica. Algumas destas alterações aminoacídicas resultam em variações no perfil de hidrólise, como seja a capacidade para hidrolisar cefalosporinas de terceira geração, no caso das ESBL. De facto, existem resíduos aminoacídicos que surgem permanentemente associados às  $\beta$ -lactamases TEM do tipo ESBL, como a alteração de glutamato para lisina na posição 104, arginina para serina ou histidina na posição 164 e glutamato para lisina na posição 240 (Bradford, 2001; Bush e Jacoby, 1997). O aumento do espaço físico do sítio activo conseguido através das

substituições aminoacídicas nas posições 238 e 240 produzem comumente um aumento da susceptibilidade ao ácido clavulânico. Estas substituições podem dar origem a enzimas ESBL, pois produzem uma alteração do sítio activo, ao qual as cefalosporinas de terceira geração se adaptam estruturalmente. Assim, a coexistência do fenótipo ESBL e resistência aos inibidores, no que respeita a estas posições, parece ser incompatível (Bradford, 2001; Knox, 1995).

Embora as  $\beta$ -lactamases tipo TEM sejam mais frequentemente encontradas em *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* podem também ser detectadas noutras bactérias de Gram negativo. No caso específico das ESBL do tipo TEM, estas têm vindo a ser detectadas em *Enterobacter* spp, *Morganella morganii*, *Proteus* spp, *Salmonella* spp e *P. aeruginosa* (Jacoby e Munoz-Price, 2005).

### 3.2.2. $\beta$ -lactamases SHV (Classe A)

As enzimas da família SHV (Sulfidril variável) estão inseridas nos grupos 2b, 2be e 2br da classificação Bush-Jacoby-Medeiros, de acordo com os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que hidrolisam. A  $\beta$ -lactamase SHV-1 é ubiquitária e cromossómica em *K. pneumoniae* e confere resistência à ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina (Bush *et al.*, 1995; Livermore, 1995). Em *E. coli*, por sua vez, a enzima surge frequentemente codificada por genes plasmídicos. De resto, têm também sido encontradas em *Citrobacter diversus* e *P. aeruginosa* (Bradford, 2001).

Actualmente, a maioria das enzimas tipo SHV são ESBLs, sendo sobretudo produzidas por isolados de *K. pneumoniae*. As SHV ESBL são particularmente importantes na disseminação de resistências em isolados clínicos na Europa e América, sendo SHV-5 e SHV-12 das mais comuns deste grupo (Jacoby e Munoz-Price, 2005).

Hoje em dia, conhecem-se 127 variedades de enzimas SHV com base em combinações de substituições aminoacídicas (<http://www.lahey.org/Studies>). São as alterações que ocorrem perto ou no sítio activo destas enzimas que mais influenciam o tipo de substratos que hidrolisam. Adicionalmente, as substituições nucleotídicas que codificam novas enzimas ocorrem, por norma, em posições específicas do gene *bla*<sub>SHV</sub>. A maioria das enzimas ESBL desta família exhibe a substituição de uma glicina por serina na posição 238. Por outro lado, algumas variantes possuem também uma substituição de glutamato por lisina na posição 240. É de realçar que alguns dos aminoácidos, que actuam de forma determinante na definição dos substratos a que SHV está associado, são os mesmos de TEM. O resíduo serina na posição

238 é responsável pela hidrólise da ceftazidima, no entanto, a lisina na posição 240 promove a hidrólise da cefotaxima (Heritage *et al.*, 1997). Conhecem-se ainda modificações aminoacídicas que estão associadas à resistência aos inibidores de  $\beta$ -lactamases (*Inhibitor Resistant SHV* ou IRS), sendo a substituição de lisina por arginina na posição 234 um exemplo (Mendonça *et al.*, 2008).

Actualmente, e de acordo com as substituições aminoacídicas (isoladas ou em associação) que conferem resistência às cefalosporinas de terceira geração existem cerca de 60 ESBLs da família SHV.

### 3.2.3. $\beta$ -lactamases CTX (Classe A)

As enzimas CTX-M (Cefotaximases) constituem o grupo de ESBL de emergência mais recente, estando actualmente em franca expansão. De facto, a sua disseminação global tem sido notória na última década (Bonnet, 2004). Em termos filogenéticos estas enzimas encontram-se relativamente distantes das  $\beta$ -lactamases TEM ou SHV, isto é, estima-se que a sua homologia seja cerca de 40% (Tzouvelekis *et al.*, 2000). Vários autores sugerem que este grupo terá surgido a partir de transferência genética horizontal e subsequente mutação do gene cromossómico *ampC* (Ampicilinase de classe C) de *Kluyvera ascorbata*. Foi a existência de 99% de homologia entre os genes *ampC* e *bla*<sub>CTX-M</sub> que denunciou a origem do último (Humeniuk *et al.*, 2002).

Sendo as  $\beta$ -lactamases CTX-M enzimas do tipo ESBL, a capacidade de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração está-lhes associada, uma vez que é intrínseca ao grupo e não teve a sua origem em substituições aminoacídicas numa enzima parental, como nas famílias TEM ou SHV. A primeira enzima do grupo, CTX-M-1, foi detectada pela primeira vez na Alemanha em 1989 (Bauernfeind *et al.*, 1990). Posteriormente, foram identificadas substituições aminoacídicas que deram origem a novas CTX-M. A disseminação crescente destas enzimas levou à sua identificação em várias espécies de *Enterobacteriaceae*. Estudos filogenéticos permitiram classificar as enzimas CTX-M em cinco grandes grupos, de acordo com as suas sequências aminoacídicas: o grupo CTX-M-1, o grupo CTX-M-2, o grupo CTX-M-8, o grupo CTX-M-9 e o grupo CTX-M-25 (Tabela 4) (<http://www.lahey.org/Studies>).

Trabalhos realizados no âmbito da caracterização bioquímica demonstraram que as enzimas CTX-M hidrolisam preferencialmente a cefotaxima, daí o seu nome. Adicionalmente, na maioria das enzimas deste grupo, a hidrólise da ceftazidima existente não é suficiente para conferir resistência clínica (Tzouvelekis *et al.*, 2000). Tem sido sugerido que o resíduo de

serina na posição 237, presente em todas as enzimas CTX-M, é vital para a actividade destas enzimas.

**Tabela 4.** Grupos e origem das enzimas CTX-M (Adaptado de Cantón e Coque, 2006)

Agrupamento CTX-M					
	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8	CTX-M-9	CTX-M-25
<b>Ano (enzima, país) *</b>	1989 (CTX-M-1, Alemanha)	1986 (FEC-1, Japão)	1996 (CTX-M-8, Brazil)	1994 (CTX-M-9, Espanha)	2000 (CTX-M-25, Canadá)
<b>Enzimas</b>	CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -29, -30, -32, -33, -28, -36, -54, UOE-1	CTX-2, -4, -6, -7, -20, -31, -44, FEC-1	CTX-M-40	CTX-M-9, -13, -14, 16, -17, -18, -19, -24, -27, -45, -46, -47, -48, -49, -50	CTX-M-26, -25, -39, -41
<b>Origem</b>	<i>K. ascorbata</i>	<i>K. ascorbata</i>	<i>K. georgiana</i>	<i>K. georgiana</i>	ND

\* Ano do primeiro isolamento ou descrição. CTX-M-14 e CTX-M-18 são idênticas; ND, não determinado.

A arginina na posição 276 parece ter igualmente um papel essencial na hidrólise de cefalosporinas de terceira geração (Gazouli *et al.*, 1998). Adicionalmente, estas enzimas são inibidas de forma mais eficaz pelo inibidor tazobactam do que pelo sulbactam ou ácido clavulânico.

As  $\beta$ -lactamases CTX-M têm sido detectadas por todo o mundo e têm sido frequentemente associadas a surtos na Europa, América do Sul e Japão (Bradford, 2001). O cenário epidemiológico das  $\beta$ -lactamases CTX-M compreende o aparecimento de novas enzimas, a existência de múltiplos clones associados a surtos e a introdução frequente de vários elementos genéticos envolvidos na disseminação de *bla*<sub>CTX-M</sub>. A disseminação destas enzimas tem ocorrido a uma tal escala que não poderia ser apenas consequência de pressão selectiva devida ao uso de cefalosporinas de terceira geração. De facto, a evolução desta família de enzimas foi influenciada, a nível molecular, por eventos de recombinação de *bla*<sub>CTX-M</sub> com sequências de inserção, transposões e pela transferência destes genes através de outros elementos genéticos móveis (Bonnet, 2004; Cantón e Coque, 2006).

Actualmente, o predomínio das enzimas CTX-M e a rapidez com que se disseminaram por todo o mundo é apenas comparável à emergência e disseminação da  $\beta$ -lactamase TEM-1 na década de 70 (Cantón e Coque, 2006).

### 3.2.4. $\beta$ -lactamases AmpC (Classe C)

No que respeita às  $\beta$ -lactamases de classe C, iremos focar-nos essencialmente nas do tipo AmpC. Várias bactérias de Gram negativo expressam resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos devido à produção de AmpC pelo que, à semelhança do que sucede com outras  $\beta$ -lactamases, estas enzimas são clinicamente relevantes (Jacoby, 2009).

A AmpC produzida por diferentes espécies tais como *E. coli*, *Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii*, *P. aeruginosa* e *Serratia* spp é codificada pelo gene *ampC* no cromossoma bacteriano, conferindo resistência a penicilinas, cefoxitina, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira gerações e às combinações  $\beta$ -lactâmico/inibidor de  $\beta$ -lactamase (Tabela 5). Porém, podem ser inibidas e, conseqüentemente, detectadas por substâncias tais como a cloxacilina. Adicionalmente, a resistência aos carbapenemes pode surgir em alguns organismos quando a existência de uma cefalosporinase de classe C é combinada com outros mecanismos de resistência, como a acção de bombas de efluxo ou redução da permeabilidade (Jacoby, 2009).

A expressão e origem deste tipo de enzimas é variável. Em algumas espécies de bactérias, tais como *Enterobacter cloacae*, a  $\beta$ -lactamase AmpC apresenta um carácter indutível, o que constitui um problema no tratamento de infecções por este agente patogénico. Em *E. coli*, por sua vez, a expressão desta enzima é constitutiva e residual, não sendo habitualmente suficiente para ter conseqüências fenotípicas nas estirpes que as produzem (Perez-Perez and Hanson, 2002). Podem ainda surgir mutantes resistentes que sobre-expressam constitutivamente esta enzima devido a mutações no gene repressor do gene *ampC*. Estes são vulgarmente designados por mutantes desreprimidos e são particularmente detectados no género *Enterobacter* (Honore *et al.*, 1986).

A expressão constitutiva deste tipo de proteína em bactérias de Gram negativo pode ocorrer por mecanismos como a desregulação do gene cromossómico ou aquisição de um elemento genético móvel contendo um gene *ampC* (Philippon *et al.*, 2002).



**Tabela 5.**  $\beta$ -lactamases cromossômicas e sua expressão em membros da família *Enterobacteriaceae* (Adaptado de Livermore, 1995).

Organismo	Nome	Classe	Grupo Bush	Modo de expressão			
				Induzível	Constitutivo		
					Mínimo	Moderado	Constitutivo
<i>E. coli</i>	AmpC	C	1	-	●	-	○
<i>Enterobacter spp</i>	AmpC	C	1	-	○	-	⊗
<i>C. freundii</i>	AmpC	C	1	●	-	-	⊗
<i>Serratia spp.</i>	AmpC	C	1	●	-	-	⊗
<i>K. pneumoniae</i>	SHV-1	A	2b	-	-	●	○
<i>K. oxytoca</i>	K1	A	2be	-	-	●	⊗

● Modo de produção normal, típico da espécie; ⊗ Encontrado frequentemente, variável segundo distribuição, mas observado em 10 a 50% dos isolados; ○ Raro, ocorre em menos de 10% dos isolados.

Nos últimos anos, têm vindo a ser identificadas  $\beta$ -lactamases AmpC plasmídicas em espécies como *E. coli* e *K. pneumoniae*. Estas enzimas parecem derivar de genes *ampC* cromossômicos de outros membros da família *Enterobacteriaceae* (Tabela 6) (Perez-Perez e Hanson, 2002).

Foi num isolado de *K. pneumoniae* que foi descrita pela primeira vez a possibilidade de transferência plasmídica da resistência à cefoxitina e, simultaneamente, às cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos. O fenótipo de resistência devia-se à enzima CMY-1, assim designada devido à sua actividade hidrolítica sobre as cefamicinas; o facto de ser fracamente inibida por ácido clavulânico e tazobactam sugeriu a sua integração na classe C (Bauernfeind *et al.*, 1989). Porém, foi através da  $\beta$ -lactamase MIR-1 (assim denominada por ter sido identificada pela primeira vez no Mirian Hospital em Providence) e da sua homologia de 99% com a AmpC de *E. cloacae* que surgiu a possibilidade da origem cromossômica das AmpC plasmídicas. Posteriormente, as enzimas de classe C codificadas por genes plasmídicos têm vindo a ser descritas um pouco por todo o mundo e a ser-lhes atribuídas várias origens (Tabela 6) (Papanicolaou *et al.*, 1990).

Assim, perante um isolado de *E. coli* ou *K. pneumoniae* com um perfil de susceptibilidade aos antibióticos semelhante a *Enterobacter cloacae* com o gene *ampC* mutado, podemos considerar estarmos na presença de uma estirpe produtora de uma  $\beta$ -lactamase AmpC plasmídica (Morosini *et al.*, 2000).

**Tabela 6.** Origem e homologia de  $\beta$ -lactamases AmpC plasmídicas (Adaptado de Jacoby, 2009)

AmpC $\beta$ -lactamase	Espécie na qual foi isolada	Origem <sup>a</sup>	Semelhança (%)
CMY-1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	82
CMY-2	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. freundii</i>	96
MIR-1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	99
MOX-1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	80
LAT-1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. freundii</i>	95
FOX-1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	99
DHA-1	<i>S. enteritidis</i>	<i>M. morgani</i>	99
ACT-1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	98
ACC-1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Hafnia alvei</i>	99
CFE-1	<i>E. coli</i>	<i>C. freundii</i>	99

<sup>a</sup> Origem provável do gene que codifica a respectiva  $\beta$ -lactamase.

A distinção entre uma  $\beta$ -lactamase AmpC cromossômica endógena e uma AmpC codificada por um gene plasmídico nem sempre é fácil, mas é de extremo interesse em termos de vigilância epidemiológica, pois tem consequências importantes devido à fácil disseminação destes plasmídeos (Perez-Perez e Hanson, 2002).

### 3.2.5. $\beta$ -lactamases OXA (Classe D)

As  $\beta$ -lactamases OXA (Oxacilinas) são, à semelhança das CTX-M, um grupo de enzimas emergente. A sua estrutura molecular agrupa-as na classe D e o tipo de substratos em que actuam integra-as no grupo funcional 2d. As  $\beta$ -lactamases de classe D conferem resistência às penicilinas, oxacilina e cloxacilina, facto pelo qual são reconhecidas, no entanto, a sua inibição conseguida pelo ácido clavulânico é relativamente fraca. De facto, a inserção das  $\beta$ -lactamases da família OXA na classe molecular D não é pacífica. Inicialmente, este grupo foi concebido para englobar enzimas com um perfil hidrolítico distinto de todas as  $\beta$ -lactamases conhecidas até ao momento. Assim, o agrupamento funcional prevaleceu e deu origem a um conjunto de enzimas que partilham apenas 20% da sua sequência nucleotídica. A homologia entre as enzimas de classe D e as enzimas de classe A ou C é ainda mais baixa. Porém, todas partilham o mesmo mecanismo de hidrólise, o qual está dependente do resíduo serina do seu sítio activo (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995).

A  $\beta$ -lactamase OXA-1, uma das enzimas mais comumente detectadas em *Enterobacteriaceae*, é capaz de conferir resistência às penicilinas, mas não apresenta a capacidade de hidrolisar cefalosporinas (Boyd e Mulvey, 2006). A maioria das enzimas tipo OXA não é considerada ESBL, pois não apresentam capacidade de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração. Porém, a identificação recente de substituições aminoacídicas em locais

específicos do sítio activo desta  $\beta$ -lactamase justifica o aumento do seu espectro de actividade com hidrólise, nomeadamente, de cefalosporinas de terceira geração e de carbapenemes. O estatuto de ESBL ou carbapenamase das  $\beta$ -lactamases de classe D tem vindo a ser conseguido como consequência de substituições aminoacídicas em enzimas parentais, como OXA-1, OXA-2 ou OXA-10 (Bradford, 2001).

Actualmente, tem sido evidenciada uma emergência de enzimas de classe D com actividade sobre os carbapenemes. A sua grande maioria é detectada em estirpes de *Acinetobacter baumannii* e possui origem plasmídica. Por outro lado, a frequente integração dos genes que as codificam em elementos genéticos móveis tem facilitado a disseminação global destes genes (Walther-Rasmussen e Hoiby, 2006). Actualmente, existem descritas 150  $\beta$ -lactamases do tipo OXA que se dividem funcionalmente entre oxacilinas, ESBL e carbapenemases (<http://www.lahey.org/Studies>).

### 3.2.6. Carbapenemases (Classes A, B e D)

A ocorrência de estirpes produtoras de carbapenemases tem vindo a aumentar ao longo dos anos. Este grupo fenotípico é constituído por uma combinação heterogénea de  $\beta$ -lactamases de classe A (penicilinas), classe B (metaloenzimas) e classe D (oxacilinas). Estas enzimas partilham a capacidade de hidrolisar uma classe específica de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, os carbapenemes. Adicionalmente, podem hidrolisar penicilinas, cefalosporinas ou monobactâmicos (Tabela 7) (Queenan e Bush, 2007).

As enzimas de classe B são particularmente eficientes como carbapenemases. As IMP (activa frente ao Imipenem) mediadas por plasmídeos surgiram na Ásia, especialmente em bactérias de Gram negativo como *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. As VIM (*Verona Integron-encoded  $\beta$ -lactamase*), por sua vez, foram descritas pela primeira vez na década de 90 e, presentemente, encontram-se disseminadas na Europa, América do Sul e, em particular, na Ásia (Nordmann e Poirel, 2002).

A família GES/IBC (*Guiana Extended Spectrum e Integron-Borne  $\beta$ -lactamase*) foi descrita pela primeira vez após 2000, em França e na Grécia, respectivamente. Estas enzimas diferem, entre si, apenas em dois aminoácidos e possuem os motivos aminoacídicos típicos de carbapenemases de Classe A: resíduos de cisteína nas posições 69 e 238 (os quais têm sido encontrados igualmente nas famílias KPC, SME e NMC/IMI). Os genes que codificam GES são, frequentemente, encontrados em integrões e plasmídeos. Uma vez que estas enzimas possuem um espectro de actividade que inclui penicilinas e cefalosporinas de terceira geração

foram inicialmente classificadas como ESBL. Porém, veio a verificar-se que GES-2, com a substituição de um aspartato por uma glicina na posição 170, hidrolisava imipenem, pelo que a família foi reclassificada (Jacoby e Munoz-Price, 2005; Lee e Jeong, 2005).

Considerando que os carbapenemes são praticamente os únicos antibióticos possíveis de utilizar no controlo de algumas infecções causadas por bactérias de Gram negativo, nomeadamente *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, o aparecimento de tais enzimas é, de facto, preocupante (Livermore e Woodford, 2006). Embora apresentem um perfil de hidrólise variável entre os diferentes grupos, pode afirmar-se que as carbapenemases apresentam a capacidade teórica de hidrolisar todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos disponíveis na prática clínica.

**Tabela 7.** Perfil de hidrólise e inibição das carbapenemases (Queenan e Bush, 2007).

Classe	Grupo	Enzima	Perfil Hidrólise				Perfil Inibição		
			PEN	C <sub>1</sub> G, C <sub>2</sub> G	C <sub>3</sub> G, C <sub>4</sub> G	ATM	Carbs.	EDTA	Ácido Clavulânico
A	2f	NMC	+	+	+	+	+	-	+
		IMI	+	+	+	+	+	-	+
		SME	+	+	+/-	+	+	-	+
		KPC	+	+	+	+	+	-	+
		GES	+	+	+	-	+/-	-	+
		IMP	+	+	+	-	+	+	-
B	3	VIM	+	+	+	-	+	+	-
		GIM	+	+	+	-	+	+	-
		SPM	+	+	+	-	+	+	-
D	2d	OXA	+	+	+/-	-	+/-	-	+/-

PEN, Penicilinas; C<sub>1</sub>G, Cefalosporinas 1<sup>a</sup> geração; C<sub>2</sub>G, Cefalosporinas de 2<sup>a</sup> geração; C<sub>3</sub>G, Cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração; C<sub>4</sub>G, Cefalosporinas de 4<sup>a</sup> geração; ATM, Aztreonam; Carbs., Carbapenemes.

#### 4. Objectivos

Considerando o impacto das  $\beta$ -lactamases na resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, documentado no presente capítulo, julgou-se pertinente efectuar um estudo que incluísse os seguintes objectivos:

- I. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em isolados de Gram negativo, associada, ou não, a multirresistência;

- II. Caracterização dos mecanismos de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, mediados por produção de  $\beta$ -lactamases, orientada pela leitura interpretativa do antibiograma. Pesquisa e identificação de genes que codificam  $\beta$ -lactamases específicas;
- III. Avaliação da diversidade dos genes que codificam as  $\beta$ -lactamases identificadas no estudo, para uma compreensão da sua evolução;
- IV. Avaliação da importância das mutações não sinónimas no perfil de hidrólise das enzimas identificadas;
- V. Caracterização bioquímica de uma nova  $\beta$ -lactamase e análise da importância da substituição aminoacídica, que a distingue da enzima parental, na estrutura-função dessa enzima e, conseqüentemente, na sua contribuição para a resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

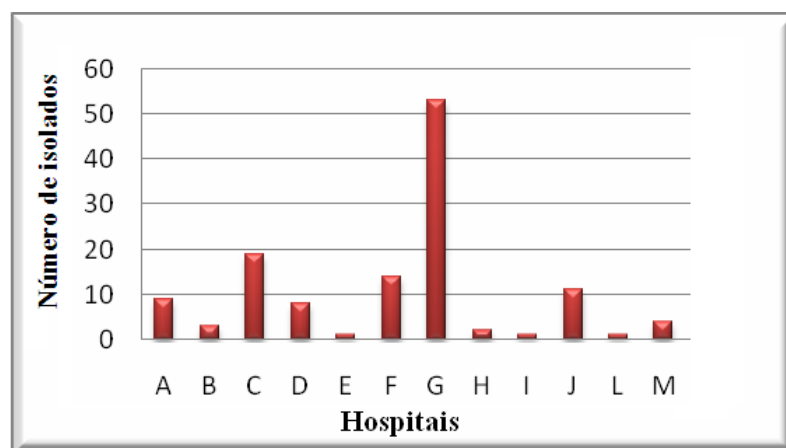
## II. Material e Métodos

### 1. Isolados bacterianos

Para o presente trabalho foi utilizado um total de 127 isolados de Gram-negativo, nomeadamente *E. coli* (n=81), *K. pneumoniae* (n=33), *E. cloacae* (n=5), *E. aerogenes* (n=5), *E. agglomerans* (n=1), *C. freundii* (n=1) e *P. aeruginosa* (n=1). Do total, 126 isolados bacterianos foram seleccionados aleatoriamente da colecção de isolados do *Laboratório Nacional de Referência de Resistência aos Antimicrobianos* (URRA) do *Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge* (INSA), garantindo a ausência de duplicações e tendo como critérios apenas a existência de diversidade de espécies na amostra e a resistência dessas à amoxicilina. Aqueles isolados são provenientes de Laboratórios Hospitalares de Portugal continental, os quais integram o *Programa de Vigilância da Resistência aos Antibióticos em Portugal* (*Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal*, ARSIP), nomeadamente com o envio de isolados para a URRA (INSA). Foi solicitado, às instituições hospitalares de origem, o envio de isolados produtores de  $\beta$ -lactamases ESBL, os quais terão sido identificados pelos métodos aí utilizados (exemplos: Vitek<sup>®</sup>, ATB G-5<sup>®</sup>).

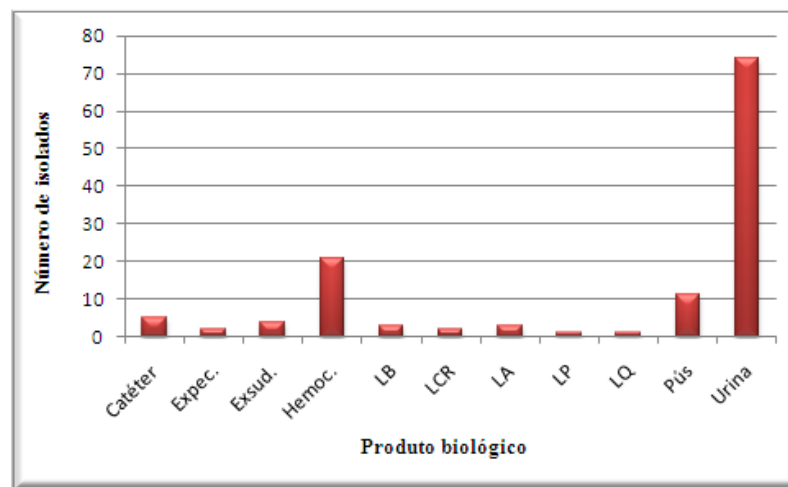
Um isolado adicional, proveniente de uma instituição hospitalar sediada na Argélia, foi adicionado à amostra a estudar, por se considerar de interesse no âmbito da presente tese, no entanto, dada a origem e especificidade da caracterização a que se pretendia submetê-la, não será integrado no total de isolados.

Globalmente, os isolados estudados foram recolhidos em doze instituições hospitalares distintas, tal como representado na *Figura 4*, tendo-se incluído como critério adicional o estudo alargado de um dos Hospitais da amostra, cuja selecção recaiu sobre o Hospital G.

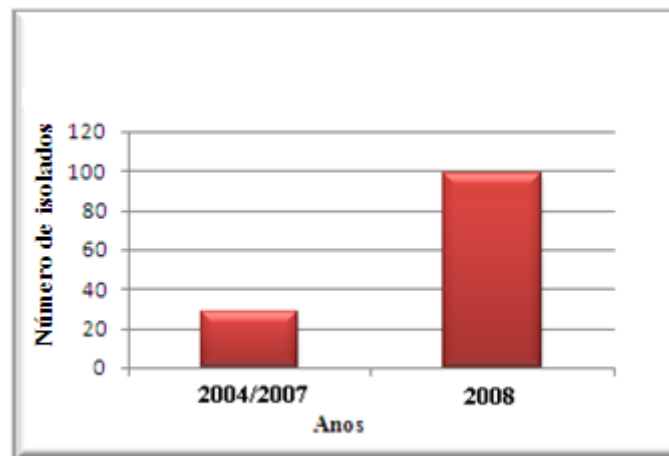


**Figura 4.** Distribuição de 126 isolados pelos hospitais de origem.

Os isolados bacterianos tiveram origem em vários produtos biológicos em dois períodos temporais, 2004 a 2007 e 2008 (*Figuras 5 e 6*).

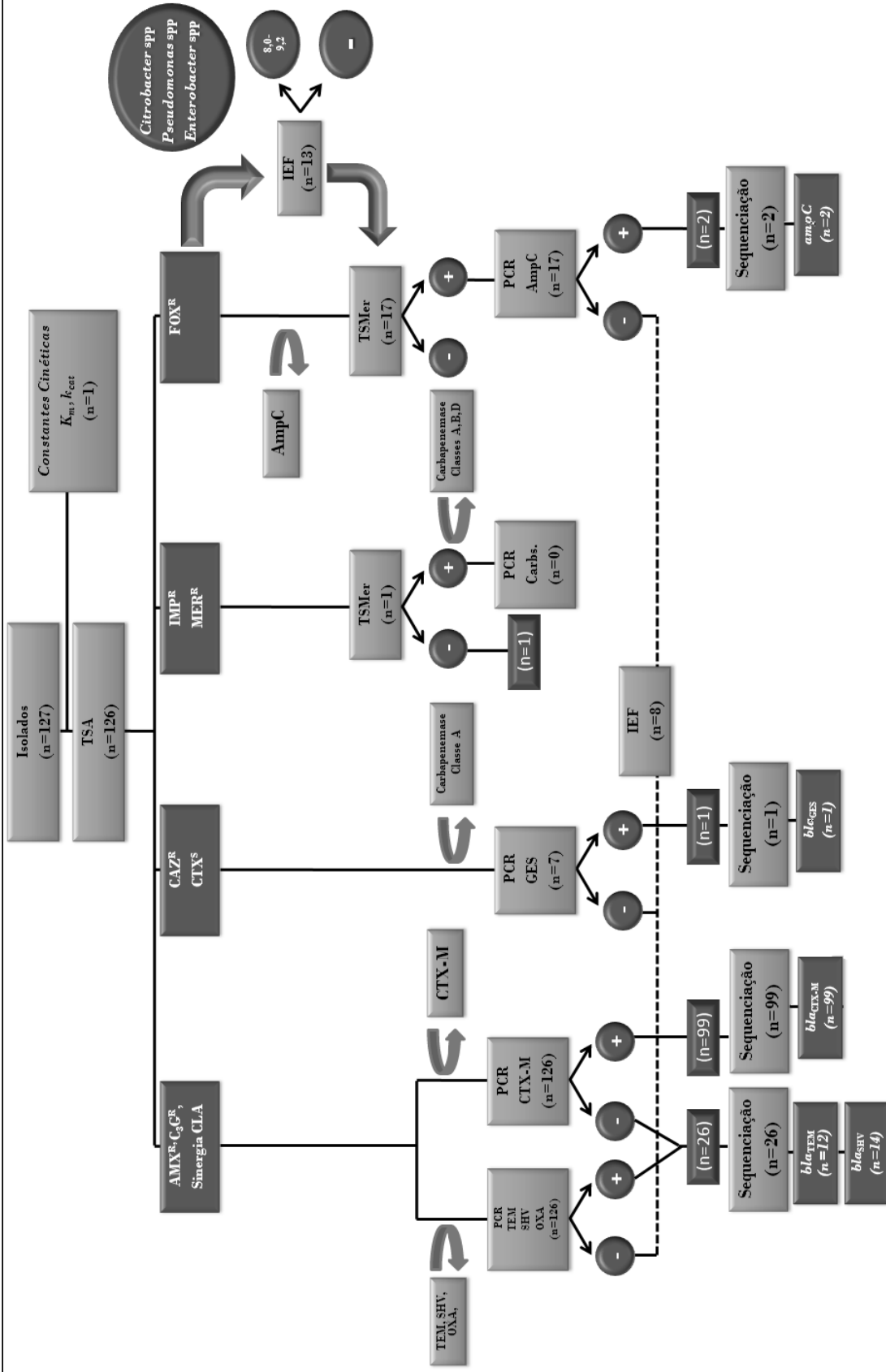


**Figura 5.** Distribuição de 126 isolados por produto biológico. Expec., Expectoração; Exsud., Exsudado; Hemoc., Hemocultura; LB, Lavado brônquico; LCR, Líquido cefalo-raquidiano; LA, Líquido ascítico; LP, Líquido pleural; LQ, Líquido de quisto.



**Figura 6.** Distribuição de 126 isolados por dois períodos temporais.

Sempre que necessário, a identificação dos isolados foi confirmada na URRA pelo sistema API20E<sup>®</sup>, de acordo com as instruções do fabricante. Os 127 isolados em estudo foram analisados de acordo com o algoritmo representado na *Figura 7*.



**Figura 7.** Algoritmo utilizado na caracterização fenotípica, genotípica e bioquímica de 127 isolados. AMX<sup>R</sup>, Isolados resistentes à amoxicilina; C<sub>3</sub>G<sup>R</sup>, Isolados resistentes às cefalosporinas de terceira geração; Sinergia CLA, Sinergia com ácido clavulânico; CAZ<sup>R</sup>, Isolados resistentes à ceftazidima; CTX<sup>S</sup>, Isolados susceptíveis à ceftazidima; IMP<sup>R</sup>, Isolados resistentes ao imipenem; MER<sup>R</sup>, Isolados resistentes ao meropenem; FOX<sup>R</sup>, Isolados resistentes à ceftoxitina; Carbs., Carbenemases; TSMer, Teste de sinergia com meropenem.



---

---

## 2. Caracterização fenotípica

### 2.1. Teste de susceptibilidade aos antibióticos

A determinação da susceptibilidade de 126 isolados foi efectuada pelo teste de susceptibilidade aos antibióticos (TSA), após cultura em de meio de gelose simples (INSA) para avaliação da sua pureza e obtenção de colónias isoladas. Para preparação de uma suspensão bacteriana com turvação aproximada de 0,5 McFarland (*Dade Behring, MicroScan® Turbidity Meter*) ressuspenderam-se duas a cinco colónias em 2ml de soro fisiológico estéril e diluiu-se a 1:100 em soro fisiológico num volume total de 10ml; de seguida, semearam-se duas placas quadradas (120mm x 120mm) de *Muller-Hinton* agar (INSA) (para cada estirpe) por inundação.

Após 10 minutos aplicaram-se os seguintes discos de antibiótico (*Biorad*) com o auxílio de um dispensador automático (16 discos por placa): amoxicilina, ticarcilina, piperacilina, cefalotina, amoxicilina com ácido clavulânico, cefotaxima com ácido clavulânico, cefotaxima, cefpodoxima, cefepima, aztreonam, imipenem, ceftazidima, cefuroxima, cefixima, cefoxitina e piperacilina com tazobactam, na placa número um, e ácido nalidíxico, norfloxacina, pefloxacina, ciprofloxacina, kanamicina, gentamicina, amicacina, trimetoprim com sulfametoxazole, colistina, fosfomicina, nitrofurantoína, trimetoprim, meropenem, ceftazidima com ácido clavulânico, ceftriaxona e tigeciclina, na placa número 2 (*Tabela 8*). Foram ainda aplicados discos de amoxicilina com ácido clavulânico entre os discos de cefotaxima, ceftazidima, cefpodoxima e imipenem e discos de imipenem com 750µg de EDTA, colocados a 15mm do disco de imipenem e do disco de meropenem.

Após incubação das placas a 37°C, durante 18h, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição para cada um dos antibióticos e analisada a presença de sinergia e/ou antagonismo. Os resultados obtidos foram interpretados de acordo com o *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (2008).

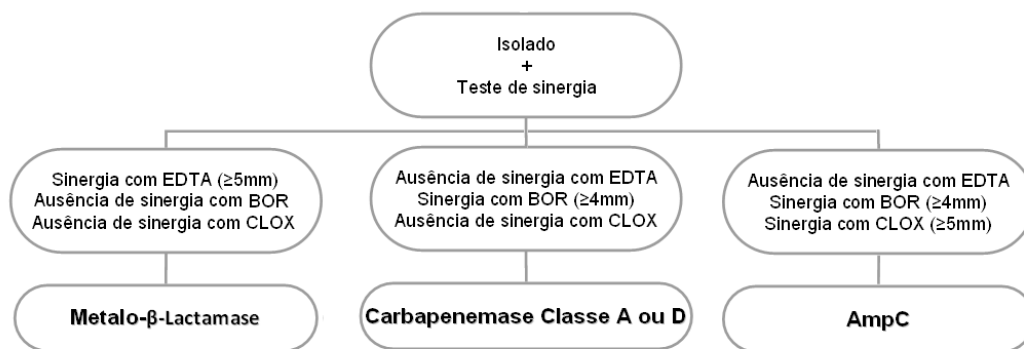
**Tabela 8.** Antibióticos utilizados no TSA realizado pelo método de difusão em disco, suas principais características e valores de diâmetros críticos (em milímetros) de acordo com o *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (SFM)*. *S*, susceptibilidade; *R*, resistência. Qualquer valor entre ambos corresponde a susceptibilidade intermédia.

Classe de antibiótico	Antibiótico	Sigla	Diâmetros críticos SFM (mm)	Carga do disco (µg)
Penicilinas	Amoxicilina	AMX	S: ≥ 21; R: <16	25
	Piperacilina	PIP	S: ≥20; R: <16	75
	Ticarcilina	TIC	S: ≥ 24; R: <22	75
Cefemes (parentais)	Cefalotina	CF	S: ≥18; R: <12	30
	Cefuroxima	CXM	S: ≥25; R: <22	30
	Cefoxitina	FOX	S: ≥22; R: <15	30
	Cefotaxima	CTX	S: ≥26; R: <23	30
	Ceftriaxona	CRO	S: ≥26; R: <23	30
	Ceftazidima	CAZ	S: ≥26; R: <19	30
	Cefepima	FEP	S: ≥24; R: <17	30
	Cefpodoxima	CPD	S: ≥24; R: <21	10
Cefemes (orais)	Cefixima	CFM	S: ≥25; R: <22	10
	Aztreonam	ATM	S: ≥27; R: <21	30
Carbapenemes	Imipinem	IMP	S: ≥24; R: <17	10
	Meropenem	MER	S: ≥22; R: <15	10
Associação de β-lactâmicos / inibidores de β-lactamases	Amoxicilina + Ácido clavulânico	AMC	S: ≥21; R: <16	20+10
	Piperacilina + tazobactam	TZP	S: ≥21; R: <17	75+10
	Cefotaxima + ácido Clavulânico	CCTX	-	30+10
	Ceftazidima + ácido clavulânico	CCAZ	-	30+10
Aminoglicosídeos	Amicacina	NA	S: ≥17; R: <15	30
	Gentamicina	GEN	S: ≥18; R: <16	15
	Kanamicina	KAN	S: ≥17; R: <15	30
Quinolonas	Ácido nalidixico	NA	S: ≥ 20; R: <15	30
	Ciprofloxacina	CIP	S: ≥25; R: <22	5
	Norfloxacina	NOR	S: ≥ 25; R: <22	5
	Pefloxacina	PEF	S: ≥22; R: <16	5
Inibidores do metabolismo do ácido fólico	Trimetoprim + Sulfametoxazol	SXT	S: ≥16; R: <10	1,25+ 23,75
	Trimetoprim	TMP	S: ≥20; R: <12	5
Lipopéptidos	Colistina	CS	S: ≥15; R: <15	50
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	FT	S: ≥15; R: <15	300
Glicilciclina	Tigeciclina	TGC	S: ≥21; R: <19	15
Fosfomicinas	Fosfomicina	FOS	S: ≥14; R: <14	50

## 2.2. Teste de sinergia com meropenem

O teste de sinergia com meropenem foi efectuado sempre que a leitura interpretativa do TSA sugeriu a possibilidade de produção de carbapenemases (classes A, B ou D) e/ou cefalosporinas (Classe C).

Para a realização deste teste efectuou-se uma suspensão bacteriana (tal como referido em 2.1.), posteriormente diluída a 1:10, com a qual se semeou uma placa de *Muller-Hinton* (INSA) por espalhamento com zaragatoa, de forma a obter crescimento confluyente. Com o auxílio de uma pinça estéril aplicaram-se quatro discos de meropenem (10µg, *Biorad*) a uma distância de 30mm entre si. De seguida, adicionaram-se as seguintes soluções a três daqueles discos: 750µg de EDTA (5µl de uma solução 0,5M), 600µg de ácido borónico (7µl de uma solução 0,5M) e 750µg de cloxacilina (6µl de uma solução 0,25M). As placas incubaram a 37°C, durante 18h. Os resultados foram interpretados de acordo com o esquema que se apresenta na *Figura 8*.



**Figura 8.** Algoritmo usado na leitura interpretativa dos testes de sinergia com meropenem para detecção de metalo-β-lactamases, carbapenemases de classe A ou D e β-lactamases AmpC (cromossómicas ou plasmídicas). BOR, Ácido borónico; CLOX, cloxacilina.

### 2.3. Transferência plasmídica

Para avaliar o contributo das β-lactamases ESBL e AmpC no fenótipo dos isolados expressou-se esse fenótipo num sistema isogénico (n=13), pelo que se procedeu à transferência plasmídica por dois métodos distintos: conjugação e transformação.

#### 2.3.1. Conjugação

A conjugação bacteriana foi efectuada em meio sólido e em meio líquido utilizando *E. coli* J<sub>53</sub> NaN<sub>3</sub><sup>R</sup> como estirpe receptora; a azida de sódio foi utilizada como marcador de selecção, pois os isolados em estudo eram susceptíveis a este composto. Foram utilizados os dois métodos em simultâneo, dada a dificuldade observada na conjugação daqueles determinantes plasmídicos.

As estirpes dadora e receptora foram semeadas em meio de gelose simples (INSA) e incubadas 18h, a 37°C; posteriormente, transferiu-se uma colónia isolada de cada estirpe

clínica para tubos com 5ml de *Brain Heart Infusion* (BHI) (INSA) e incubou-se durante 18h, a 37°C, em estufa com agitação.

Na conjugação em meio sólido sobrepôs-se 100µl da cultura da estirpe receptora e 50µl da cultura da estirpe dadora numa placa de *Muller-Hinton* agar. Na conjugação em meio líquido pipetaram-se 2ml da cultura da estirpe receptora e 1ml da estirpe dadora para novo tubo de BHI. Colocaram-se as placas e os tubos a incubar a 37°C, durante 24h, para que ocorresse a transferência plasmídica.

Para seleccionar os transconjugantes com o plasmídeo da estirpe dadora foram utilizadas placas de *Muller-Hinton* agar adicionado de uma concentração de 2µg/µl de cefotaxima, amoxicilina ou cefoxitina (antibióticos aos quais a estirpe receptora era susceptível) (*GlaxoSmithKline*) e 200µg/µl de azida de sódio (composto ao qual a estirpe dadora era susceptível) (BDH). Estas placas foram inoculadas com 100µl de uma suspensão do transconjugante (em 2ml de água destilada estéril), semeadas por espalhamento (utilizando um espalhador de vidro). As placas foram incubadas a 37°C, durante 24h.

### **2.3.2. Transformação por electroporação**

#### **2.3.2.1 Extracção de DNA plasmídico**

Para a extracção de DNA plasmídico dos isolados, necessária à transformação por electroporação, utilizou-se o *kit Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System* de acordo com o protocolo que se segue.

Inoculou-se 100ml de meio *Luria-Bertani* (INSA) com uma colónia isolada em gelose simples, e incubou-se 18h, a 37°C, com agitação. De seguida, centrifugou-se (4°C/10min/10000rpm) e ressuspendeu-se o *pellet* em 3ml de solução de ressuspensão (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100µg/ml Rnase A), tendo-se posteriormente adicionado 3ml de solução de lise (0,2M NaOH, 1% SDS) e incubado 5min, à temperatura ambiente. Adicionou-se 6ml de solução de neutralização (1,32M Acetato de potássio), homogeneizou-se por inversão e incubou-se novamente, durante 10min. Centrifugou-se (4°C/15min/14000rpm) e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de centrifuga. Adicionaram-se 10ml de resina, por cada isolado, e submeteu-se a mistura a filtração por vácuo (15-18Hg), tendo-se depois efectuado duas lavagens sucessivas com solução de lavagem (80mM Acetato de potássio, 8,3mM Tris-HCl e 40µM EDTA). Seguidamente, descartou-se o reservatório, e a coluna, com o DNA e a resina, foi colocada num tubo de

1,5ml; centrifugou-se durante 2min, a 10000rpm, para que o excesso de solução de lavagem e outros resíduos fossem eliminados. Posteriormente, adicionou-se à coluna 300µl de água bidestilada estéril, a 80°C, para promover a eluição do DNA, tendo depois sido efectuada uma última centrifugação (5min/10000rpm) para eliminar qualquer resíduo de resina. O DNA plasmídico foi depois visualizado por electroforese em gel de agarose (0,8%), conforme descrito na secção 4.2 deste capítulo e conservado a -20°C.

### 2.3.2.2. Electroporação

A transformação foi efectuada pela técnica de electroporação, utilizando uma alíquota de células *E. coli* HB<sub>101</sub> electrocompetentes à qual foram adicionados aproximadamente 60ng de DNA plasmídico numa *cuvete* (para cada isolado em estudo); estas células foram submetidas a electroporação num aparelho *Gene Pulser Xcell Electroporation System, Biorad* (C=25µF; PC=200ohm; V=2,5kV). Imediatamente a seguir ao pulso foi adicionado 1ml de meio *Luria-Bernani* (INSA), ressuspendendo-se as células por inversão. Depois incubou-se durante 1h, a 37°C e, posteriormente, centrifugou-se (5min/5000rpm). Rejeitou-se 900µl de sobrenadante, tendo-se ressuspendido as células no remanescente e, com este, semearam-se placas de meio *Luria-Bertani* agar (INSA) adicionado de 25µg/ml de amoxicilina (marcador de selecção), as quais se incubaram 18h, a 37°C. Posteriormente, foram repicadas 10 colónias de cada placa e realizada extracção de DNA pelo método de fervura; a confirmação da presença dos genes em estudo foi efectuada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (vide secções 4.1 e 4.2 deste capítulo).

## 3. Caracterização bioquímica

### 3.1. Identificação de β-lactamases

A focagem isoléctrica foi efectuada para os isolados em que não foi possível determinar o genótipo através das técnicas moleculares utilizadas ou para confirmação da expressão de enzimas com localização cromossómica (*Figura 7*).

#### 3.1.1. Extracção de β-lactamases por sonicação

Para a extracção de β-lactamases, fase que precede a realização da focagem isoelectrica, inocularam-se 15ml de *Brain Heart Infusion* (INSA) com uma colónia previamente isolada em gelose simples (INSA). Incubou-se esta suspensão durante 18h, a 37°C, em estufa com agitação. Em seguida, centrifugou-se (4°C/15min/10000rpm) e

ressuspendeu-se o *pellet* em 1ml de água destilada estéril, por agitação, em *vortex*<sup>®</sup>. A sonicação das células foi efectuada, de seguida, durante 1min e 30s com um sonicador (*UP 200S, Dr. Hielscher, GmbH*). A suspensão resultante foi centrifugada (4°C/30min /16000rpm) e o sobrenadante, onde se encontrava a enzima a estudar, foi conservado a -20°C.

### 3.1.2. Pesquisa de actividade enzimática

A presença de  $\beta$ -lactamases nos extractos obtidos em 3.1.1. determinou-se através de um teste colorimétrico, que se traduz na adição de 5 $\mu$ l de *Nitrocefín (Oxoid)* a 5 $\mu$ l de cada amostra a ensaiar. A degradação do substrato (*Nitrocefín*) pela enzima altera a sua cor amarela inicial para vermelho.

### 3.1.3. Focagem isoeléctrica

A identificação qualitativa das  $\beta$ -lactamases (após 3.1.2.) foi efectuada por focagem isoeléctrica.

#### 3.1.3.1. Preparação do gel de migração

Colocou-se o GelBond<sup>®</sup>PAG Film (*Amersham Pharmacia Biotech AB*) sobre uma placa de vidro, previamente tratada com *Repel-Silane (Pharmacia)*, com a parte hidrófila para cima. De seguida, outra placa de vidro, também tratada com o mesmo reagente, foi assente por cima do filme, e segura à primeira placa, por meio de molas. Para a preparação do gel de migração, num volume final de 31,1ml, utilizaram-se os reagentes descritos na *Tabela 9*. A solução preparada foi, de seguida, injectada entre as duas placas, onde polimerizou por exposição à luz, durante 25min.

#### 3.1.3.2. Migração

Decorrido o período de polimerização, o gel foi colocado na plataforma de migração (*Multiphor II, Amersham Pharmacia Biotech*), mantendo-se refrigerado por um banho à temperatura de 12°C (*Multitemp III, Amersham Pharmacia Biotech*). De seguida, colocaram-se no gel (ânodo) os papéis (*Amersham Biosciences AB*) que serviram de suporte para a aplicação dos extractos enzimáticos, num volume de 5 $\mu$ l. Por último, aplicaram-se no gel duas tiras de papel de filtro (*Amersham Pharmacia Biotech AB*), uma embebida em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M (no ânodo) e outra em NaOH 1M (no cátodo), os quais asseguravam o contacto entre o gel e os eléctrodos. A migração teve a duração de 1 hora, com uma voltagem de 1500V, intensidade de 30mA e potência de 30W. De modo a permitir a leitura posterior dos pontos

isoelectrónicos (pI) das enzimas em estudo, também se aplicaram no gel extractos de algumas  $\beta$ -lactamases de referência, cujos pIs são conhecidos: *E. coli* Guer (IRT-2, pI 5,2), *E. coli* R111 (TEM-1, pI 5,4), *E. coli* RP4 (TEM-2, pI 5,6), *Salmonella typhimurium* (OXA-1, pI 7,4), *E. coli* C600 (SHV-1, pI 7,6), *E. coli* 5753 (CTX-M-15, pI 8,9) e *E. coli* Soler (AmpC, pI 9,2).

**Tabela 9.** Reagentes utilizados na preparação do gel de migração para Focagem Isoelétrica.

Reagentes	Volume (ml)	Gel de migração (%)
ReadySol IEF 40% ( <i>Pharmacia Biotech</i> )	3,75	12,06
Ampholine® (pH 7.0-9.0) ( <i>Amersham Pharmacia Biotech AB</i> )	2	6,43
Água destilada	24	77,17
Persulfato de amónia 10% ( <i>Merck</i> )	0,85	2,73
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina) ( <i>Merck</i> )	0,50	1,61

### 3.1.3.3. Preparação do gel de revelação

Foram dissolvidos, por aquecimento, 14,7mg/ml de agar (*Difco*) e 4,9mg/ml de amido (*Difco*) em 70ml de tampão fosfato 0,1M, pH 6. Depois de arrefecido, adicionou-se 0,13mg/ml de penicilina G (*Wyeth*) e 0,04ml/ml de uma solução de iodo, sendo esta última composta por 20mg/ml de iodo (*Sigma*) e por 530mg/ml de iodeto de potássio (*Merck*). De seguida, injectou-se o gel entre duas placas de vidro previamente aquecidas, de forma a evitar a polimerização nesta fase, colocando-se depois no frio, para solidificar. Após migração, colocou-se o gel de revelação sobre o gel de acrilamida (3.1.3.2).

A revelação da presença do extracto enzimático no gel foi possível devido à hidrólise enzimática da penicilina G pela  $\beta$ -lactamase, a qual origina ácido penicilínico; este promove a redução do iodo na presença do amido, descorando o gel de revelação. A determinação dos pIs nas amostras em estudo fez-se por comparação com as enzimas de referência.

## 3.2. Cinética enzimática

No âmbito do presente trabalho, procedeu-se à determinação das constantes cinéticas de uma nova enzima da família SHV (SHV-99), a qual foi detectada, pela primeira vez, no âmbito de um estudo anterior efectuado na URRA. O trabalho prévio incluiu o isolamento do gene codificante (*bla<sub>SHV-99</sub>*) e a sua inserção num vector para expressão da actividade enzimática num sistema isogénico, e caracterização da proteína isoladamente.

### 3.2.1. Extracção e purificação de $\beta$ -lactamases

Os clones produtores da  $\beta$ -lactamase em estudo foram semeados em meio de gelose simples, posteriormente incubado a 37°C, durante 18h. De seguida, inocularam-se 6L de meio

*Luria-Bertani* (INSA) (suplementado com extracto de levedura, 30µg/ml de kanamicina e 25 µg/ml de amoxicilina) com uma colónia isolada e incubou-se a 37°C, 18h. As células foram recolhidas por centrifugação (4°C/15min/10000 rpm) e os *pellets*, após terem sido lavados em água ultra pura (*Millipore-Milli Q*®), foram ressuspendidos em MES-NaOH 20mM (pH 6,0). Seguiu-se a destruição das membranas celulares com ultrasons (ciclos de três vezes 1min com intervalos de 30s) (*UP 200S, Dr. Hielscher, GmbH*) e uma nova centrifugação para clarificar o extracto. De seguida, procedeu-se à precipitação do DNA por incubação com espermina 0,2M, durante 20m, e efectuou-se uma nova centrifugação, da qual foi recolhido o extracto proteico, posteriormente submetido a diálise (*Cellu Sep*® T3) em MES-NaOH 20mM (pH 6,0) e a micro-filtração (*115mL filter unit, NALGENE*®).

A purificação das β-lactamases foi efectuada, numa primeira fase, por cromatografia de troca iónica, com uma coluna HiPrep 16/10 SP HF (*Amershan Pharmacia Biotech*) e, posteriormente, por cromatografia de filtração em gel, com uma coluna HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR (*Amershan Pharmacia Biotech*) num aparelho AKTA PRIME PLUS (*GE Healthcare*), de acordo com o descrito por Bonnet *et al.* (2001). Entre aquelas duas etapas, o extracto proteico foi submetido a um processo de ultra-filtração (*Amicon Ultra-15, Millipore*) e depois da cromatografia de filtração em gel realizou-se novamente diálise, micro-filtração e ultra-filtração, como descrito anteriormente.

Ao longo do processo de extracção e purificação foram recolhidas várias alíquotas de extracto proteico, cuja pureza foi avaliada por electroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (Sulfato dodecil de sódio). A técnica foi executada como descrito por Bonnet *et al.* (2001), com concentrações finais de acrilamida de 12 e 14% (p/v) para os géis de resolução e concentração, respectivamente. As proteínas foram coradas com azul de Comassie R-250.

A concentração de proteína obtida após purificação foi determinada com o *kit BCA Protein Assay* (*Pierce, Rockford*), de acordo com as instruções do fabricante. Para tal, foi construída uma curva padrão com várias concentrações de albumina de soro bovino, sendo determinada, por comparação, a concentração da proteína em estudo.

### 3.2.2. Determinação das constantes cinéticas por acidimetria

Para a determinação dos parâmetros cinéticos da β-lactamase em estudo foi utilizado um método de acidimetria computadorizada (*Metrohm Swiss Made 702SM Titrino e agitador magnético 728 Stirrer*) associado a *software* pHStat® (Labia, 1973). Os parâmetros cinéticos



de interesse,  $V_{max}$  (Velocidade máxima da reacção),  $K_m$  (Constante de Michaelis) e  $k_{cat}$  (Constante de actividade catalítica), foram determinados por titulação do ácido penicilínico, resultante da hidrólise do antibiótico, e posterior análise das curvas de hidrólise dos antibióticos e da respectiva regressão. Estes parâmetros foram calculados para diversos substratos (penicilina G, amoxicilina, ticarcilina, piperacilina, cefalotina, cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima e aztreonam) numa concentração de 2mM. A reacção de hidrólise decorreu em NaCl 100mM, a pH 7.0. Foi também determinada a concentração de inibidor (ácido clavulânico e tazobactam) necessária para inibir 50% da actividade enzimática da  $\beta$ -lactamase ( $IC_{50}$ ), tendo sido utilizado como substrato uma solução de ticarcilina, numa concentração de 200 $\mu$ M (Bonnet *et al.*, 1999).

#### 4. Caracterização genotípica

A leitura interpretativa do TSA (secção 2.1) permitiu dirigir a pesquisa para famílias específicas de genes *bla*.

Nos isolados que apresentaram susceptibilidade diminuída às cefalosporinas de terceira geração e sinergia com os inibidores de  $\beta$ -lactamases, pesquisaram-se mecanismos de resistência responsáveis por aquele fenótipo, como a presença de genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub>. Na ausência de *bla*<sub>CTX-M</sub> sequenciaram-se os genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> para determinar a origem do fenótipo ESBL. Nos isolados com resistência à cefoxitina, pesquisaram-se oito genes (*bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>LAT</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, *bla*<sub>ACT</sub> e *bla*<sub>MIR</sub>) que codificam  $\beta$ -lactamases plasmídicas da família AmpC. Sempre que os isolados apresentaram resistência à ceftazidima e susceptibilidade à cefotaxima procedeu-se à pesquisa de genes *bla*<sub>GES</sub>; neste caso, os genes amplificados foram identificados por sequenciação para confirmação dos fenótipos de resistência. No caso de susceptibilidade diminuída aos carbapenemes e resultado positivo no teste de sinergia com meropenem, o que não se verificou, ter-se-ia procedido à detecção de genes que codificam carbapenemases (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>SME</sub>, *bla*<sub>NMC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>OXA</sub>).

Como se pode observar na *Figura 7*, houve isolados cujo fenótipo era indicativo de mais de um mecanismo de resistência, pelo que integraram mais do que um percurso, portanto, foi pesquisado mais do que um gene.

#### 4.1. Extração e quantificação de DNA

Para a caracterização genotípica dos isolados em estudo foi primeiramente realizada a extração de DNA por fervura e a respectiva quantificação por espectofotometria.

Assim, os isolados foram semeados em meio de gelose simples e incubados a uma temperatura de 37°C, durante 18h. Posteriormente, foram ressuspensas várias colónias daquela cultura em 750µl de água bidestilada estéril. Esta suspensão foi centrifugada (5min/4°C/10000rpm), rejeitando-se o sobrenadante e ressuspendendo o *pellet* em 500µl de água bidestilada estéril, seguido de nova centrifugação idêntica à anterior. O *pellet* foi, então, ressuspendido em 100µl de água bidestilada estéril e fervido num banho durante 15min. De seguida, a suspensão foi novamente centrifugada, recolhendo-se o sobrenadante onde se encontrava o DNA.

O DNA recém-extraído foi quantificado por espectofotometria e diluído por forma a ser obtida uma concentração final de 100ng/µl, para amplificação por PCR.

#### 4.2. Detecção de genes *bla*

A pesquisa de genes que codificam β-lactamases foi efectuada utilizando três PCRs (*Polymerase Chain Reaction*) distintos. Os genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> e *ampC* foram detectados por PCR *multiplex* e os genes *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>GES</sub> por PCR simples, tendo o gene *ampC* sido detectado apenas por constituir um controlo interno da espécie *E. coli*. A existência de genes que codificam enzimas AmpC plasmídicas, como *bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>LAT</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, *bla*<sub>ACT</sub> e *bla*<sub>MIR</sub>, foi pesquisada por outro PCR *multiplex*.

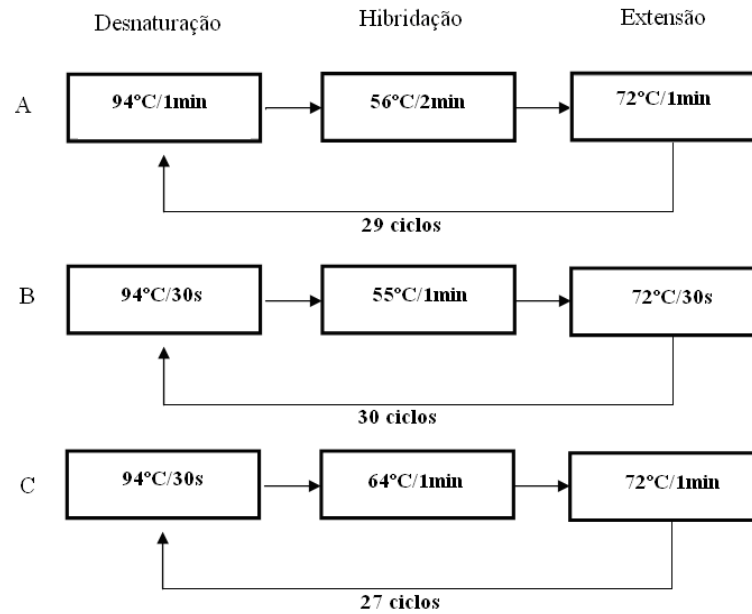
A mistura de pré-PCR, preparada numa câmara de fluxo laminar (Holton), era composta por: tampão (1x, *Quiagen*), dNTPs (0,2mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl<sub>2</sub> (3mM, *Quiagen*), Q solution (1x, *Quiagen*), *primers* específicos (*Tabela 10*) e Taq polimerase (1,25 unidades, *Quiagen*), para os PCRs simples. No que respeita aos PCRs *multiplex*, o protocolo usado foi semelhante ao anterior, com excepção da concentração de cada dNTP (0,5mM). Em todos os PCRs foi adicionado DNA numa concentração final de 4ng/µl e a H<sub>2</sub>O necessária para um volume final de 25µl.

Tabela 10. *Primers* utilizados na técnica de PCR para a amplificação de diferentes genes.

Designação do <i>Primer</i>	Sequência	Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Gene	Posição (5'→3')
P1	5'TACGATACGGGAGGGCTTAC3'	0,2	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	959/978
P2	5'TTCCTGTTTTTGTCCACCCA3'			282/262
AmpCF	5'CCCCGCTTATAGAGCAACAA3'	0,2	<i>ampC</i>	157/176
AmpCR	5'TCAATGGTCGACTTCACACC3'			791/772
SHVF	5'TCAGCGAAAAACACCTTG3'	0,2	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	311/328
SHVR	5'TCCCGCAGATAAATCACCA3'			782/764
OXAF	5'TATCTACAGCAGCGCCAGTG3'	0,2	<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	929/948
OXAR	5'CGCATCAAATGCCATAAGTG3'			1127/1118
CTXiF	5'TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA3'	0,4	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	205/227
CTXiR	5'CGATATCGTTGGTGGTGCCATA3'			748/727
MOXF	5'GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT3'	0,08	<i>bla</i> <sub>MOX</sub> <i>bla</i> <sub>CMY-G1</sub>	358/378
MOXR	5'CACATTGACATAGGTGTGGTGC3'			877/856
CITF	5'TGGCCAGAACTGACAGGCAA3'	0,08	<i>bla</i> <sub>LAT-1</sub> <i>bla</i> <sub>CMY-G2</sub>	478/498
CITR	5'TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC3'			939/919
DHAF	5'AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT3'	0,08	<i>bla</i> <sub>DHA</sub>	1244/1265
DHAR	5'CCGTACGCATACTGGCTTTGC3'			1648/1628
ACCF	5'AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA3'	0,08	<i>bla</i> <sub>ACC</sub>	861/881
ACCR	5'TTCGCCGCAATCATCCCTAGC3'			1206/1186
EBCF	5'TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG3'	0,08	<i>bla</i> <sub>MIR</sub> <i>bla</i> <sub>ACT</sub>	1115/1135
EBCR	5'CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT3'			1416/1396
FOXF	5'AACATGGGGTATCAGGGAGATG3'	0,08	<i>bla</i> <sub>FOX</sub>	1475/1496
FOXR	5'CAAAGCGCGTAACCGGATTGG3'			1664/1644
GESF	5'TTCCATCTCAAGGGATCACC3'	0,5	<i>bla</i> <sub>GES</sub>	-20/-1
GESR	5'GCGTCAACTATTTGTCCGTG3'			871/851

O DNA foi o último constituinte da mistura de pré-PCR a ser adicionado, iniciando-se de imediato a amplificação no termociclador (*MJ Research DNA Engine Thermal Cycler*). Os programas das reacções de PCR *multiplex* e de PCR simples diferiam entre si (*Figura 9*).

É de referir que em qualquer um dos programas descritos, havia ainda ciclos adicionais: um primeiro ciclo de desnaturação a 94°C, durante 7min, para garantir a desnaturação do maior número de moléculas de DNA, e um ciclo final de extensão a 72°C, durante 10min para os PCRs *multiplex*, ou de 5min para os PCRs simples, para completar a extensão de novas cadeias.



**Figura 9.** Programas utilizados na amplificação de (A) *PCR multiplex* para *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> e *ampC*; (B) *PCR simples* para *bla*<sub>CTX</sub> ou *bla*<sub>GES</sub> e (C) *PCR multiplex* para *bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>LAT</sub>, *bla*<sub>FOX</sub>, *bla*<sub>DHA</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, *bla*<sub>ACT</sub> e *bla*<sub>MIR</sub>.

Terminada a reacção de PCR e para confirmar a presença dos diferentes genes, realizou-se uma electroforese em gel de agarose a 1% (*Agarose Multi-Purpose, BIOLINE*) em TAE 1x (0,04M tris-acetato, 0,001M EDTA), com brometo de etídeo (*Sigma*) a 1%. Foram aplicados no gel 6µl dos produtos de PCR, adicionados de 2µl de tampão (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% xileno-cianol e 30% glicerol) e efectuada uma corrida durante 45min, a 120V, no caso dos produtos de amplificação de *PCR simples*, e 60min, a 120V, no caso de ambos os *PCR multiplex*. O tamanho do produto amplificado (pb) permitiu identificar os genes em causa, estimado por comparação com um DNA de peso molecular conhecido e com as testemunhas positivas respectivas.

### 4.3. Purificação de produtos de PCR

Para purificação dos produtos de PCR, obtidos previamente, utilizou-se um sistema de purificação – ExoSAP-IT (Usb®) – que tem como base a actividade enzimática de uma exonuclease e de uma fosfatase alcalina sobre o excesso de reagentes não utilizados na reacção de amplificação, como dNTPs e Taq polimerase. Para a realização da reacção de purificação adicionaram-se 4µl de EXOSAP a 10µl de produto de PCR. A reacção foi constituída por dois passos principais, ambos realizados no termociclador (*MJ Research DNA Engine Thermal Cycler*): uma fase de incubação a 37°C, durante 15min, que promoveu a

actividade das enzimas, e uma segunda etapa de 15 min, a 80°C, que teve como propósito a inactivação das mesmas. De forma a estimar a presença do DNA realizou-se uma electroforese em gel de agarose, de acordo com o que foi exposto na secção 4.2. Através da intensidade e nitidez das bandas estimou-se a concentração de produto purificado.

#### 4.4. Sequenciação automática pós-PCR

Com o objectivo de identificar os genes *bla* detectados por PCR foi efectuada a sequenciação de genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>CMY</sub> e *bla*<sub>DHA</sub>. Como estes genes foram amplificados, previamente, por *primers* internos (à excepção do gene *bla*<sub>GES</sub>), aqui realizaram-se PCRs simples (secção 4.2), nos quais foram utilizados *primers* que permitiram sequenciar a totalidade do gene, e assim, identificar correctamente as β-lactamases que codificam.

Para a reacção de sequenciação foi utilizada uma mistura de pré-sequenciação constituída por 2μl de BigDye v1.1 (*Applied Biosystem*), 10ng de DNA, *primers* específicos de acordo com o gene em causa (*Tabela 11*) e a água estéril necessária para perfazer um volume final de 10μl. A reacção de sequenciação consistiu numa primeira fase de desnaturação, por incubação a 96°C, durante 30s, seguindo-se uma incubação a 56°C, durante 5s e, por último, uma fase de extensão a 60°C, durante 4min. Os DNA sequenciados foram posteriormente enviados à *Unidade Laboratorial de Utilização Comum* do INSA, para remoção dos terminadores por precipitação alcoólica, migração no sequenciador automático (*ABI PRISM<sup>®</sup> 3100*, *Applied Biosystem*) e registo das sequências (electroferogramas). Estes foram posteriormente enviados à URRRA, onde foi efectuada a análise e interpretação das sequências, recorrendo ao *software Bionumerics* © *Applied Maths*.

**Tabela 11.** *Primers* utilizados na sequenciação automática.

Designação <sup>a</sup> do primer	Sequência	Concentração (pmol/μl)	Gene	Posição (5'→3')
FIN	5'ATTCTTGAAGACGAAAGGCG3'	0,4	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	0/19
DEB	5'ATGAGTAAACTTGGTCTGAC3'	0,4	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	1091/1072
SHV149P	5'CGCTTCTTTACTCGCCTTTA3'	0,8	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	-50/-31
SHV1059	5'TTAGCGTTGCCAGTGCTC3'	0,8	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	861/844
CTX-M-G1F	5'ATGGTTAAAAAATCACTGCG3'	0,4	<i>bla</i> <sub>CTX-MG1</sub>	0/20
CTX-M-15R	5'ACCGTCGGTGACGATTTTAG3'	0,4	<i>bla</i> <sub>CTX-MG1</sub>	973/954
CTX-M-G9F	5'ATGGTGACAAAGAGAGTGCAAC3'	0,4	<i>bla</i> <sub>CTX-MG9</sub>	0/21
CTX-M-9R2	5'ATAGAAAGTGGGGCACCGTA3'	0,4	<i>bla</i> <sub>CTX-MG9</sub>	935/916
DHA-1A	5'CTGATGAAAAAATCGTTATC3'	0,4	<i>bla</i> <sub>DHA</sub>	-3/17
DHA-1B	5'ATTCCAGTGCCTCAAAATA3'	0,4	<i>bla</i> <sub>DHA</sub>	1138/1118
CITFS	5'ATGATGAAAAAATCGTTATGC3'	0,4	<i>bla</i> <sub>CMY-G2</sub>	0/21
CITRS	5'TTGCAGCTTTTCAAGAATGCGC3'	0,4	<i>bla</i> <sub>CMY-G2</sub>	1142/1120

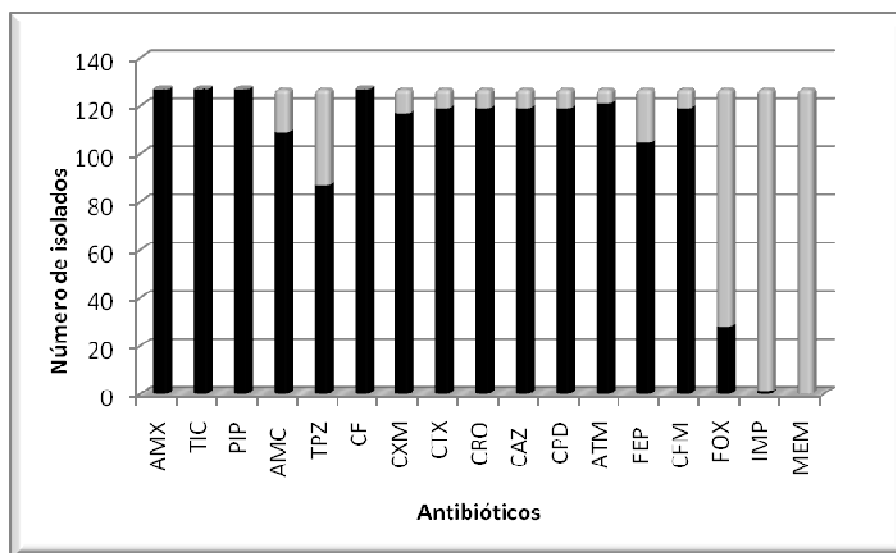
<sup>a</sup> Na sequenciação de *bla*<sub>GES</sub> utilizaram-se os *primers* definidos na *Tabela 10*.

### III. Resultados

#### 1. Caracterização fenotípica dos isolados

A caracterização fenotípica de 126 isolados, obtida através da realização do TSA, permitiu avaliar a susceptibilidade aos antibióticos de diferentes classes e, em particular, aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

Como todos os 126 isolados apresentavam resistência à amoxicilina e, conseqüentemente, apresentavam também susceptibilidade diminuída ou intermédia à ticarcilina e piperacilina (*Figura 10*) eram, presumivelmente, produtores de  $\beta$ -lactamases. A susceptibilidade diminuída às cefalosporinas ocorreu em 126, 105 e 117 isolados para a cefalotina, cefepima e cefuroxima, respectivamente. Um total de 119 isolados apresentaram susceptibilidade diminuída às cefalosporinas de terceira geração, nomeadamente em relação à cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e cefpodoxima, bem como à cefixima. Em relação ao aztreonam, representante do grupo dos monobactâmicos, 121 isolados tinham susceptibilidade diminuída. A totalidade dos isolados estudados foram predominantemente susceptíveis à cefoxitina e meropenem, tendo um único isolado apresentado susceptibilidade diminuída ao imipenem. Apenas 18 dos 126 isolados revelaram ser susceptíveis à combinação amoxicilina/ácido clavulânico e 40 à combinação piperacilina/tazobactam (*Figura 10*).



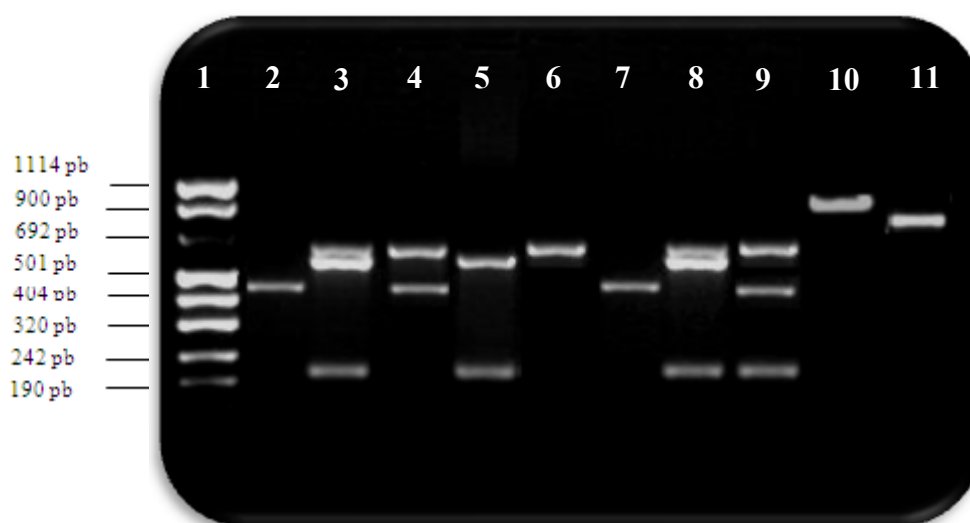
**Figura 10.** Susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de 126 isolados. Abreviaturas de antibióticos ver *Tabela 8*.

No *Anexo i* apresentam-se os fenótipos mais representativos dos isolados produtores de  $\beta$ -lactamases (*Figuras a-h*).

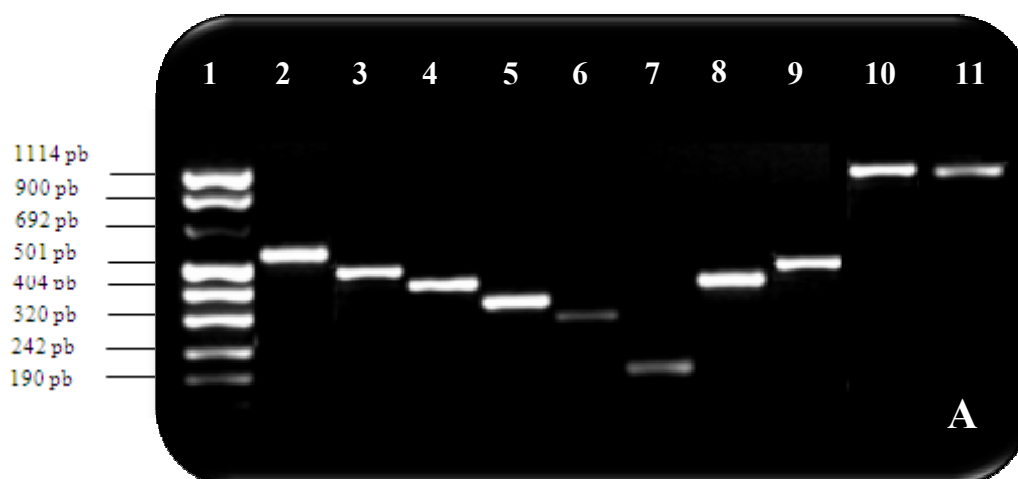
## 2. Caracterização genotípica dos isolados

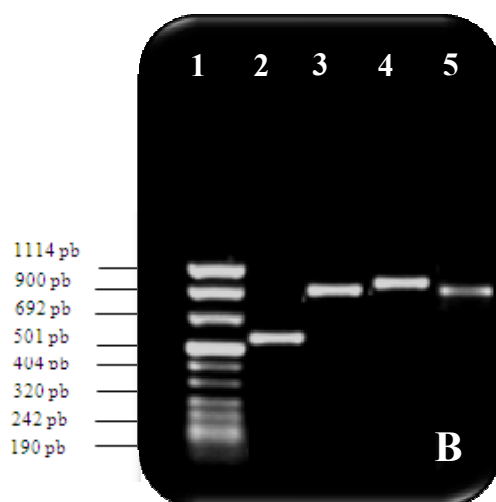
A leitura interpretativa do antibiograma de 126 isolados em estudo, permitiu dirigir o estudo genotípico para famílias específicas de genes *bla* e definir os exemplares para os quais era necessária a caracterização bioquímica, como indica a *Figura 7*.

A pesquisa dos genes *bla* permitiu detectar 81 genes *bla*<sub>TEM</sub>, 35 *bla*<sub>SHV</sub>, 71 *bla*<sub>OXA</sub>, 99 *bla*<sub>CTX-M</sub>, um *bla*<sub>GES</sub> e dois genes *ampC* (*Figuras 11 e 12*), muitas vezes co-existindo num mesmo isolado. Identificaram-se treze perfis genotípicos distintos, como demonstra a *Tabela 12*.



**Figura 11.** Fragmentos de amplificação dos genes *bla*<sub>TEM</sub> (716pb), *bla*<sub>SHV</sub> (471pb), *bla*<sub>OXA</sub> (199pb) e *ampC* (643pb) (controlo interno de *E. coli*). 1- Marcador de peso molecular (*Roche*); 2- Controlo positivo 1 (*bla*<sub>SHV</sub>); 3- Controlo positivo 2 (*bla*<sub>TEM</sub>+ *ampC*+ *bla*<sub>OXA</sub>). Fragmentos de amplificação das amostras em estudo: 4- *bla*<sub>TEM</sub>+ *bla*<sub>SHV</sub>; 5- *ampC* + *bla*<sub>OXA</sub>; 6- *bla*<sub>TEM</sub>; 7- *bla*<sub>SHV</sub>; 8- *bla*<sub>TEM</sub> + *ampC* + *bla*<sub>OXA</sub>; 9- *bla*<sub>TEM</sub> + *bla*<sub>SHV</sub> + *bla*<sub>OXA</sub>. Fragmentos de amplificação para sequenciação: 10- gene *bla*<sub>TEM</sub> (1091pb); 11- gene *bla*<sub>SHV</sub> (911pb).





**Figura 12. A.** Fragmentos de amplificação dos genes *ampC* plasmídicos. 1- Marcador de peso molecular (*Roche*). Controlos positivos: 2- Estirpe produtora de MOX; 3- Estirpe produtora de CIT; 4- Estirpe produtora de DHA; 5- Estirpe produtora de ACC; 6- Estirpe produtora de EBC; 7- Estirpe produtora de FOX. Fragmentos de amplificação de amostras em estudo: 8- *bla*<sub>DHA</sub> (405pb); 9- *bla*<sub>CMY</sub> (462pb). Fragmentos de amplificação de amostras em estudo para sequenciação: 10- *bla*<sub>DHA</sub> (1141pb); *bla*<sub>CMY</sub> (1142pb). **B.** 1- Marcador de peso molecular (*Roche*). Fragmentos de amplificação do gene *bla*<sub>CTX-M</sub>: 2- *screening* (522pb). Fragmentos de amplificação de amostras em estudo para sequenciação: 3- *bla*<sub>CTX-MG9</sub> (935pb) 4- *bla*<sub>CTX-MG1</sub> (953pb); 5- Fragmentos de amplificação do gene *bla*<sub>GES</sub> (891pb).

A *Tabela 12* evidencia cinco perfis genotípicos predominantes, dos quais, o perfil *bla*<sub>TEM</sub> + *bla*<sub>CTX-M</sub> + *bla*<sub>OXA</sub> foi o mais comum (n=41 isolados); os restantes perfis foram detectados num menor número de isolados. São de realçar ainda os perfis *bla*<sub>TEM</sub> + *bla*<sub>SHV</sub> + *bla*<sub>CTX-M</sub> + *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> + *bla*<sub>OXA</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> + *bla*<sub>CTX-M</sub>, que foram detectados em 15, 14 e 13 isolados, respectivamente.

Identificaram-se ainda dois conjuntos de isolados com perfis genotípicos que incluíram apenas um gene *bla*, nomeadamente *bla*<sub>SHV</sub> (n=10) e *bla*<sub>CTX-M</sub> (n=10). Foi ainda detectado um gene *bla*<sub>GES</sub> e dois genes que codificam β-lactamases AmpC plasmídicas. Por fim, verificou-se a existência de um grupo de oito isolados para o qual não foi detectada qualquer β-lactamase, o qual será investigado oportunamente (*Capítulo III, 3.2.2*).



**Tabela 12.** Genótipo de 126 isolados obtido por PCR.

Genótipo <sup>a</sup>	Nº isolados (n=126)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	3
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	5
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>GES</sub>	1
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	10
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	10
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> + <i>bla</i> <sub>OXA</sub>	14
<i>bla</i> <sub>SHV</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	2
<i>bla</i> <sub>SHV</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> + <i>bla</i> <sub>DHA</sub>	1
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	13
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> + <i>bla</i> <sub>OXA</sub>	41
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> + <i>bla</i> <sub>OXA</sub> + <i>bla</i> <sub>CMY</sub>	1
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> + <i>bla</i> <sub>OXA</sub>	15
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV</sub> + <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	2
ND	8

<sup>a</sup> Detectado por PCR; ND, ausência de detecção de genes *bla* (corresponde aos genótipos descritos no Capítulo III 3.2.2)

### 3. Identificação dos mecanismos de resistência responsáveis pela expressão fenotípica dos isolados

De acordo com os critérios descritos no Capítulo II, efectuou-se a identificação, por sequenciação, dos genes considerados responsáveis pela expressão fenotípica. Assim, sequenciaram-se 12 genes *bla*<sub>TEM</sub>, 14 *bla*<sub>SHV</sub>, 99 *bla*<sub>CTX-M</sub>, um gene *bla*<sub>GES</sub> e dois genes *ampC*, nomeadamente, um gene *bla*<sub>CMY-2</sub> e um gene *bla*<sub>DHA-1</sub> (Tabela 12).

#### 3.1. β-Lactamases de Classe A

Da família *bla*<sub>TEM</sub> foram identificados os genes *bla*<sub>TEM-1</sub> (n=7), *bla*<sub>TEM-10</sub> (n=1), *bla*<sub>TEM-24</sub> (n=3) e *bla*<sub>TEM-52</sub> (n=1). À excepção da penicilinase TEM-1 todas as enzimas TEM identificadas codificavam ESBLs.

Entre os genes da família *bla*<sub>SHV</sub>, identificaram-se os genes *bla*<sub>SHV-12</sub>, relevantes por codificarem enzimas ESBL (n=5). Adicionalmente, foram ainda identificados genes que codificavam a penicilinase SHV-28 (n=2) e genes que codificavam a enzima parental SHV-1 (n=7).

Foram detectados 99 genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, pertencendo 86 ao grupo 1 e os restantes treze ao grupo 9. A principal enzima identificada pertencente ao grupo 1 foi a enzima CTX-M-15 (n=81), seguida de CTX-M-1 (n=3) e CTX-M-32 (n=2).

---

Adicionalmente, foram identificados treze genes do grupo 9, predominantemente doze *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (n=12) e *bla*<sub>CTX-M-9</sub> (n=1). Foi ainda detectado um gene *bla*<sub>GES-1</sub>, representativo da família GES.

É de realçar a identificação de genes que codificam enzimas da família CTX-M, na maioria dos perfis fenotípicos (*Tabela 13*), nomeadamente da enzima CTX-M-15, o que será reflexo da sua predominância nos diversos hospitais estudados. Verificou-se ainda que alguns dos genes que não codificam ESBL, codificam penicilinases, tais como as enzimas parentais SHV-1, TEM-1 e ainda SHV-28.

Na *Tabela 13* podem observar-se 81 isolados de *E. coli* com sete perfis diferentes de susceptibilidade aos antibióticos β-lactâmicos. O fenótipo mais representativo destes isolados (n=61) apresentava susceptibilidade diminuída a todos os antibióticos β-lactâmicos, excepto aos carbapenemes e à cefoxitina, sendo semelhante ao perfil predominante de *K. pneumoniae* (n=16). Em ambos os casos, este perfil foi encontrado em isolados provenientes de hospitais de várias regiões do país. Alguns dos isolados com este perfil de resistência eram produtores de ESBL da família CTX-M, nomeadamente CTX-M-1, CTX-M-14 e CTX-M-15, mas também β-lactamases como TEM-1, SHV-1 e OXA-tipo. O segundo fenótipo mais encontrado em *K. pneumoniae* caracteriza-se pela resistência às penicilinas, cefalotina, ceftazidima, combinação amoxicilina/ácido clavulânico e piperacilina/tazobactam (n=7), estando associado apenas à β-lactamase SHV-1 e, maioritariamente, ao hospital G (n=6).

**Tabela 13.** Perfil de resistência aos antibióticos β-lactâmicos e caracterização genotípica de 126 isolados recolhidos, entre 2004 e 2008, em instituições hospitalares de Portugal.

Perfil de resistência aos antibióticos β-lactâmicos	Genótipo por PCR					β-lactamases <sup>d</sup>	Código Hospital	Número de isolados <sup>e</sup>
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> <sup>a</sup>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> <sup>b</sup>	<i>bla</i> <sub>OXA</sub> <sup>c</sup>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>bla</i> <sub>GES</sub>			
<b><i>E. coli</i></b>								
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CTX, FEP, CPD, CAZ, ATM, CXM, CFM, TPZ, CRO	+	-	+	+	-	TEM-1, CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-15	A,B,F, G,J,H,L	61
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CTX, FEP, CPD, ATM, CXM, CFM, FOX, CRO	+	-	-	+	-	SHV-1, CTX-M-14	C, G	7
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CTX, CPD, FEP, CAZ, ATM, CXM, CFM, TPZ, FOX, CRO	+	-	+	+	-	TEM-1, CTX-M-15, CMY-2	A,F,D,G	5
AMX, TIC, PIP, CF, CPD, CAZ, ATM, CXM, CFM, CRO	+	+	-	-	-	SHV-12	H,I	2
AMX, TIC, PIP, CF, CTX, CPD, CAZ, ATM, CXM, CFM, TPZ, CRO	+	-	-	-	+	GES-1	G	1
AMX, TIC, PIP, CF, CTX, CPD, FEP, ATM, CXM, CFM, CRO	-	-	-	+	-	CTX-M-9, CTX-M-14	G	3
AMX, TIC, PIP, CF, CTX, CPD, FEP, CAZ, ATM, CXM, CFM, CRO	+	+	+	+	+	CTX-M-1, CTX-M-14	D,G	2
<b><i>K. pneumoniae</i></b>								
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CAZ, TPZ	-	+	-	-	-	SHV-1	G,J	7
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CAZ, ATM, CXM, CFM, TPZ, CRO	-	+	-	-	-	SHV-12	G	1

Tabela 13. (continuação)

Perfil de resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos	Genótipo por PCR					$\beta$ -lactamases <sup>d</sup>	Código Hospital	Número de isolados <sup>e</sup>
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> <sup>a</sup>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> <sup>b</sup>	<i>bla</i> <sub>OXA</sub> <sup>c</sup>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>bla</i> <sub>GES</sub>			
<b><i>K. pneumoniae</i> (continuação)</b>								
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CPD, CAZ, TPZ	-	+	-	-	-	SHV-1	G	1
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CAZ, ATM, CXM, TPZ, CRO	-	+	-	-	-	SHV-1	G	1
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CTX, CAZ, ATM, CXM, TPZ, CRO	+	+	-	-	-	TEM-52	J	1
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CTX, CPD, CAZ, ATM, CXM, CFM, CRO	+	+	-	-	-	TEM-10, SHV-28	B	1
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CTX, CPD, FEP, CAZ, ATM, CXM, CFM, CRO	+	+	+	+	-	CTX-M-15	F	2
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CTX, CPD, FEP, CAZ, ATM, CXM, CFM, FOX, CRO	+	+	-	-	-	SHV-28	C	1
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CTX, CPD, FEP, CAZ, ATM, CXM, CFM, TPZ, CRO	+	+	+	+	-	TEM-1, TEM-24, CTX-M-1, CTX-M-15	C,D,F,G	16
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CTX, CPD, FEP, CAZ, ATM, CXM, CFM, TPZ, FOX, CRO	+	+	+	+	-	CTX-M-15	D	1
<b><i>P. aeruginosa</i></b>								
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CTX, CPD, CAZ, ATM, CXM, CFM, TPZ, FOX, CRO	-	-	-	-	-	AmpC cr.	C	1

Tabela 13. (continuação)

Perfil de resistência aos antibióticos β-lactâmicos	Genótipo por PCR					β-lactamases <sup>d</sup>	Código Hospital	Número de isolados <sup>e</sup>
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> <sup>a</sup>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub> <sup>b</sup>	<i>bla</i> <sub>OXA</sub> <sup>c</sup>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>bla</i> <sub>GES</sub>			
<i>C. freundii</i>								
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CTX, CPD, CAZ, ATM, CXM, CFM, FOX, CRO	+	+	-	-	-	SHV-12, AmpC cr.	G	1
<i>Enterobacter spp</i>								
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CTX, CPD, CAZ, ATM, CXM, CFM, TPZ, FOX, CRO	+	-	-	-	-	TEM-24, AmpC cr.	G, M	5
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CTX, CPD, IMP, CAZ, ATM, CXM, CFM, TPZ, FOX, CRO	-	-	-	-	-	AmpC cr.	G	1
AMX, TIC, PIP, CF, AMC, CTX, CPD, FEP, CAZ, ATM, CXM, CFM, TPZ, FOX, CRO	+	+	+	+	-	SHV-12, CTX-M-14, CTX-M-15, AmpC cr., DHA-1	D, G	5

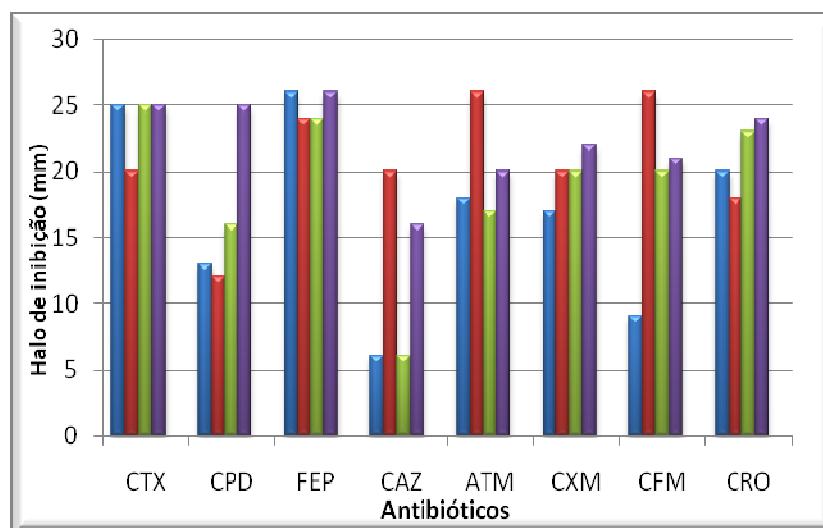
<sup>a</sup> Codifica enzima TEM-tipo; <sup>b</sup> Codifica enzima SHV-tipo; <sup>c</sup> Codifica enzima OXA-tipo; <sup>d</sup> Identificação efectuada após sequenciação nucleotídica; <sup>e</sup> Referente a uma ou mais das enzimas referidas em <sup>d</sup>; AmpC cr., β-lactamase AmpC cromossómica. Abreviaturas de antibióticos ver *Tabela 8*.

### 3.1.1. Relação fenótipo vs tipo de ESBL

Os isolados produtores de ESBLs das famílias TEM, SHV e CTX-M foram os mais representativos entre as amostras estudadas (*Tabela 12*). O fenótipo apresentado por isolados que produzem  $\beta$ -lactamases ESBL era em geral semelhante entre si, porém, a distinção pôde ser efectuada, por vezes, pelo nível de resistência à cefotaxima, considerando que as enzimas CTX-M, ao contrário das ESBL, TEM ou SHV, hidrolisam sempre este antibiótico. As  $\beta$ -lactamases GES, por sua vez, caracterizam-se por conferirem susceptibilidade à cefotaxima e resistência à ceftazidima, facto que permite sugerir a sua presença e expressão.

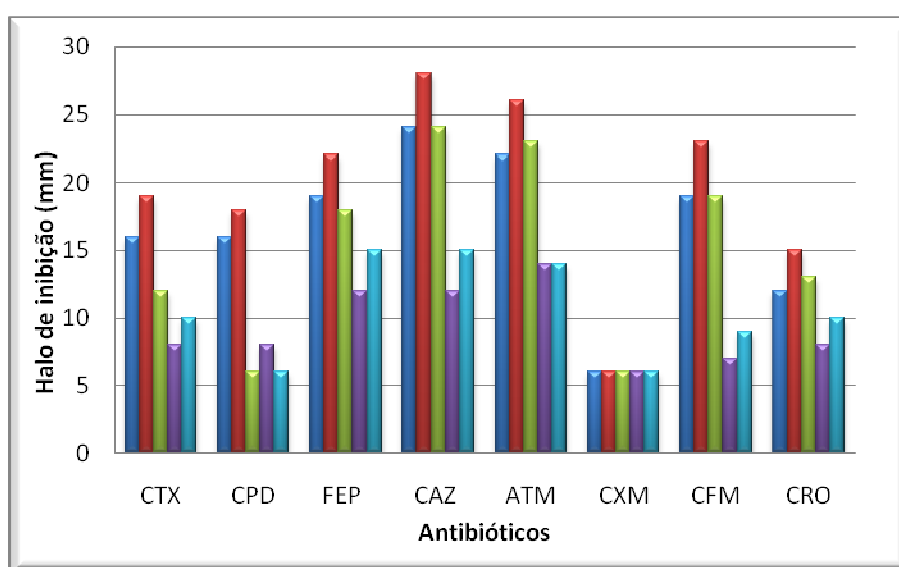
No sentido de avaliar a contribuição presuntiva das  $\beta$ -lactamases ESBL das famílias TEM e SHV no fenótipo de isolados que expressam estas enzimas, foi realizada uma análise dos níveis de resistência a vários antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (*Figura 13*).

As variações observadas na resistência aos diferentes antibióticos permitem afirmar que, de uma forma geral, a cefotaxima e a cefepima surgem como os antibióticos aos quais os isolados produtores de ESBL se revelaram mais susceptíveis. Ao contrário, estes isolados são na sua grande maioria resistentes à ceftazidima e ao aztreonam, à excepção da estirpe produtora de TEM-52 que apresenta susceptibilidade intermédia a ambos. Por outro lado, esta enzima parece estar na origem de um maior nível de resistência à cefotaxima e cefpodoxima.



**Figura 13.** Nível de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de isolados que produzem  $\beta$ -lactamases ESBL das famílias TEM, SHV ou ambas. A azul está representada a estirpe que produz TEM-24, a vermelho TEM-52, a verde TEM-10 com SHV-28 e a púrpura SHV-12. Abreviaturas de antibióticos ver *Tabela 8*.

Também no caso das  $\beta$ -lactamases da família CTX-M foi efectuada a análise da sua contribuição para os níveis de resistência dos isolados (*Figura 14*). De realçar o facto dos isolados que produzem CTX-M-15 e CTX-M-32 apresentarem níveis de resistência idênticos, sendo que os primeiros exibiram maior resistência a todos os antibióticos aqui apresentados. Entre os isolados que produzem enzimas do grupo 1 foram os portadores de CTX-M-1 que apresentaram menores níveis de resistência. Por outro lado, verificou-se uma tendência para níveis de resistência menores nos isolados que produzem enzimas do grupo 9, quando comparadas com os isolados que produzem CTX-M do grupo 1.



**Figura 14.** Níveis de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de isolados que produzem enzimas da família CTX-M. A azul está representada a  $\beta$ -lactamase CTX-M-1, a vermelho CTX-M-9, a verde CTX-M-14, a púrpura CTX-M-15 e a turquesa CTX-M-32. Abreviaturas de antibióticos ver *Tabela 8*.

### 3.1.2. Análise de mutações pontuais nos genes que codificam $\beta$ -lactamases de Classe A

As mutações pontuais presentes nas sequências nucleotídicas dos genes sequenciados, bem como as respectivas alterações aminoacídicas daí resultantes, estão discriminadas nas *Tabelas 14, 15, 16 e 17*. A comparação entre as sequências dos genes *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>SHV-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub> e *bla*<sub>GES-1</sub> parentais (que codificam as enzimas TEM-1, SHV-1, CTX-M-1, CTX-M-9 e GES-1, respectivamente) e as sequências dos genes identificados neste estudo, bem como das respectivas enzimas que codificavam, permitiram determinar as enzimas de classe A responsáveis pelos diferentes fenótipos, após análise do registo de todas as  $\beta$ -lactamases identificadas até à data (<http://www.lahey.org/studies>).

Na *Tabela 16* encontram-se as mutações dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub> do grupo 1 (e correspondentes alterações aminoacídicas), observadas especificamente nos genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> e *bla*<sub>CTX-M-32</sub>, utilizando-se o gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> como gene parental, o qual também foi detectado neste estudo. Na *Tabela 17* estabelece-se a comparação entre o gene *bla*<sub>CTX-M-14</sub> e o gene *bla*<sub>CTX-M-9</sub> do grupo 9. Na determinação das mutações pontuais dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, e alterações aminoacídicas a que dão origem, utilizou-se para comparação a primeira enzima identificada a nível mundial para cada grupo, o que não acontece nas famílias TEM e SHV. As enzimas que aqueles genes *bla*<sub>CTX-M</sub> codificam pertencem a diferentes grupos e, portanto, apresentam um número elevado de diferenças nucleotídicas entre si.

A enzima TEM-10 apresentou duas substituições aminoacídicas em relação à enzima parental TEM-1, Arg164Ser e Glu240Lys, as quais também estão presentes na enzima TEM-24. A enzima TEM-24 apresentou adicionalmente as substituições aminoacídicas Gln39Lys, Glu104Lys e Ala237Thr. A  $\beta$ -lactamase TEM-52, por sua vez, possui, como TEM-24, a substituição Glu104Lys e duas substituições adicionais Gly182Thr e Gly238Ser (*Tabela 14*).

**Tabela 14.** Mutações nucleotídicas do gene *bla*<sub>TEM</sub> e substituições aminoacídicas das enzimas que codificam.

Enzima	Posição do nucleótido (aminoácido)							N°
	317(39)	511(104)	691(164)	746(182)	910(237)	913(238)	917(240)	
<b>TEM-1</b>	G(Gln)	G(Glu)	C(Arg)	G(Gly)	G(Ala)	G(Gly)	A(Glu)	7
<b>TEM-10</b>	-	-	A(Ser)	-	-	-	G(Lys)	1
<b>TEM-24</b>	A(Lys)	A(Lys)	A(Ser)	-	A(Thr)	-	G(Lys)	3
<b>TEM-52</b>	-	A(Lys)	-	C(Thr)	-	A(Ser)	-	1

A, Adenina; G, Guanina; C, Citosina; Ala, Alanina; Arg, Arginina; Lys, Lisina; Gln, Glutamina; Gly, Glicina; Glu, Glutamato, Ser, Serina, Thr, Treonina.

Entre as enzimas da família SHV, a penicilinase SHV-28 possui uma única mutação pontual, que resulta na troca de tirosina por fenilalanina na posição aminoacídica 8, enquanto que a ESBL SHV-12 apresenta três substituições aminoacídicas, que se localizam nas posições 35, 238 e 240, nomeadamente Leu35Gln, Gly238Ser e Glu240Lys (*Tabela 15*). Estas duas  $\beta$ -lactamases não possuem substituições em comum.



**Tabela 15.** Mutações nucleotídicas do gene *bla<sub>SHV</sub>* e substituições aminoacídicas das enzimas que codificam.

Enzima	Posição do nucleótido (aminoácido)				N°
	8(7)	92(35)	700(238)	703(240)	
<b>SHV-1</b>	A(Tyr)	T(Leu)	G(Gly)	G(Glu)	7
<b>SHV-12</b>	-	A(Gln)	A(Ser)	A(Lys)	5
<b>SHV-28</b>	T(Phe)	-	-	-	2

A, Adenina; G, Guanina; T, Timina; Gln, Glutamina; Gly, Glicina, Glu, Glutamato; Leu, Leucina; Lys, Lisina; Phe, Fenilalanina; Ser, Serina; Tyr, Tirosina.

A *Tabela 16* mostra que as enzimas CTX-M-15 e CTX-M-32 apresentam a mesma substituição aminoacídica, Asp240Gly, apesar da enzima CTX-M-15 diferir de CTX-M-32 em quatro alterações aminoacídicas adicionais. CTX-M-32, por sua vez, difere da  $\beta$ -lactamase CTX-M-1 apenas naquela substituição aminoacídica.

**Tabela 16.** Mutações nucleotídicas do gene *bla<sub>CTX-M</sub>* e substituições aminoacídicas das enzimas do grupo 1 que codificam.

Enzima	Posição do nucleótido (aminoácido)					N°
	239 (77)	349 (114)	429 (140)	725 (240)	871 (288)	
<b>CTX-M-1</b>	T (Val)	G (Asp)	T (Ser)	A (Asp)	A (Asn)	3
<b>CTX-M-15</b>	C (Ala)	A (Asn)	G (Ala)	G (Gly)	G (Asp)	81
<b>CTX-M-32</b>	-	-	-	G (Gly)	-	2

A, Adenina; C, Citosina; G, guanina; T, Timina; Ala, Alanina; Asp, Aspartato; Asn, Asparagina; Gly, Glicina; Ser, Serina; Val, Valina.

Neste trabalho foram também detectadas duas enzimas CTX-M do grupo 9, nomeadamente CTX-M-9 e CTX-M-14, as quais se diferenciam apenas por uma única alteração aminoacídica (Ala231Val) (*Tabela 17*).

**Tabela 17.** Mutações nucleotídicas do gene *bla*<sub>CTX-M</sub> e substituições aminoacídicas das enzimas do grupo 9 que codificam.

Enzima	Posição do nucleótido (aminoácido)		N°
	697(231)		
CTX-M-9	A (Ala)		1
CTX-M-14	G (Val)		12

A, Adenina; G, Guanina; Ala, Alanina; Val, Valina.

### 3.1.3. Análise de mutações silenciosas no suporte genético dos genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>

Foi efectuada uma análise do suporte genético dos genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>, no sentido de identificar as mutações silenciosas aí presentes e, assim, proceder à análise da evolução destes genes. A *Tabela 18* mostra as mutações silenciosas na região codificante e promotora dos doze genes *bla*<sub>TEM</sub> encontrados neste estudo, o que permitiu a identificação dos seus suportes genéticos ou *frameworks*. Identificaram-se quatro genes com *framework* de *bla*<sub>TEM-1A</sub>, um dos quais com promotor *PaPb* e dois com promotor *P3*; um outro gene exibiu *framework* de *bla*<sub>TEM-1A</sub> e apresentou um novo promotor *PaPb* com uma substituição T→A na posição nucleotídica 147 (T147A). A análise revelou a existência de cinco genes com *framework* *bla*<sub>TEM-1B</sub> e promotor *PaPb*; identificaram-se ainda três genes com *framework* idêntico a *bla*<sub>TEM-2</sub>, um com promotor *PaPb* e outro com o novo promotor anteriormente referido para o qual se sugere a designação *P6*, de acordo com a nomenclatura em vigor.

**Tabela 18.** Mutações silenciosas na região promotora e codificante de 12 variantes dos genes *bla*<sub>TEM</sub> estudados.

Variantes		Gene <i>bla</i> <sub>TEM</sub>													
Região promotora	Região Codif.	Região promotora				Região codificante									N°
		32	147	162	175	226	317 (Gln)	346	436	604	682	913	925		
P3	<i>bla</i> <sub>TEM-1A</sub>	C	T	G	A	C	C	A	C	G	T	C	G	2	
PaPb	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub>	T	T	G	A	T	C	A	T	T	T	C	G	5	
PaPb	<i>bla</i> <sub>TEM-10A</sub>	T	T	G	A	C	C	A	C	G	T	C	G	1	
PaPb	<i>bla</i> <sub>TEM-24</sub>	T	T	G	A	C	A (Lys)	A	C	G	T	C	G	1	
PaPb+T147A	<i>bla</i> <sub>TEM-24</sub>	T	A	G	A	C	A (Lys)	A	C	G	T	C	G	2	
PaPb+T147A	<i>bla</i> <sub>TEM-52A</sub>	T	A	G	A	C	C	A	C	G	T	C	G	1	

A, Adenina; C, Citosina; G, Guanina; T, Timina.

Na *Tabela 19* podem observar-se as mutações silenciosas presentes em quinze genes  $bla_{SHV}$ , identificadas a partir da análise comparativa com a variante  $bla_{SHV-1-1v1}$ , as quais permitiram identificar a variante respectiva e o gene parental a partir do qual terão evoluído. Adicionalmente, foi determinada a variante do gene  $bla_{SHV-99}$ , que codifica a nova enzima SHV-99, recentemente descrita (Ramdani-Bougoussa *et al.*, 2007), para a qual foi efectuada a caracterização bioquímica, no decorrer deste trabalho (*Capítulo III, 6.*).

**Tabela 19.** Mutações silenciosas na região codificante de 15 variantes dos genes  $bla_{SHV}$  estudados.

Variante	Gene $bla_{SHV}$							Nº
	Região codificante							
	92 (Leu)	324	402	633	705	762	786	
$bla_{SHV-1-1v1}$	T(Leu)	C	A	G	G	T	C	7
$bla_{SHV-12-11v2}$	A(Gln)	C	G	G	G	T	G	5
$bla_{SHV-28-1v18}$	T(Leu)	T	G	A	A	C	C	2
$bla_{SHV-99-1v18}$	T(Leu)	T	G	A	A	C	C	1

A, Adenina; C, Citosina; G, guanina; T, Timina; \*sequência obtida no âmbito de trabalho prévio (Ramdani-Bougoussa *et al.*, 2007).

Os genes  $bla_{SHV-1}$  (n=7) apresentaram as substituições nucleotídicas da variante 1 e os genes  $bla_{SHV-12}$  (n=5) o suporte genético da variante 2; os genes  $bla_{SHV-28}$  (n=2) e  $bla_{SHV-99}$  (n=1) apresentaram as mutações silenciosas da variante 18. Os genes que codificam penicilinas possuem o gene  $bla_{SHV-1}$  como gene parental e o gene que codifica a ESBL SHV-12 tem como parental o gene  $bla_{SHV-11}$ .

#### 3.1.4. Distribuição dos isolados produtores de TEM, SHV, CTX-M e GES por serviço hospitalar

Considerando a importância das  $\beta$ -lactamases das famílias TEM, SHV, CTX-M e GES (como se demonstrou no *Capítulo I*), analisou-se a distribuição destas enzimas nos hospitais e serviços hospitalares que estão representados no presente estudo.

A *Tabela 20* evidencia os serviços de medicina e urgências como sendo aqueles em que mais frequentemente foram isoladas  $\beta$ -lactamases destas famílias, embora os isolados produtores de  $\beta$ -lactamases CTX-M-15, sendo predominantes, se distribuissem por praticamente todos os serviços que ali se representam e, sobretudo, no hospital G por este ter a maior representatividade na amostra estudada. Realça-se que todos os isolados produtores de SHV-1 e CTX-M-1 foram provenientes do hospital G. Curiosamente, verificou-se ainda

que dois isolados produtores de CTX-M-1, identificados como *E. coli* e *K. pneumoniae*, foram recolhidos do mesmo paciente, num intervalo de um mês no serviço de nefrologia (dados não apresentados).

**Tabela 20.** Distribuição de isolados produtores de  $\beta$ -lactamases das famílias TEM, SHV, CTX-M e GES por diferentes serviços hospitalares e regiões.

Serviço	$\beta$ -Lactamases												
	SHV-1	SHV-12	SHV-28	TEM-1	TEM-10	TEM-24	TEM-52	CTX-M-1	CTX-M-9	CTX-M-14	CTX-M-15	CTX-M-32	GES-1
Cardiologia						Ψ							
Cirurgia	X										¥		
Consulta Externa										X, ♣	#, £, ∞		
Gastro.	X			X							X		
Infeciologia		X		X							X	X	
Medicina			#	#, Ω		Ψ	Ω		X	X, #	X, £, Ω	Ω	
											Δ, ♣, ¥, β, †, Ψ,		
Nefrologia		@						X			X, #, @		X
Neurocirurgia											X, Δ		
Neurologia											X		
Obstetrícia	X									X	X, ¥		
Oncologia				X							X		
Pneumologia										X	X		
ORL											#, ♣		
SO				X						#	X, £, ¥		
UCI	X					X					X		
Urgência	X		Δ		Δ			X			#, ¥		
Urologia		♣						X			♣		

Hospital A - £ (n=9); Hospital B - Δ (n=3); Hospital C - # (n=19); Hospital D - ♣ (n=8); Hospital E - † (n=1); Hospital F - ¥ (n=14); Hospital G - X (n=53); Hospital H - @ (n=2); Hospital I - ∞ (n=1); Hospital J - Ω (n=11); Hospital L - β (n=1); Hospital M - Ψ (n=4); Gastro., Gastroenterologia; ORL, otorrinolaringologia; SO, Serviço observação; UCI, Unidade de cuidados intensivos. Região Norte: C, J, M; Região Centro: B, I; Região de Lisboa e Vale do Tejo: D, E, F, G, H, L; Região do Algarve: A.

Noutros hospitais (para além do hospital G) identificaram-se igualmente várias enzimas como SHV-12, CTX-M-14 e CTX-M-15 no hospital D; também aqui se identificou CTX-M-15 em isolados provenientes de diferentes serviços (apesar de este hospital estar representado por apenas oito isolados). O mesmo se verificou no hospital C (n=19), onde foram identificadas  $\beta$ -lactamases SHV-28, TEM-1, CTX-M-14 e CTX-M-15, estando estas duas últimas também presentes em mais do que um serviço.

Já os onze isolados provenientes do hospital J eram produtores de TEM-1, TEM-52, CTX-M-15 e CTX-M-32, todos de doentes dos serviços de medicina daquele hospital. Todos os isolados provenientes dos hospitais A (n=9) e F (n=14) eram produtores de CTX-M-15 e distribuíram-se, respectivamente, por três serviços diferentes. Dois dos quatro isolados provenientes do hospital M eram produtores de TEM-24, distribuindo-se pelos serviços de cardiologia e medicina.

### 3.2. $\beta$ -Lactamases de classe C e carbapenemases

#### 3.2.1. Caracterização fenotípica

Os isolados que apresentaram resistência à cefoxitina e aos carbapenemes foram identificadas como presumíveis produtoras de  $\beta$ -lactamases AmpC e carbapenemases, respectivamente (*Tabela 21*). As  $\beta$ -lactamases AmpC conferem resistência a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, excepto cefalosporinas de quarta geração e carbapenemes, embora seja a resistência à cefoxitina que leva a presumir a sua presença, tal como se verifica neste trabalho (*Anexo i, Figuras g e h*). A indução da expressão das enzimas AmpC pode também produzir um efeito antagonista.

**Tabela 21.** Estirpes avaliadas (n=17) quanto à produção de carbapenemases (classes A, B e D) e cefalosporinas de classe C pelo teste de sinergia com meropenem.

Espécies	Isolados IMP <sup>R</sup> ou MER <sup>R</sup>		Isolados FOX <sup>R</sup>		Código Hospital
	Carbapenemase Classes A, B e D		AmpC		
	Total	Positivos	Total	Positivos	
<i>E. coli</i>	0	0	3	3	A, G
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	1	1	D
<i>Enterobacter spp</i>	1	0	11	11	D, G, M
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	1	1	C
<i>C. freundii</i>	0	0	1	1	G

IMP<sup>R</sup>, Resistência ao imipinem; MER<sup>R</sup>, Resistência ao meropenem; FOX<sup>R</sup>, Resistência à cefoxitina.

---

---

Como a resistência aos carbapenemes, por sua vez, é indicativa da produção de uma carbapenemase, foi realizado o teste de sinergia com meropenem, o qual permitiu detectar a presença destas  $\beta$ -lactamases. A *Tabela 21* mostra o resultado desta pesquisa em 17 isolados, entre os quais o isolado resistente ao imipenem revelou ser negativo para a produção de carbapenemase; no entanto, deu um resultado positivo para AmpC. Por outro lado, os restantes dezasseis isolados que apresentaram resistência à cefoxitina deram um resultado positivo, indicativo da produção de AmpC.

### 3.2.2. Avaliação da expressão de AmpC cromossómica

No sentido de caracterizar as  $\beta$ -lactamases AmpC cromossómicas de algumas bactérias de Gram negativo procedeu-se à avaliação da sua expressão, através da presença ou ausência de proteína funcional no gel de revelação de focagem isoelectrica (presença da banda com o mesmo pI da enzima utilizada como referência).

A *Tabela 22* revela que todos os isolados analisados apresentaram pI entre 8,2 e 9,0, valores que podem ser atribuídos à presença das AmpC cromossómicas ubiquitárias nestas espécies. Adicionalmente, em alguns dos isolados, identificaram-se pIs que foram atribuídos a  $\beta$ -lactamases já detectadas e identificadas.

Os isolados de *P. aeruginosa* e *C. freundii* apresentaram um perfil de susceptibilidade semelhante, excepto a resistência à combinação piperacilina/tazobactam identificada em *P. aeruginosa*; ambos evidenciaram a expressão da  $\beta$ -lactamase AmpC cromossómica ubiquitária (*Tabela 13*). No caso do isolado de *C. freundii* foram ainda detectadas duas  $\beta$ -lactamases: SHV-12 e TEM-tipo. Os isolados de *Enterobacter* spp revelaram maioritariamente dois perfis de resistência, distinguindo-se pela resistência às cefalosporinas de quarta geração (cefepima), a qual está associada à produção de  $\beta$ -lactamases da família CTX-M (n=5). Também no caso de *Enterobacter* spp, a resistência à cefoxitina e às combinações  $\beta$ -lactâmico/inibidor de  $\beta$ -lactamase pode ser atribuída à expressão da cefalosporinase de classe C ubiquitária. Num terceiro perfil de resistência evidenciou-se a resistência ao imipenem, o que sugeria a produção de uma carbapenemase, eventualmente plasmídica, tendo-se no entanto, confirmado ser uma AmpC cromossómica.

**Tabela 22.** Determinação do pI de  $\beta$ -lactamases AmpC cromossômicas (por focagem isoelétrica) de 13 isolados.

Espécie	Enzima	pI	Nº isolados
<i>E. cloacae</i>	TEM-tipo, OXA-tipo, <u>AmpC</u> , CTX-M-15	5,4; 7,4; <u>8,2</u> ; 8,9	1
<i>E. cloacae</i>	<u>AmpC</u> , CTX-M-15	<u>8,2</u> ; 8,9	1
<i>E. cloacae</i>	<u>AmpC</u>	<u>8,2</u>	3
<i>E. aerogenes</i>	TEM-24, <u>AmpC</u>	6,5; <u>8,5</u>	1
<i>E. aerogenes</i> <sup>a</sup>	<u>AmpC</u>	<u>8,5</u>	4
<i>E. agglomerans</i>	SHV-tipo, DHA-1, CTX-M-14, <u>AmpC</u>	7,6; 7,8; 8,1; <u>8,5</u>	1
<i>P. aeruginosa</i>	<u>AmpC</u>	<u>9,0</u>	1
<i>C. freundii</i>	TEM-tipo, SHV-12 <u>AmpC</u>	5,4; 7,6; <u>9,0</u>	1

<sup>a</sup>Estirpe com susceptibilidade diminuída ao imipinem; AmpC, ponto isoelétrico (pI) sublinhado.

### 3.2.3. Caracterização molecular de genes *ampC*

De acordo com os critérios descritos na *Figura 7*, foram detectados dois genes *ampC*, nomeadamente *bla*<sub>DHA-1</sub> (n=1) numa estirpe de *Enterobacter* spp e *bla*<sub>CMY-2</sub> (n=1) em *E. coli*, ambos identificados por sequenciação, como se representa na *Tabela 23*; nos restantes isolados não foram detectados genes *ampC* plasmídicos.

**Tabela 23.** Avaliação da produção de  $\beta$ -lactamases AmpC plasmídicas em 17 isolados.

Organismo	Fox <sup>R</sup>	PCR multiplex Positivos	AmpC <sup>a</sup>	
			DHA-1	CMY-2
<i>E. coli</i>	3	<i>bla</i> <sub>CMY</sub> <sup>b</sup>	0	1
<i>K. pneumoniae</i>	1	0	-	-
<i>Enterobacter</i> spp	11	<i>bla</i> <sub>DHA</sub> <sup>c</sup>	1	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	0	-	-
<i>C. freundii</i>	1	0	-	-

<sup>a</sup>Identificação por sequenciação nucleotídica; <sup>b</sup>Amplificação com os primers CITF/CITR; <sup>c</sup> Amplificação com os primers DHAF/DHAR; FOX<sup>R</sup>, Resistência à cefoxitina.

#### 4. Transferência da resistência plasmídica de genes *bla*

Para avaliar o contributo das diversas famílias de  $\beta$ -lactamases no fenótipo dos isolados estudados e para determinar se a resistência observada seria transferível, ensaiou-se, numa primeira fase, a conjugação com a estirpe receptora J<sub>53</sub>AzNa<sup>R</sup> e, nos casos negativos, efectuou-se electroporação com a estirpe receptora *E. coli* HB<sub>101</sub>  $\Delta ampC$ . Não foram obtidos quaisquer transconjugantes mas, por electroporação, obteve-se a transferência do gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> da estirpe clínica *Kp*INSA<sub>7623</sub> (CTX-M-1) para a receptora, da qual resultou o transformante *Ec*HB<sub>101</sub>(CTX-M-1).

Globalmente, o transformante apresentou um perfil de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos idêntico à estirpe clínica (*Tabela a, Anexo ii*), excepto a susceptibilidade às combinações amoxicilina/ácido clavulânico e piperacilina/tazobactam, aos quais a estirpe clínica se tinha revelado resistente. A estirpe clínica apresentou ainda resistência ao trimetoprim e sulfametoxazol, aos quais o transformante era susceptível.

#### 5. Avaliação da multirresistência

Os 126 isolados não só foram avaliados relativamente à sua susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (como se demonstrou anteriormente), mas foram ainda avaliados quanto à sua susceptibilidade às quinolonas, aminoglicosídeos, inibidores da via do ácido fólico, lipopéptidos, nitrofuranos, fosfomicinas e gliciliclinas, o que permitiu avaliar a sua multirresistência. No *Tabela 24* apresentam-se os 32 perfis de multirresistência de 104 isolados resistentes a três ou mais classes de antibióticos, incluindo a resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Dois dos perfis de multirresistência apresentados são predominantes (com 15 e 23 isolados) em relação aos restantes e ambos incluem resistência aos aminoglicosídeos (kanamicina, gentamicina e amicacina), quinolonas (ácido nalidíxico, norfloxacin, pefloxacin e ciprofloxacina) e inibidores da via do ácido fólico (trimetoprim e sulfametoxazol); o perfil mais representativo (n=23 isolados) inclui adicionalmente a resistência à tigeciclina. Existem também três perfis de multirresistência representados por nove isolados cada, todos com resistência às quinolonas e aos aminoglicosídeos, o que acontece, aliás, na grande maioria dos isolados multirresistentes estudados. Existe ainda uma associação da  $\beta$ -lactamase CTX-M-15, bem como das enzimas TEM e OXA-tipo a vários perfis de multirresistência, sendo a sua ocorrência registada em hospitais de várias regiões de Portugal.



**Tabela 24.** Caracterização de 104 isolados multirresistentes, incluindo resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (dados não apresentados<sup>a</sup>), recolhidos entre 2004 e 2008 em instituições hospitalares de Portugal.

<b>Perfil Multirresistência</b>	<b>ESBL ou AmpC<sup>b</sup></b>	<b>Penicilinas<sup>c</sup></b>	<b>Código Hospital</b>	<b>Nº de isolados</b>
CIP, SXT, TMP	CTX-M-15	TEM-tipo	A	1
CS, TGC	-	SHV-tipo	G	1
KAN, GEN, TGC	CTX-M-15	TEM, SHV-tipo	D	1
NA, KAN, SXT, FT, TMP, TGC	AmpC	-	C	1
NA, NOR, CIP, KAN, GEN, SXT, TMP, TGC	CTX-M-15	TEM, SHV, OXA-tipo	F	2
NA, NOR, KAN, GEN, TGC	SHV-12	-	I	1
NA, NOR, PEF, CIP, GEN	CTX-M-15	OXA-tipo	J	1
NA, NOR, PEF, CIP, GEN, AN, SXT, TMP	CTX-M-15	TEM, OXA-tipo	G	1
NA, NOR, PEF, CIP, GEN, AN, SXT, TMP, TGC	CTX-M-14, CTX-M-15, DHA-1	SHV, OXA-tipo	A, D	2
NA, NOR, PEF, CIP, GEN, SXT, FT, TMP, TGC	TEM-24, AmpC	SHV-tipo	M	1
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, CS	CTX-M-15	TEM, OXA-tipo	G	1
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, GEN	CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-32	TEM, OXA-tipo	F, G	9
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, GEN, AN	CTX-M-15	TEM, OXA-tipo	G	1
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, GEN, AN, SXT, CS, TMP	CTX-M-15	TEM-tipo	G	1
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, GEN, AN, SXT, CS, TMP, TGC	CTX-M-15	TEM, OXA-tipo	D	2
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, GEN, AN, SXT, TMP	CTX-M-15, TEM-24	TEM, OXA-tipo	G, M	4
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, GEN, AN, SXT, TMP, TGC	CTX-M-15	TEM, SHV, OXA-tipo	A, D, F, G	9

Tabela 24. (continuação)

Perfil Multirresistência	ESBL ou AmpC <sup>b</sup>	Penicilinas <sup>c</sup>	Código		Nº de isolados
			Hospital	Hospital	
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, GEN, AN, TGC	CTX-M-15	OXA-tipo	B	B	1
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, GEN, CS, FOS, TGC	CTX-M-15	TEM, OXA-tipo	B	B	1
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, GEN, SXT, TMP	SHV-12, CTX-M-14, CTX-M-15, AmpC	TEM, OXA-tipo	G, C, F, H	G, C, F, H	15
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, GEN, SXT, TMP, TGC	SHV-12, TEM-52, CTX-M-15	TEM, SHV, OXA-tipo	C, D, F, G, L, J	C, D, F, G, L, J	23
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, GEN, TGC	CTX-M-15	TEM, OXA-tipo	A, C, F, J, M	A, C, F, J, M	9
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, GEN, TMP, TGC	CTX-M-15	OXA-tipo	C	C	1
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, SXT, TGC	CTX-M-15	TEM, OXA-tipo	J	J	1
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, SXT, TMP	TEM-24, CTX-M-14, CTX-M-15, CMY-2, AmpC	TEM, OXA-tipo	C, D, G, M	C, D, G, M	4
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, SXT, TMP, TGC	-	TEM, SHV-tipo	C	C	1
NA, NOR, PEF, CIP, KAN, TGC	CTX-M-15	TEM, OXA-tipo	J	J	2
NA, NOR, PEF, CIP, SXT, TMP	CTX-M-9, CTX-M-15	TEM-tipo	E, G	E, G	2
NA, NOR, PEF, CIP, TGC	GES-1, CTX-M-15	TEM-tipo	G	G	2
NOR, KAN, GEN, AN, SXT, CS, TMP, TGC	-	TEM-tipo	J	J	1
SXT, TGC	-	SHV-tipo	G	G	1
TMP, TGC	AmpC	-	G	G	1

<sup>a</sup> Dados sobre resistência aos antibióticos β-lactâmicos apresentados na Tabela 13; <sup>b</sup> Enzimas identificadas após sequenciação nucleotídica; <sup>c</sup> TEM, SHV e OXA-tipo: enzimas identificadas apenas por PCR.; Abreviaturas de antibióticos ver Tabela 8.

## 6. Propriedades bioquímicas de SHV-99

Num trabalho previamente realizado na URRA, no âmbito de uma colaboração com a Argélia, foi identificada a produção das  $\beta$ -lactamases SHV-99 (uma nova enzima), CTX-M-15 e TEM-1 por um isolado *K. pneumoniae*, KpARG220, proveniente de um Hospital daquele país.

Depois de efectuada a clonagem do gene *bla*<sub>SHV-99</sub> e subsequente transformação, foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) de dezassete antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, necessárias para inibir o crescimento da estirpe clínica produtora de SHV-99, do respectivo transformante e da estirpe receptora (*Anexo iii, Tabela a*). De acordo com aquela tabela, a estirpe clínica KpARG220 apresentou resistência ao grupo das penicilinas, bem como às cefalosporinas e ao monobactâmico, sendo inibida pelo ácido clavulânico e tazobactam. Embora o perfil de susceptibilidade aos antibióticos do transformante *EcDH5 $\alpha$*  SHV-99 se tenha mantido (em relação à estirpe clínica) no que se refere à amoxicilina, ticarcilina e piperacilina, revelou-se susceptível às cefalosporinas e monobactâmico, pois não possuía o gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, expressando apenas o gene *bla*<sub>SHV-99</sub>.

Como a nova enzima SHV-99 não tinha sido caracterizada bioquimicamente, e por se revelar de interesse para correlacionar com os resultados obtidos no presente trabalho, considerou-se importante aí integrar o estudo cinético desta  $\beta$ -lactamase, a qual se caracteriza por possuir uma substituição na posição aminoacídica 104.

Assim, a enzima SHV-99 foi extraída e purificada, a partir do transformante *EcDH5 $\alpha$*  (SHV-99), por cromatografia de troca iónica e filtração em gel, para uma melhor caracterização desta  $\beta$ -lactamase (*Anexo iv, Figuras a e b*). A contribuição de cada uma das técnicas utilizadas no processo de purificação, para a pureza final da proteína, foi avaliada num gel de poliacrilamida, o qual foi utilizado também para a determinação aproximada do seu peso molecular, por comparação com um marcador de pesos moleculares. A amostra apresentou uma pureza de cerca de 95% e um peso molecular de aproximadamente 28 kDa. A concentração da proteína purificada, determinada em 8678,12  $\mu\text{g/ml}$  foi, posteriormente utilizada para o cálculo da eficiência catalítica.

A *Tabela 25* apresenta os parâmetros cinéticos da  $\beta$ -lactamase SHV-99, determinados para nove antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e os parâmetros da enzima parental, previamente obtidos (Mendonça *et al.*, 2008), para comparação. Os resultados aí apresentados permitem deduzir a actividade catalítica da  $\beta$ -lactamase SHV-99 ( $k_{\text{cat}}$ , 58 a 778s<sup>-1</sup>) que, para as penicilinas, foi

significativamente mais baixa do que a da enzima SHV-1 ( $k_{cat}$ , 220 a  $1937s^{-1}$ ). Porém, verificou-se um aumento na afinidade de SHV-99 para as penicilinas ( $K_m$ , 5,0 a  $13,0\mu M$ ), em relação a SHV-1 ( $K_m$ , 11,0 a  $24,0\mu M$ ), bem como para as cefalosporinas de terceira geração e monobactâmico, exceptuando a menor afinidade para as cefalosporinas de primeira e segunda gerações ( $K_m$ , 102,0 e  $120,0\mu M$ ) em relação a SHV-1 ( $K_m$ , 40,0 e  $80,0\mu M$ ). Para as cefalosporinas de terceira geração, a nova  $\beta$ -lactamase apresentou valores de afinidade que variaram entre os 136,0 e os  $183,0\mu M$ , enquanto SHV-1 apresentou valores entre 142 a  $257\mu M$ , sendo de realçar que a constante de afinidade de SHV-1 para o aztreonam não foi determinável. À semelhança do que sucede com SHV-1, a nova  $\beta$ -lactamase também não apresentou capacidade de hidrolisar, de forma eficiente, as cefalosporinas de terceira geração ou o monobactâmico.

De uma forma geral, SHV-99 ( $k_{cat}/K_m$ , 0,003 a  $62,3\mu M^{-1}.s^{-1}$ ) exibiu menor eficiência catalítica do que SHV-1 ( $k_{cat}/K_m$ , 3,2 a  $84,2\mu M^{-1}.s^{-1}$ ) para todos os antibióticos, ainda que estes valores sejam comparáveis.

**Tabela 25.** Constantes cinéticas  $K_m$ ,  $k_{cat}$  e  $K_{cat}/K_m$  e respectivos desvios-padrão para as  $\beta$ -lactamases SHV-99 e SHV-1.

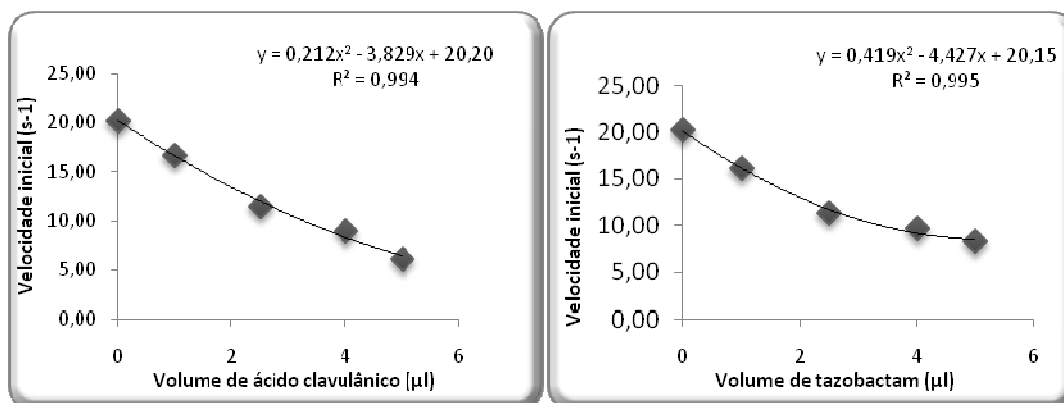
Antibiótico	SHV-1			SHV-99		
	$K_m^a$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}^a$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m^a$ ( $\mu M^{-1}.s^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\mu M^{-1}.s^{-1}$ )
PENG	23,0 $\pm$ 0,4	1937,0 $\pm$ 82,0	84,2 $\pm$ 2,0	12,0 $\pm$ 0,1	778 $\pm$ 61	62,3 $\pm$ 4,4
AMX	31,0 $\pm$ 1,3	1044,0 $\pm$ 10,0	33,3 $\pm$ 1,1	11,0 $\pm$ 0,7	563 $\pm$ 8	49,6 $\pm$ 1,8
TIC	11,0 $\pm$ 3,4	220,0 $\pm$ 49,0	20,4 $\pm$ 1,7	5,0 $\pm$ 1,0	58 $\pm$ 2	13,0 $\pm$ 2,4
PIP	24,0 $\pm$ 0,5	1490,0 $\pm$ 96,0	62,5 $\pm$ 2,7	13,0 $\pm$ 1,4	563 $\pm$ 23	43,5 $\pm$ 6,5
CF	40,0 $\pm$ 1,5	128,0 $\pm$ 33,0	3,2 $\pm$ 0,8	102,0 $\pm$ 11,4	37 $\pm$ 2	0,37 $\pm$ 0,04
CXM	80,0 $\pm$ 0,6	<0,1	ND	120,0 $\pm$ 7,1	<0,1	ND
CTX	257,0 $\pm$ 20,7	<0,1	ND	183,0 $\pm$ 0,7	<0,1	ND
CAZ	142,0 $\pm$ 3,2	<0,1	ND	136,0 $\pm$ 0,9	<0,1	ND
AZT	ND	<0,1	ND	196,0 $\pm$ 0,6	0.500 $\pm$ 0,001	0,003 $\pm$ 0,000

<sup>a</sup> Constantes cinéticas extraídas de Mendonça *et al.*, 2008; ND, não determinável. Abreviaturas de antibióticos ver *Tabela 8*.

A  $IC_{50}$  foi calculada a partir das velocidades iniciais que se obtiveram para a  $\beta$ -lactamase e do volume de inibidor adicionado a cada reacção enzimática, como representado na *Figura 15*.

De acordo com a *Tabela 26*, os valores de  $IC_{50}$  obtidos permitiram verificar que a enzima SHV-99 era mais susceptível à inibição pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam do que a  $\beta$ -lactamase parental. Assim, as  $\beta$ -lactamases SHV-1 e SHV-99 apresentaram,

respectivamente, um  $IC_{50}$  de  $0,17\mu\text{M}$  e  $0,03\mu\text{M}$  para o ácido clavulânico. Em relação ao tazobactam, SHV-1 apresentou um  $IC_{50}$  de  $0,11\mu\text{M}$ , enquanto que SHV-99 necessitou apenas de  $0,02\mu\text{M}$  para que a reacção fosse inibida a 50%.



**Figura 15.** Correlação entre a velocidade inicial da reacção e o volume de ácido clavulânico (à esquerda) e tazobactam (à direita).

**Tabela 26.** Valores de  $IC_{50}$  das  $\beta$ -lactamases SHV-99 e SHV-1 para os inibidores ácido clavulânico e tazobactam.

Inibidor de $\beta$ -lactamase	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	
	SHV-1	SHV-99
Ácido clavulânico	0,17	0,03
Tazobactam	0,11	0,02

#### IV. Discussão

As bactérias de Gram negativo estão frequentemente implicadas em infecções humanas, expressando, muitas vezes, mecanismos de resistência aos antibióticos, pelo que a vigilância da susceptibilidade destes microrganismos às várias classes de antibióticos é da maior relevância. A avaliação da susceptibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos apresenta uma importância particularmente acrescida, já que estes são os agentes antimicrobianos mais utilizados no tratamento de infecções bacterianas em Portugal (Muller *et al.*, 2007), facto que motivou a realização deste trabalho.

Assim, nesse âmbito, mostrou-se que 126 isolados de bactérias de Gram negativo resistentes à amoxicilina eram resistentes a outras penicilinas, sendo a sua grande maioria, resistente às cefalosporinas e monobactâmico, o que é consistente com o facto destes isolados serem, à partida, produtores de ESBL. Os resultados obtidos permitiram constatar, no entanto, que a susceptibilidade aos carbapenemes, consequência da ausência de carbapenemases, foi predominante. Embora já tenha sido descrita em Portugal a ocorrência de isolados produtores de carbapenemases, neste estudo, estas  $\beta$ -lactamases não foram detectadas, sendo, no entanto, prevalentes em alguns países Europeus como a Grécia e emergentes noutros países (Cardoso *et al.*, 2002; Henrichfreise *et al.*, 2005; Maltezou *et al.*, 2009; Peleg *et al.*, 2005; Tortola *et al.*, 2005; Tysall *et al.*, 2002). Assim, a vigilância da susceptibilidade aos carbapenemes é, actualmente, crucial (Livermore e Woodford, 2006).

Considerando as implicações clínicas da resistência às cefalosporinas de terceira geração, foram também investigados os mecanismos associados a essa resistência, nomeadamente a produção de ESBL, pelo que, foi objectivo deste trabalho pesquisar e identificar genes *bla* responsáveis por este fenótipo. A principal limitação nesta pesquisa, partindo da leitura interpretativa do antibiograma, foi a coexpressão de várias enzimas por um mesmo isolado, da qual resultou uma sobreposição de fenótipos que condicionou, por vezes, a definição de qual a melhor estratégia a adoptar. No entanto, globalmente, foram detectados 81 genes *bla*<sub>TEM</sub>, 35 *bla*<sub>SHV</sub>, 71 *bla*<sub>OXA</sub>, 99 *bla*<sub>CTX-M</sub>, um *bla*<sub>GES</sub>, dos quais, de acordo com os critérios adoptados, apenas foram identificados 26 genes que codificavam  $\beta$ -lactamases TEM e SHV, 99 genes que codificavam  $\beta$ -lactamases CTX-M e um gene que codificava a enzima GES-1. Entre os isolados com resistência às cefalosporinas de terceira geração verificou-se que a produção concomitante das  $\beta$ -lactamases CTX-M-15, TEM-tipo e OXA-tipo ocorria num número bastante representativo.

A resistência às combinações  $\beta$ -lactâmicos/inibidores de  $\beta$ -lactamases foi observada num grande número de isolados, ainda que não tenham sido detectadas quaisquer  $\beta$ -lactamases que possam estar na sua origem (IRT ou IRS). Este facto pode ser explicado ainda por vários outros mecanismos, como a produção de enzimas OXA, hiperprodução de TEM e SHV parentais, produção de enzimas AmpC, ou diminuição da permeabilidade (Bradford, 2001; Jacoby, 2009; Wu *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2001).

Num grupo de isolados com susceptibilidade diminuída à ceftazidima e sinergia com o ácido clavulânico identificou-se apenas a expressão de penicilinasas TEM-1 e SHV-1. Também, em alguns destes isolados, se observou resistência às combinações  $\beta$ -lactâmicos/inibidores de  $\beta$ -lactamases, não estando, no entanto, associadas à produção de  $\beta$ -lactamases resistentes aos inibidores. Este facto sugere estar-se em presença de  $\beta$ -lactamases hiperproduzidas, o que pode estar na origem de fenótipos semelhantes aos produzidos por ESBLs (Mendonça *et al.*, 2006a). A hiperprodução de enzimas parentais pode ocorrer por três mecanismos distintos, nomeadamente promotores com mutações nucleotídicas, duplicação do gene *bla* e presença de plasmídeos multicópia (Rice *et al.*, 2000), ou pode ainda dever-se à diminuição da expressão de OMPs, concomitante com a presença de TEM-1 e SHV-1, como demonstrado por Wu *et al.* (1994 e 2001).

Mendonça *et al.* (2006b), no âmbito de um estudo efectuado em Portugal em 2006, demonstrou a coexistência das enzimas CTX-M-15, TEM-1 e OXA-1 (OXA-30) em isolados de *E. coli* em duas regiões distintas. Machado *et al.* (2006) verificou a associação dos genes que codificam aquelas três  $\beta$ -lactamases, ao gene *aac(6)-Ib-cr*, que codifica a enzima Aac(6')-Ib-cr, capaz de inactivar a acção de duas classes de antibióticos em simultâneo, os aminoglicosídeos e as fluoroquinolonas, tendo ainda demonstrado que aqueles genes eram disseminados num plasmídeo comum.

Neste trabalho, embora as enzimas TEM e OXA-tipo detectadas em associação com CTX-M-15 não tenham sido identificadas por sequenciação, podem tratar-se das mesmas  $\beta$ -lactamases veiculadas por um plasmídeo idêntico, uma vez que também aqui se detectou um nível elevado de resistência às fluoroquinolonas e aos aminoglicosídeos. Efectivamente, o genótipo  $bla_{TEM} + bla_{CTX-M} + bla_{OXA}$  foi encontrado em isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* (41/126) provenientes de hospitais de várias regiões de Portugal continental. Se excluíssemos o gene *bla\_{SHV}* cromossómico, detectado adicionalmente em grande parte dos isolados de *K. pneumoniae* (com genótipo  $bla_{TEM} + bla_{SHV} + bla_{CTX-M} + bla_{OXA}$ ), o número de isolados que hipoteticamente teriam aquele plasmídeo seria ainda mais elevado (56/126). O perfil de

---

resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos mais comum que se encontrou (*Tabela 13*), diz respeito à resistência às penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta gerações e monobactâmico, identificado em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*, o qual está associado ao genótipo anteriormente referido. Este fenótipo, já anteriormente disseminado em Portugal, quer em isolados de *E. coli* (2004-2006) quer de *K. pneumoniae* (1999 e 2006), parece manter-se, como se demonstrou na nossa amostra (21,4% dos isolados de 2004/2007 e 78,6% de 2008) (Mendonça *et al.*, 2007; Medonça *et al.*, 2009a). Refira-se, a este respeito, que em todos os isolados dos vários Hospitais, mesmo aqueles com menor representação na amostra do estudo (o que excluí o Hospital G), se identificou CTX-M-15, à excepção do Hospital C (*Tabela 20*).

Até ao início da década de 90, apenas se descreviam na Europa ESBL das famílias TEM e SHV. Porém, este panorama mudou drasticamente na última década pois, actualmente, predominam as  $\beta$ -lactamases da família CTX-M.

Também em Portugal se confirma este predomínio, como reforçam os resultados apresentados neste estudo. Segundo Livermore *et al.* (2007) as  $\beta$ -lactamases CTX-M foram descritas pela primeira vez na Península Ibérica, no ano 2000, com a identificação de isolados de *E. coli* produtores de CTX-M-9. Num estudo multicêntrico realizado em Espanha, com isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* provenientes de 40 hospitais, no período de Março a Junho de 2000, os quais expressavam um fenótipo ESBL, eram prevalentes as enzimas CTX-M-9, CTX-M-14 e SHV-12 (Hernandez *et al.*, 2005). Mais tarde, no ano de 2009, também em Espanha, todos os isolados de *K. pneumoniae* com resistência às cefalosporinas de terceira geração estudadas por Oteo *et al.* (2006) eram produtores da enzima CTX-M-15. Tal como naquele estudo, Mendonça *et al.* (2007 e 2009a) constatou uma emergência das enzimas CTX-M, em Portugal, neste caso, após 1999, ano em que não se detectou a expressão de CTX-M em qualquer isolado de *E. coli* e de *K. pneumoniae*.

A identificação de isolados com características fenotípicas e genotípicas idênticas, em diferentes regiões de Portugal, sugere que a disseminação da resistência associada à enzima CTX-M e, sobretudo, CTX-M-15, seja mediada por elementos móveis e/ou clones geneticamente relacionados, tal como previamente descrito (Mendonça *et al.*, 2007; Livermore *et al.*, 2007). Assim, seria interessante, num futuro próximo, sequenciar as regiões flanqueantes dos genes que codificam estas enzimas e proceder-se ao estudo da clonalidade, eventualmente por PFGE (Electroforese em campo pulsado), de modo a confirmar, ou não, respectivamente, estas duas hipóteses.



---

A análise de isolados produtores de  $\beta$ -lactamases das famílias TEM, SHV e CTX-M permitiu detectar doze enzimas distintas, das quais nove são ESBL e as restantes são penicilinases, como se observa nas *Tabelas 14, 15, 16 e 17*. Para uma completa compreensão da influência das diversas alterações aminoacídicas das enzimas TEM, SHV e CTX-M na sua actividade catalítica, sobre os diferentes substratos em que podem actuar, deve ter-se em conta a sua estrutura. Foram encontradas doze isolados produtores de quatro enzimas da família TEM – TEM-1, TEM-10, TEM-24 e TEM-52 – identificadas a partir dos genes que as codificam.

A enzima TEM-10, a qual apresentou duas substituições aminoacídicas em relação à enzima parental, Arg164Ser e Glu240Lys, estando estas também presentes na enzima TEM-24, apresentou adicionalmente as substituições Gln39Lys, Glu104Lys e Ala237Thr, alterações já previamente descritas (Chanal *et al.*, 1992; Quinn *et al.*, 1989). As alterações aminoacídicas presentes em TEM-10 parecem garantir a hidrólise eficiente da ceftazidima e do aztreonam, mas não das restantes cefalosporinas de terceira geração, como se confirma na *Figura 13*, ainda que exista resistência a outras cefalosporinas; porém, não podemos ignorar o facto de a mesma estirpe co-produzir SHV-28 e, eventualmente, possuir outros mecanismos de resistência que não foram investigados neste trabalho como, por exemplo, a expressão diminuída de OMPs, entre outros (Quinn *et al.*, 1989). A  $\beta$ -lactamase TEM-52 partilha com TEM-24 a substituição Glu104Lys e possui duas substituições adicionais Gly182Thr e Gly238Ser, as quais também já foram descritas em várias enzimas da família TEM (Poyart *et al.*, 1998). O facto de as  $\beta$ -lactamases TEM-24 e TEM-52 serem ESBL e partilharem a substituição Glu104Lys sugere que esta modificação poderá estar relacionada com a capacidade de conferir fenótipo ESBL, embora não esteja presente em TEM-10. Refira-se, no entanto, que SHV-99 possui também uma mutação na posição aminoacídica 104, mas não tem actividade catalítica que lhe associe um fenótipo ESBL, como se justifica mais adiante. A alteração Gly238Ser está localizada na região interior da folha  $\beta_3$ , à semelhança do que sucede com a posição 240, as quais têm sido associadas a fenótipo ESBL. De facto, estudos realizados através de mutagénesis ao acaso (*random mutagenesis*) provaram que esta substituição está associada a fenótipos de resistência à ceftazidima (Bonnet *et al.*, 2001; Bouthors *et al.*, 1998; Knox, 1995).

Como podemos ver na *Tabela 15*, foram identificadas duas  $\beta$ -lactamases da família SHV para além da parental SHV-1 (a mais conhecida e estudada). Também a penicilinase SHV-28 não possui alterações aminoacídicas na região da folha  $\beta_3$ , enquanto a ESBL SHV-12

---

apresenta substituições quer na posição 238, quer na posição 240, o que corrobora o facto de estas posições estarem sempre associadas a fenótipos de resistência às cefalosporinas de terceira geração e, em particular, à hidrólise da ceftazidima (Nuesch-Inderbinen *et al.*, 1997; Bouthors *et al.*, 1998).

Em conclusão, verificou-se que a estrutura das  $\beta$ -lactamases TEM-10, TEM-24, TEM-52 e SHV-12, justifica a sua função ESBL, conferindo resistência às penicilinas, às cefalosporinas de primeira, segunda e terceira gerações e monobactâmico (*Tabela 14, 15 e Figura 13*), com destaque para a ceftazidima, já que as isolados produtores destas  $\beta$ -lactamases apresentaram halos de inibição bastante mais reduzidos e, conseqüentemente, um nível mais elevado de resistência a este antibiótico.

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram ainda que as 99 isolados produtores de  $\beta$ -lactamases pertencentes à família CTX-M eram do grupo 9 (CTX-M-9 e CTX-M-14) e do grupo 1 (CTX-M-1, CTX-M-15 e CTX-M-32). Também neste caso, para se compreender qual a contribuição das substituições aminoacídicas no perfil hidrolítico destas enzimas (expresso na *Figura 14*), é importante ter em conta a sua estrutura (*Tabela 16*). Assim, verifica-se que as enzimas CTX-M-15 e CTX-M-32 apresentaram a mesma substituição aminoacídica (Asp240Gly), apesar da enzima CTX-M-15 diferir de CTX-M-32 em quatro alterações aminoacídicas adicionais, anteriormente descritas por Cartelle *et al.* (2004). CTX-M-32, por sua vez, difere da  $\beta$ -lactamase CTX-M-1 apenas naquela substituição aminoacídica. É de realçar que CTX-M-3 é a enzima parental de CTX-M-15, diferindo entre si apenas na substituição Asp240Gly (Poirel *et al.*, 2002). O facto de a substituição que há em comum entre as enzimas CTX-M-15 e CTX-M-32 ser Asp240Gly, e ambas as enzimas conferirem uma resistência bastante elevada à ceftazidima, permite sugerir que esta substituição será a responsável por aquele fenótipo. Também Kim *et al.* (2005) demonstraram que esta substituição aminoacídica na enzima CTX-M-15 resultava num aumento da hidrólise da ceftazidima comparativamente com a da enzima CTX-M-3. Assim, à semelhança do que foi concluído para as  $\beta$ -lactamases das famílias TEM e SHV, também a substituição Asp240Gly parece ser crucial na actividade catalítica das enzimas CTX-M sobre a ceftazidima. Relativamente às duas enzimas do grupo 9 identificadas neste trabalho, a enzima parental CTX-M-9 e a enzima CTX-M-14 (*Tabela 17*), verificou-se que a presença de uma única alteração aminoacídica (Ala231Val) na enzima CTX-M-14, que as distingue entre si, parece não influenciar significativamente o perfil de resistência; de facto, os isolados que produzem quer uma quer outra destas  $\beta$ -lactamases expressam resistência às cefalosporinas de primeira,

---

segunda, terceira e quarta gerações, embora a produção de CTX-M-9 pareça conferir um maior nível de resistência a estes antibióticos, como a *Figura 14* sugere. Ao contrário das  $\beta$ -lactamases CTX-M do grupo 1, as do grupo 9, não apresentaram qualquer substituição aminoacídica na posição 240 e também não apresentaram um nível elevado de resistência à ceftazidima, o que corrobora a sugestão de que esta posição tem um papel importante na degradação deste antibiótico.

Neste trabalho foi também identificada uma  $\beta$ -lactamase GES-1, a enzima parental das  $\beta$ -lactamases da família GES, à qual pertencem também as enzimas IBC. Esta  $\beta$ -lactamase tem sido pouco descrita em Portugal, em comparação com outras  $\beta$ -lactamases de classe A, embora uma estirpe de *K. pneumoniae* produtora de GES-1 já tenha sido associada a um surto na região de Lisboa (Duarte *et al.*, 2003). De acordo com Poirel *et al.* (2000) esta  $\beta$ -lactamase tem sido predominantemente associada a isolados de *K. pneumoniae*, embora se desconheça o motivo; porém, neste trabalho, a  $\beta$ -lactamase GES-1 foi detectada num isolado de *E. coli* colectado num hospital da região de Lisboa. Esta  $\beta$ -lactamase é caracterizada por conferir fenótipos de resistência às penicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração e à ceftazidima (Queenan e Bush, 2007), mas não às restantes cefalosporinas de terceira geração, o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

Alguns resíduos aminoacídicos parecem estar associados às propriedades catalíticas de GES-1, tal como o resíduo de treonina na posição de Ambler 237, o qual pode ser encontrado em TEM-5 e TEM-24. Também é interessante verificar que GES-1 possui resíduos de cisteína nas posições 69 e 238, que estão frequentemente associados à hidrólise dos carbapenemes; porém, esta  $\beta$ -lactamase, ao contrário de outras da sua família, não é capaz de hidrolisar estes antibióticos, revelando apenas uma maior afinidade para o imipinem do que outras ESBL de classe A (Poirel *et al.*, 2000). Uma vez que não se sabe qual a origem das enzimas da família GES e nenhuma  $\beta$ -lactamase conhecida tem uma homologia superior a 36% com este grupo, torna-se difícil estabelecer relações entre a estrutura e a função nestas  $\beta$ -lactamases.

Ainda no âmbito do estudo das  $\beta$ -lactamases das famílias TEM, SHV, CTX-M e GES, e considerando a predominância de algumas destas enzimas em Portugal, julgou-se oportuno efectuar uma análise da presença e distribuição dos isolados produtores destas enzimas nas diversas instituições e serviços hospitalares. Assim, verificou-se que, na amostra do estudo, existia uma predominância destas  $\beta$ -lactamases nos serviços de medicina e na urgência, o que pode estar relacionado com o facto de as enfermarias dos serviços de medicina serem locais muitas vezes sobrelotados, o que facilita a disseminação de determinantes de resistência e

infecções. Por outro lado, estas circunstâncias são agravadas, porque grande parte dos doentes deste serviço necessitam de catéteres urogenitais e intravenosos, sondas nasogástricas e contacto físico frequente com os profissionais de saúde (Rooney *et al.*, 2009). No caso da urgência existe um maior fluxo de indivíduos e uma população microbiana residual vasta, o que também poderá exercer influência na disseminação de microrganismos e de elementos móveis entre as bactérias. Verificou-se ainda que todas as enzimas SHV-1, que se encontraram no estudo, eram produzidas por *K. pneumoniae* e que tinham sido isoladas no mesmo hospital (n=7), pelo que se suspeita de um processo de disseminação clonal, ainda que só através de realização de PFGE se possa confirmar esta hipótese. Reforça-se, existir evidência de que a  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 se encontra disseminada pelo país, já que entre os dezassete serviços hospitalares do estudo, esta foi encontrada em dezasseis, estando ausente apenas no serviço de cardiologia, tendo sido ainda identificada em hospitais de várias regiões do país.

Neste estudo foi ainda efectuada a caracterização do suporte genético (*framework*) dos genes  $bla_{TEM}$  e  $bla_{SHV}$ . A análise dos genes  $bla_{TEM}$  foi realizada através da comparação da sequência do gene parental  $bla_{TEM-1A}$  com os genes em estudo, ao nível das mutações silenciosas presentes nas posições 32, 147, 162 e 175 da região promotora e 226, 317, 346, 436, 604, 682, 913 e 925 da região codificante. Identificaram-se três tipos de promotores: *P3*, *PaPb* e um novo promotor *PaPb* com a substituição T147A. O promotor *P3* é um promotor relativamente fraco quando comparado com os promotores *P4*, *P5* ou *PaPb* (Lartigue *et al.*, 2002), podendo *PaPb* estar associado à hiperprodução de TEM neste estudo. O novo promotor já havia sido identificado noutros genes  $bla_{TEM}$  detectados na URRA, pelo que se suspeita que exista um gene parental com este promotor a circular em Portugal, já que estes genes foram identificados em isolados de zonas geográficas distintas. A avaliação e caracterização deste novo promotor enquadra-se nas perspectivas futuras deste trabalho. Os *frameworks* encontrados no estudo foram os *frameworks* de  $bla_{TEM-1A}$ ,  $bla_{TEM-1B}$  e o *framework* idêntico a  $bla_{TEM-2}$ , os quais correspondem às variantes mais comuns e se encontram disseminados por todo o mundo (Lartigue *et al.*, 2002). Em relação à análise do suporte genético dos genes  $bla_{SHV}$ , foram igualmente determinadas as mutações silenciosas presentes em posições nucleotídicas específicas dos genes em estudo e comparadas com a sequência do gene  $bla_{SHV-1-1V1}$ , o primeiro dos genes parentais descritos (AF148850). Seguindo a classificação proposta por Mendonça *et al.* (2009b), os genes do estudo apresentaram duas origens diferentes: todos os genes  $bla_{SHV-1}$  e  $bla_{SHV-28}$  derivam do gene

---

*bla*<sub>SHV-1</sub> parental e os genes *bla*<sub>SHV-12</sub> derivam do gene *bla*<sub>SHV-11</sub> parental. Por outro lado, todos os genes *bla*<sub>SHV-1</sub>, identificados em isolados de um mesmo hospital, possuem a variante 1, sugerindo disseminação dessa variante. De referir ainda a presença da variante 18 em isolados de *E. coli* com SHV-28 recolhidos em Portugal e no isolado de *K. pneumoniae* proveniente da Argélia, o que sugere a importação ou exportação desta variante. Estes resultados serão importantes numa análise filogenética alargada sobre a família de genes *bla*<sub>SHV</sub>.

Não é do nosso conhecimento que existam relatos sobre  $\beta$ -lactamases AmpC plasmídicas isoladas em Portugal, pelo que, dada a sua actual emergência noutros países, foi também objectivo deste estudo avaliar a presença deste mecanismo de resistência em isolados com fenótipo de resistência à cefoxitina. Entre os dezassete isolados que revelaram resultados positivos no teste de sinergia com meropenem, treze expressavam uma AmpC cromossómica (Tabela 22), justificando o seu fenótipo de resistência à cefoxitina. A determinação do pl permitiu identificar a  $\beta$ -lactamase AmpC ubiquitária das espécies de *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Citrobacter*, podendo a expressão destas  $\beta$ -lactamases cromossómicas ter estado na origem do fenótipo observado num pequeno grupo de isolados, para as quais não foi detectado nenhum gene *bla* (Tabela 12 e 22). De acordo com vários autores, as  $\beta$ -lactamases AmpC cromossómicas de bactérias de Gram negativo possuem propriedades catalíticas distintas entre si, mesmo entre organismos da mesma espécie, devido à ocorrência de inserções e mutações pontuais no gene *ampC* (Conceição *et al.*, 2004; Literacka *et al.*, 2004; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009). De facto, tal mecanismo pode ter estado na origem da resistência ao imipinem observada numa estirpe clínica de *Enterobacter* spp, como aliás, já foi previamente descrito (Lee *et al.*, 1991).

A distinção entre  $\beta$ -lactamases AmpC cromossómicas e plasmídicas é importante no âmbito da vigilância da susceptibilidade aos antibióticos e mecanismos de resistência associados, pelo que optámos por pesquisar também AmpC plasmídicas em isolados do presente trabalho. Assim, foram detectadas duas enzimas AmpC plasmídicas, nomeadamente uma CMY-2 e uma DHA-1, tendo esta última sido detectada num *Enterobacter agglomerans*. Segundo Phillipon *et al.* (2002) existem vários relatos de isolados do género *Enterobacter* spp produtores de enzimas AmpC plasmídicas, sendo CMY-2 (também denominada LAT-2) a mais prevalente, já detectada previamente em França, Alemanha, Grécia, entre outros países. Este é o primeiro relato de  $\beta$ -lactamases AmpC plasmídicas em Portugal, não sendo estas enzimas, aparentemente, muito frequentes. No entanto, é muito importante a sua detecção e

---

vigilância para alertar o seu aparecimento e, assim, possibilitar que a cefoxitina continue a constituir uma alternativa terapêutica.

Muitos dos isolados produtores de AmpC plasmídicas descritos são frequentemente também produtores de ESBLs (Philippon *et al.*, 2002). Os resultados obtidos neste trabalho são disso prova, pois os dois isolados que produziam AmpC plasmídicas eram também produtores de CTX-M-14, CTX-M-15 e de  $\beta$ -lactamases das famílias TEM, SHV e/ou OXA. No que diz respeito ao grupo de isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*, nas quais não foi detectada nenhuma  $\beta$ -lactamase que justificasse a resistência à cefoxitina, podem pôr-se várias hipóteses que justificam este fenótipo: no caso de *E. coli* pode ter sido devido à hiperprodução de  $\beta$ -lactamase AmpC cromossômica e à perda de porinas (OmpF) e em *K. pneumoniae* pode ter sido causada pela perda de porinas, as quais, só por si, podem garantir este fenótipo (Nelson e Elisha, 1999; Martinez-Martinez *et al.*, 1996).

A transferência dos genes responsáveis pelo fenótipo dos isolados produtores de ESBL e AmpC, para um sistema isogénico, foi ensaiado por conjugação e electroporação, tendo-se concretizado apenas para um isolado produtor de CTX-M-1. Assim, apenas neste caso foi confirmada a resistência plasmídica conferida pelo gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> e a possibilidade de disseminação horizontal do mesmo, devida a elementos móveis; esta transferência genética compreendeu apenas os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, pois a resistência às combinações  $\beta$ -lactâmicos/inibidores de  $\beta$ -lactamases, trimetropim e sulfametoxazol não foi transferida. Sabendo-se da dificuldade de transformação destes genes, sugere-se a pesquisa de uma eventual localização cromossômica, utilizando a endonuclease I-CeuI num futuro próximo, para melhor compreender a facilidade da disseminação da resistência referida.

Foi também objectivo deste estudo a avaliação da multirresistência nos 126 isolados, que incluía, à partida, a resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Entre os 104/126 isolados que apresentaram resistência a três ou mais classes de antibióticos, encontraram-se dois perfis predominantes e ambos incluíam a resistência aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, o que pode dever-se ao facto dos mecanismos de resistência a estes e aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos circulararem, muitas vezes, num plasmídeo comum, como já referido no presente capítulo, o que é corroborado pela associação frequente da enzima Aac-6'-Ib-cr e das  $\beta$ -lactamases CTX-M-15, TEM-tipo e OXA-tipo a estes perfis (Machado *et al.*, 2006). A resistência às fluoroquinolonas pode também ser justificada pela existência de outros mecanismos, como os genes que codificam proteínas Qnr e mutações nos genes que codificam a DNA girase

---

(Robicsek *et al.*, 2006; Livermore, 2003); estes mecanismos não foram, no entanto, investigados neste trabalho.

Os isolados do estudo foram predominantemente susceptíveis à fosfomicina, colistina e nitrofuranos. A fosfomicina é um antibiótico utilizado maioritariamente no tratamento de infecções do tracto urinário inferior causadas por *E. coli* multirresistentes, sendo extremamente baixa a frequência de isolados resistentes a este antibiótico. De facto, em alguns países Europeus apenas 1% das estirpes de *E. coli* uropatógenicas são resistentes à fosfomicina. Esta resistência parece ter origem em mutações que promovem também a diminuição do *fitness* bacteriano, pelo que os mutantes são incapazes de se estabelecer e multiplicar (Livermore, 2003; Nilsson *et al.*, 2003). A colistina, por sua vez, parece manter-se susceptível devido à ausência de pressão de selecção. De facto, este antibiótico foi utilizado durante várias décadas, mas foi posteriormente excluído da terapêutica convencional por estar associado a casos de neuro e nefrotoxicidade; recentemente voltou a ser utilizado no tratamento de infecções multirresistentes por *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, sendo raros os casos de resistência (Falagas e Kasiakou, 2005). Os nitrofuranos são também maioritariamente utilizados no tratamento de infecções urinárias por microrganismos multirresistentes e é da sua degradação por nitroreduzases bacterianas que resultam compostos intermediários, altamente reactivos, que interferem com a síntese proteica e causam morte celular. Dada a vastidão destas enzimas na célula bacteriana, julga-se que os baixos níveis de resistência à nitrofurantoína se devem à combinação dos múltiplos locais alvo e múltiplos mecanismos de acção do antibiótico (McOsker e Fitzpatrick, 1994).

Em conclusão, a análise efectuada revelou um panorama preocupante de multirresistência em bactérias de Gram negativo em Portugal. Seria ainda interessante investigar os mecanismos associados às resistências detectadas noutras classes de antibióticos, que não os  $\beta$ -lactâmicos, e determinar qual a sua relação com os mecanismos de resistência associados a essa classe, especificados neste trabalho.

Neste estudo efectuiu-se ainda a caracterização enzimática de uma nova  $\beta$ -lactamase, SHV-99, a qual apresentava a substituição Asp104Gly, quando comparada com SHV-1, revelando capacidade para hidrolisar o grupo das penicilinas. A relevância da determinação dos parâmetros cinéticos desta  $\beta$ -lactamase prendeu-se com o facto de ser a primeira vez que esta alteração aminoacídica foi descrita isoladamente na natureza. Outras substituições na posição 104 já foram, contudo, estudadas em mutantes obtidos por mutagenese dirigida e já foi descrita em  $\beta$ -lactamases da família TEM, associada ao fenótipo ESBL (Bethel *et al.*,

---

2006; Lenfant *et al.*, 1990). De facto, existem 45 enzimas TEM que possuem a substituição Glu104Lys, todavia, apenas as que possuem concomitantemente alterações no sítio activo, surgem associadas a resistência às cefalosporinas de terceira geração (Bethel *et al.*, 2006).

De acordo com os parâmetros cinéticos obtidos pode afirmar-se que SHV-99 apresentou uma eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) diminuída em relação a SHV-1, mas parece ter mais afinidade ( $K_m$ ) para as penicilinas, cefalosporinas de terceira geração e monobactâmico, ainda que este aumento não seja suficiente para se exprimir associado ao fenótipo ESBL. De acordo com Bethel *et al.*, (2006), a posição 104 de Ambler parece ter um papel importante no reconhecimento de substratos pelas  $\beta$ -lactamases da família SHV, o que foi confirmado pelas alterações nas constantes de afinidade obtidas para SHV-99. De facto, nas  $\beta$ -lactamases de classe A, este resíduo encontra-se ligado por pontes de hidrogénio ao aminoácido Asn132, adjacente à região conservada do centro activo (Ser-Asp-Asn), sugerindo que alterações nesta posição podem, efectivamente, ter implicações no mecanismo de hidrólise (Knox, 1995).

Ao contrário do que sucede nas  $\beta$ -lactamases que têm aminoácidos polares nesta posição (lisina ou arginina), a alteração para um aminoácido neutro, como a glicina, causou uma diminuição na eficiência catalítica global ( $k_{cat}/K_m$ ), o que sugere que a carga do aminoácido também pode ter implicações na estabilização do centro activo e na consequente ligação ao substrato, o que já foi também sugerido por Bethel *et al.* (2006). Pelo exposto, a alteração aminoacídica Asp104Gly será responsável pelo aumento da afinidade para os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e, em particular, para as cefalosporinas de terceira geração, provavelmente pelo reconhecimento da cadeia lateral destes antibióticos (Bethel *et al.*, 2006; Knox., 1995), embora esta enzima não possa ser considerada uma ESBL, pois a sua eficiência catalítica é demasiado reduzida ( $k_{cat}/K_m$ ).

Sendo a determinação dos parâmetros cinéticos das  $\beta$ -lactamases importante para uma melhor compreensão da função das várias substituições aminoacídicas nas propriedades catalíticas das enzimas, pois são cada vez menos os antibióticos capazes de actuar em bactérias de Gram negativo sem serem hidrolisados pela acção deste mecanismo de resistência bacteriana, julgamos ter dado também um contributo para o conhecimento nessa matéria.

Globalmente, este trabalho mostra um cenário preocupante no que se refere à resistência aos antibióticos em Portugal. Seria interessante completar este trabalho, não só nos aspectos anteriormente referidos, mas também no que diz respeito ao estudo de outras espécies de bactérias de Gram negativo, nomeadamente *A. baumannii* e resistência destas aos



carbapenemes. A investigação de outros mecanismos de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como a diminuição da produção de OMPs, seria também uma mais valia, bem como o estudo das variantes de  $\beta$ -lactamases AmpC cromossômicas. É de salientar que, apesar de neste estudo terem sido estudadas várias famílias de genes e das  $\beta$ -lactamases que codificam, muitos(as) outros(as) ficaram por estudar, dada a vastidão do tema.

---

---

## V. Bibliografia

Abraham, E. P. e Chain, E. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 146: 837.

Ambler, R.P. 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289:321-331.

Barthélémy, L. 1985. Distinction entre les structure primaire des beta-lactamases TEM-1 et TEM-2. *Ann Inst Pasteur Microb* 136A:311-321.

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

Bauernfeind, A., Grimm, H. e Schweighart, S. 1990. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection* 18:294-298.

Bethel, C. R., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Thomson, J. M., Ruszczycky, M. W., Anderson, V.E., Pusztai-Carey, M., Taracila, M., Helfand, M.S. e Bonomo, R. A. 2006. Role of Asp104 in the SHV beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 50:4124-4131.

Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1-14.

Bonnet, R., Champs, C., Chanal, C., Labia, R. e Sirot, J. 1999. Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2671-2677.

Bonnet, R., Dutour, C., Sampaio, J.L., Chanal, C., Sirot, D., Labia, R., De, C.C. e Sirot, J. 2001. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp(240)Gly. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2269-2275.

Bonnet R., Sampaio, J.L., Labia, R., Champs, C.D., Sirot, D., Chanel, C. e Sirot, J. 2000. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:1936-1942.

Bradford, P.A. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14:933-51.

Bouthors, A. T., Goneau-Blanchard, N., Naas, T., Nordmann, P., Jarlier, V. e Sougakoff, W. 1998. Role of residues 104, 164, 166, 238 and 240 in the substrate profile of PER-1 beta-lactamase hydrolysing third-generation cephalosporins. *Biochem* 330:1443-1449.

- Boyd, D.A. e Mulvey, M.R. 2006. OXA-1 is OXA-30 is OXA-1. *J Antimicrob Chemother* 58:224-225.
- Bush, K. e Jacoby, G.A. 1997. Nomenclature of TEM beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39:1-3.
- Bush, K., Jacoby, G.A., e Medeiros, A.A. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1211-1233.
- Cantón, R. e Coque, T. 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology* 9:466-476.
- Cardoso, O., Leitão, R., Figueiredo, A., Sousa, J. C., Duarte, A. e Peixe, L. V. 2002. Metallo-beta-lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microb Drug Resist* 8:93-97.
- Cartelle, M., Tomas, M. M., Molina, F., Moure, R., Villanueva, R. e Bou, G. 2004. High-Level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240→Gly substitution. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:2308-2313.
- Cavallo, J. D., Chardon, H., Chidiac, C., Courvalin, P., Dabernat, H., Drugeon, H., Dubreuil L., Goldstein, F., Guery, B., Jarlier, V., Lambert, T., Leclercq, R., Nicolas-Chanoine, M. H., Quentin, C., Rouverix, B., Soussy, C.J. e Varon, E. 2008. Recommendations 2008. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Paris. France.
- Chaibi, E. B., Farzaneh, S., Péduzzi, J., Barthélémy, M. e Lábia, R. 1996. An additional ionic bond suggested by molecular modelling of TEM-2 might induce a slight discrepancy between catalytic properties of TEM-1 and TEM-2 beta-lactamases. *FEMS Microbiol Lett.* 143: 121-125.
- Chanal, C., Poupart, M. C., Sirot, D., Labia, R., Sirot, J. e Cluzel, R. 1992. Nucleotide sequences of CAZ-2, CAZ-6, and CAZ-7 beta-lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1817-1820.
- Conceição, T., Faria, N., Lito, L., Melo Cristino, J., Salgado, M. J. e Duarte, A. 2004. Diversity of chromosomal AmpC beta-lactamases from *Enterobacter cloacae* isolates in a Portuguese Hospital. *FEMS microbiology letters* 230:197-202.
- Donowitz, G.R. e Mandell, G.L. 1988. Beta-lactam antibiotics. *N Engl J Med* 318:419-426.
- Duarte, A., Boavida, F., Grosso, F., Correia, M., Lito, L. M., Cristino, J. M. e Salgado,

---

M. J. 2003. Outbreak of GES-1 beta-lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital in Lisbon, Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1481-1482.

Falagas, M. E. e Kasiakou, S. K. 2005. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 40:1333-1341.

Gazouli, M., Legakis, N. e Tzouvelekis, S. 1998. Effect of substitution of Asn for Arg-276 in the cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase CTX-M-4. *FEMS Microbiol Lett* 169:289-293.

Georgopapadakou, N.H. e Liu, F.Y. 1980. Penicillin-binding proteins in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 18:148-157.

Ghuysen, J.M. 1991. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annual Review of Microbiology* 45:37-67.

Harbottle, H., Thakur, S., Zhao, S., e White, D. G. 2006. Genetics of antimicrobial resistance. *Anim Biotechnol* 17:111-124.

Henrichfreise, B., Wiegand, I., Sherwood, K. J. e Wiedemann, B. 2005. Detection of VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1668–1669.

Heritage, J., Zhao, S., e Hawkey, P.M. 1997. Evolution and spread of SHV of extended spectrum beta-lactamases in Gram-negative bacteria. *J Mol Evol* 44:57-65.

Hernandez, J. R., Martinez-Martinez, L., Canton, R., Coque, T. M. e Pascual, A. 2005. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2122-2125.

Honore, N., Nicolas, M.H., e Cole, S.T. 1986. Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. *EMBO J* 5:3709-3714.

Humeniuk, C., Arlet, G., Gautier, V., Grimont, P., Labia, R., e Philippon, A. 2002. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3045-3049.

Jacoby, G. A. 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22:161-82

Jacoby, G.A. e Bush K. 2009. Aminoacid sequences for TEM, SHV and OXA extended spectrum and inhibitor resistant beta-lactamases. Versão 23 de Setembro 2009.

---

Jacoby, G.A. e Munoz-Price, M. 2005. The new beta-lactamases. *N Eng J Med* 352:380-391.

Kim, J., Lim, Y., Jeong, Y. e Seol, S. 2005. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14 and CTX-M-9 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates in Korea. *Antimicrob Agents Chemother*, 49:1572-1575.

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

Kummerer, K. 2003. Significance of antibiotics in the environment. *J Antimicrob Chemother* 52:5-7.

Labia, R. 1973. Computurized microacidimetric determination of beta-lactamase Michaelis-Menten constant. *FEBS letters* 33:42-44.

Lartigue, M. F., Leflon-Guibout, V., Poirel, L., Nordmann, P. e Nicolas-Chanoine, M. H. 2002. Promoters P3, Pa/Pb, P4, and P5 upstream from *bla*<sub>TEM</sub> genes and their relationship to beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 46:4035-4037.

Lee, E. H., Nicolas, M. H., Kitzis, D., Pialoux, G., Collatz, E. e Gutmann, L. 1991. Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 35: 1093-1098.

Lee, S. e Jeong, S. 2005. Nomenclature of GES-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2148-2150.

Lenfant, F., Labia, R. e Masson, J. M. 1990. Probing the active site of beta-lactamase R-TEM1 by informational suppression. *Biochimie* 72:495-503.

Levy, S.B. 1998. The challenge of antibiotic resistance. *Sci Am* 278:46-53.

Literacka, E., Empel, J., Baraniak, A., Sadowy, E. Hryniewicz, W. e Gniadkowski, M. 2004. Four variants of the *Citrobacter freundii* AmpC-type cephalosporinases, including novel enzymes CMY-14 e CMY-15, in a *Proteus mirabilis* clone widespread in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4136-4143.

Livermore, D.M. 1995. Beta-lactamases in clinical and laboratory resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 8:557-584.

Livermore, D.M. 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* 36:S11-S23.

Livermore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G. M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T. M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L. e Woodford, N.

---

2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 59:165-174.

Livermore, D. M. e Woodford N. 2006. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology* 14:412-420.

Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., Baquero, F., Sousa, J. C. e Peixe, L. 2006. Dissemination in Portugal of CTX-M-15, OXA-1-, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3220-3221.

Maltezou, H. C., Giakkoupi, P., Maragos, A., Bolikas, M., Raftopoulos, V., Papahatzaki, H., Vrouhos, G., Liakou, V. e Vatopoulos, A. C. 2009. Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). *J Infect* , 58: 213-9.

Martinez-Martinez, L., Hernandez-Alles, S., Alberti, S., Tomas, J. M., Benedi, V. J. e Jacoby, G. A. 1996. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 40:342-348.

McOsker, C. e Fitzpatrick, P. 1994. Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *J Antimicrob Chemother.* 33:23-30.

Mendonça, N., Ferreira, E. e Caniça, M. 2006a. Occurrence of a novel SHV-type enzyme (SHV-55) among isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Portuguese origin in a comparison study for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing evaluation. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 56:415-420.

Mendonça, N., Ferreira, E., Louro, D., Participantes do ARSIP e Caniça, M. 2009a. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended- and broad-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. *Int J Antimicrob Chemother.*34:29-37.

Mendonça, N., Leitão, J., Manageiro, V., Ferreira, E. e Caniça, M. 2007. Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1946-1955.

Mendonça, N., Louro, D., Castro, A. P., Diogo, J. e Caniça, M. 2006b. CTX-M-15, OXA-30 and TEM-1-producing *Escherichia coli* in two Portuguese regions. *J Antimicrob*

Chemother. 57:1014-1016.

Mendonça, N., Manageiro, V., Robin, F., Salgado, M.J., Ferreira, E., Caniça, M., e Bonnet, R. 2008. The Lys234Arg substitution in the enzyme SHV-72 is a determinant for resistance to clavulanic acid inhibition. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1806-1811.

Mendonça, N., Nicolas-Chanoine, M. H. e Caniça, M. 2009b. Diversity of *bla<sub>SHV</sub>* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* (a aguardar impressão).

Morosini, M.I., Ayala, J.A., Baquero, F., Martinez, J.L. e Blazquez J. 2000. Biological cost of AmpC production for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* 44:3137-3143.

Muller, A., Coenen, S., Monnet, D. L. e Goossens, H. 2007. ESAC project group. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe, 1998-2005. *Euro Surveill.* 12.

Murray P., Rosenthal, K. e Pealler, M. 2005. *Medical Microbiology*. Fifth edition. Elsevier Mosby, USA.

Nelson, E. C. e Elisha, B. G. 1999. Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:957-959.

Nikaido, H. 2009. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annual Review of Biochemistry* 78:8-28.

Nilsson, A. I., Berg, O. G., Aspevall, O., Kahlmeter, G. e Andersson, D. I. 2003. Biological costs and mechanisms of fosfomicin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2850-2858.

Nordmann, P. e Poirel, L. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 8:321-331.

Normark, B.H. e Normark, S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med* 252:91-106.

Nuesch-Inderbinen, M. T., Kayser, F. H. e Hachler, H. 1997. Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother* 41:943-949.

Oteo, J., Cuevas, O., Lopez-Rodriguez, I., Banderas-Florido, A., Vindel, A., Perez-Vazquez, M., Bautista, V., Arroyo, M., Garcia-Caballero, J., Marin-Casanova, P., Gonzalez-Sanz, R., Fuentes-Gomez, V., Ona-Compan, S., Garcia-Cobos, S. e Campos J. 2009. Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J Antimicrob*

---

Chemother. 64:524-528.

Papanicolaou, G.A., Medeiros, A.A., Jacoby, G.A. 1990. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 34:2200-2209.

Pato M. 1989. Susceptibilidade aos antibióticos. bioMérieux Portuguesa, Portugal.

Peleg, A. Y., Franklin, C., Bell, J. M. e Spelman, D. W. 2005. Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene *bla*<sub>IMP-4</sub> among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis* 41:1549-1556.

Perez-Perez, F.J. e Hanson, N.D. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40:2153-2162.

Petit, A., Maveyraud, L., Lenfant, F., Samama, J. P., Labia, R. e Masson, J. M. 1995. Multiple substitutions at position 104 of beta-lactamase TEM-1: assessing the role of this residue in substrate specificity. *Biochem J* 305:33-40.

Philippon, A., Jacoby, G.A. e Guillaume, A. 2002. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1-11.

Poirel, L., Gniadkowski, M. e Nordmann, P. 2002. Biochemical analysis of the ceftazidima-hydrolysing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related  $\beta$ -lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother*, 50:1031-1034.

Poirel, L., Le, T. I., Naas, T., Karim, A. e Nordmann, P. 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:622-632.

Pomba-Féria, C. e Caniça, M. 2003. A novel sequence framework (*bla*<sub>TEM-1G</sub>) encoding the parental TEM-1 beta-lactamase. *FEMS Microbiology Letters*, 220:177-180.

Poyart, C., Mugnier, P., Quesne, G., Berche, P. e Trieu-Cuot, P. 1998. A novel extended-spectrum TEM-type beta-lactamase (TEM-52) associated with decreased susceptibility to moxalactam in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 42:108-113.

Queenan, A. M. e Bush, K. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 20:440-58.

Quinn, J. P., Miyashiro, D., Sahm, D., Flamm, R. e Bush, K. 1989. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 33:1451-1456.



---

Ramdani-Bougoussa, N., Leitão, J., Ferreira, E., Tazir, M., Caniça, M. 2007. Spread of extended-spectrum beta-lactamases among clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from an algerian hospital, ECCMID.

Rice, L. B., Carias, L. L., Hujer, A. M., Bonafede, M., Hutton, R., Hoyen, C. e Bonomo, R. A. 2000. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 beta-lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:362-367.

Robicsek, A., Jacoby, G. A. e Hooper, D. C. 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 6:629-640.

Rodríguez-Martínez, J. M., Poirel, L. e Nordmann, P. 2009. Extended-Spectrum Cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa* *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53: 1766-1771

Rooney, P. J., O'Leary, M. C., Loughrey, A. C., McCalmont, M., Smyth, B., Donaghy, P., Badri, M., Woodford, N., Karisik, E. e Livermore, D. M. 2009. Nursing homes as a reservoir of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.*

Samaha-Kfoury, J.N. e Araj, G.F. 2003. Recent developments in beta-lactamases and extended spectrum beta-lactamases. *BMJ* 327:1209-1213.

Sougakoff, W. Goussard, S. e Courvalin, P. 1988. The TEM-3 beta-lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiol Lett* 56:343-348.

Tortola, M. T., Lavilla, S. e Miro, E. 2005. First detection of a carbapenem hydrolyzing metalloenzyme in two *Enterobacteriaceae* isolates in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 249:3492–3494.

Tysall, L., Stockdale, M. W. e Chadwick, P. R. 2002. IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolate from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49:217–218

Tzouvelekis, L.S., Tzelepi, E., Tassios, P.T., Negakis, N.J. 2000. CTX-M-type beta - lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 14:137-143.

Walther-Rasmussen, J. e Hoiby, N. 2006. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 57:373-383.

Wright, G.D. 2003. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Curr Opin Chem Biol* 7:563-569.

Wu, P. J., Shannon, K. e Phillips, I. 1994. Effect of hyperproduction of TEM-1 beta-lactamase on in vitro susceptibility of *Escherichia coli* to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 38:494-498.

Wu, T. L., Siu, L. K., Su, L. H., Lauderdale, T. L., Lin, F. M., Leu, H. S., Lin, T. Y. e Ho, M. 2001. Outer membrane protein change combined with co-existing TEM-1 and SHV-1 beta-lactamases lead to false identification of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 47:755-761.

## VI. Anexos

### Anexo i.



**Figura a.** TSA de *E. coli* produtora de  $\beta$ -lactamases TEM-tipo, OXA-tipo e CTX-M-15 (Grupo 1) (consultar legenda no final).



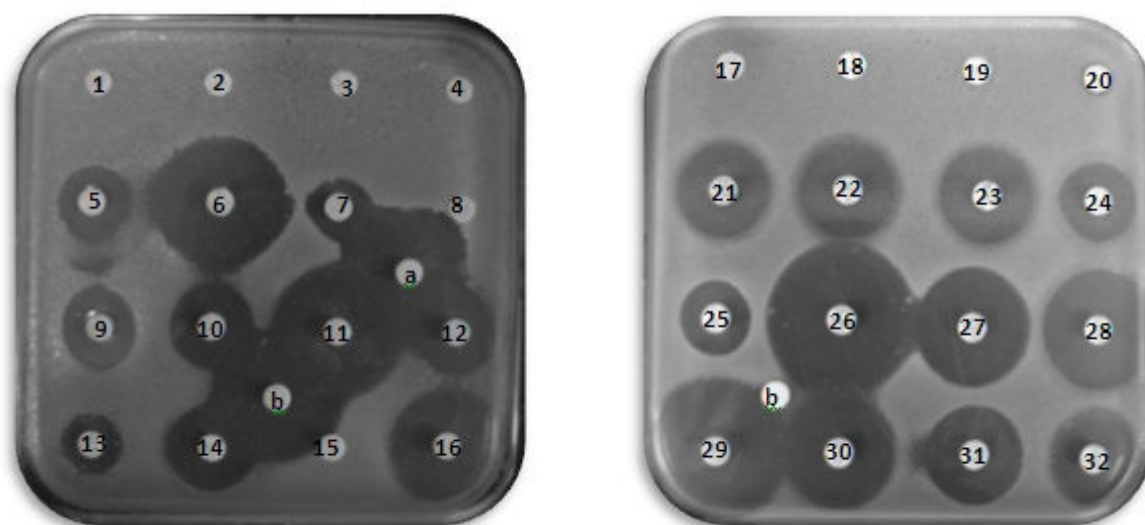
**Figura b.** TSA de *E. aerogenes* produtor de  $\beta$ -lactamase TEM-24 (consultar legenda no final).



**Figura c.** TSA de *E. coli* produtora de  $\beta$ -lactamase SHV-12 (consultar legenda no final).



**Figura d.** TSA de *E. coli* produtora de  $\beta$ -lactamase CTX-M-1 (Grupo 1) (consultar legenda no final).



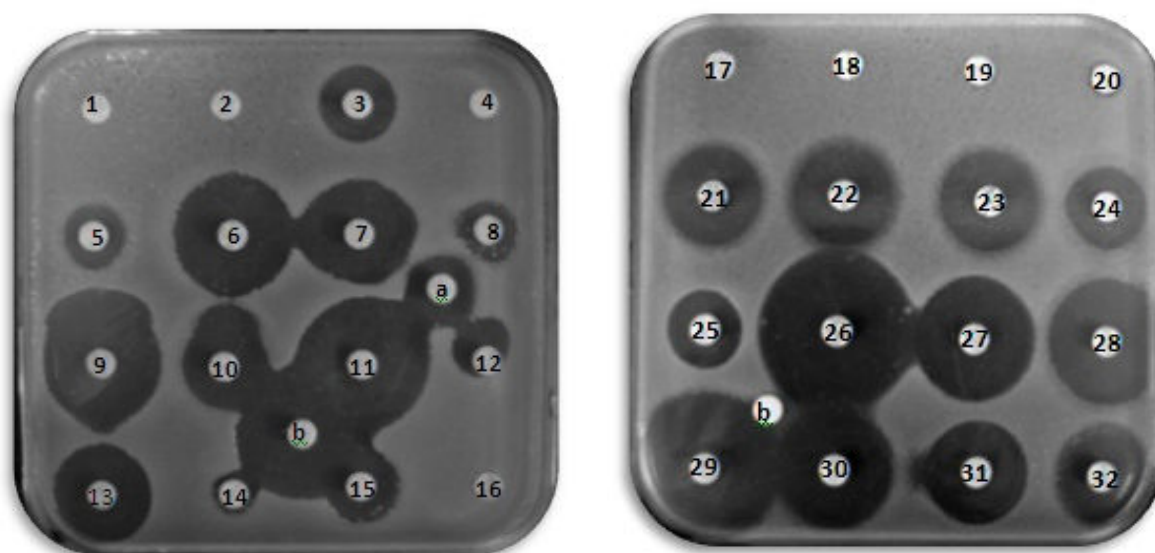
**Figura e.** TSA de *E. coli* produtora de  $\beta$ -lactamase CTX-M-14 (Grupo 9) (consultar legenda no final).



**Figura f.** TSA de *E. coli* produtora de  $\beta$ -lactamase GES-1 (consultar legenda no final).



**Figura g.** TSA de *E. coli* produtora de  $\beta$ -lactamase AmpC CMY-2 (consultar legenda no final).



**Figura h.** TSA de *E. aerogenes* produtor de  $\beta$ -lactamase AmpC cromossômica (consultar legenda no final).

---

---

**Legenda<sup>a</sup>:**

<b>1. AMX</b>	<b>11. IMP</b>	<b>21. KAN</b>	<b>31. CRO</b>
<b>2. PIP</b>	<b>12. CAZ</b>	<b>22. GEN</b>	<b>32. TGC</b>
<b>3. TIC</b>	<b>13. TZP</b>	<b>23. AN</b>	<b>a. AMC</b>
<b>4. CF</b>	<b>14. CXM</b>	<b>24. SXT</b>	<b>b. EDTA</b>
<b>5. AMC</b>	<b>15. CFM</b>	<b>25. CS</b>	
<b>6. CCTX</b>	<b>16. FOX</b>	<b>26. FOS</b>	
<b>7. CTX</b>	<b>17. NA</b>	<b>27. NT</b>	
<b>8. CPD</b>	<b>18. NOR</b>	<b>28. TMP</b>	
<b>9. FEP</b>	<b>19. PEF</b>	<b>29. MER</b>	
<b>10. ATM</b>	<b>20. CIP</b>	<b>30. CCAZ</b>	

<sup>a</sup> Ver abreviaturas de antibióticos na *Tabela 8*.

## Anexo ii.

**Tabela a.** Medida dos halos de inibição de 32 antibióticos para a estirpe clínica de *K. pneumoniae* (*Kp*INSA<sub>7623</sub>), transformante (*Ec* HB<sub>101</sub>(CTX-M-1)) e recipiente (*Ec* HB<sub>101</sub>  $\Delta ampC$ ).

Antibiótico	Halo de inibição (mm)		
	<i>Kp</i> INSA <sub>7623</sub> (CTX-M-1)	<i>Ec</i> HB <sub>101</sub> $\Delta ampC$	<i>Ec</i> HB <sub>101</sub> (CTX-M-1)
AMX	6	26	6
AMC	12	26	25
PIP	6	28	6
TIC	6	25	6
CF	6	26	6
CTX	15	26	15
CCTX	29	27	29
CAZ	20	27	20
CCAZ	29	28	29
CXM	6	26	6
CFM	18	25	18
CRO	9	27	9
CPD	12	27	12
FEP	15	29	15
ATM	19	28	19
FOX	26	30	26
IMP	31	30	31
MER	32	31	32
TZP	12	29	29
NA	24	24	24
NOR	27	27	27
PEF	28	28	28
CIP	27	27	27
KAN	19	19	19
GEN	19	19	19
NA	20	20	20
SXT	6	19	19
TMP	6	26	26
CS	15	15	16
FOS	24	24	24
FT	19	19	19
TGC	24	25	25

*Kp*INSA<sub>7623</sub> é a estirpe clínica que produtora de CTX-M-1; *Ec* HB<sub>101</sub>  $\Delta ampC$  é a estirpe recipiente utilizada na transformação; *Ec* HB<sub>101</sub> (CTX-M-1) é o transformante produtor de CTX-M-1. Ver abreviaturas de antibióticos na *Tabela 8*.



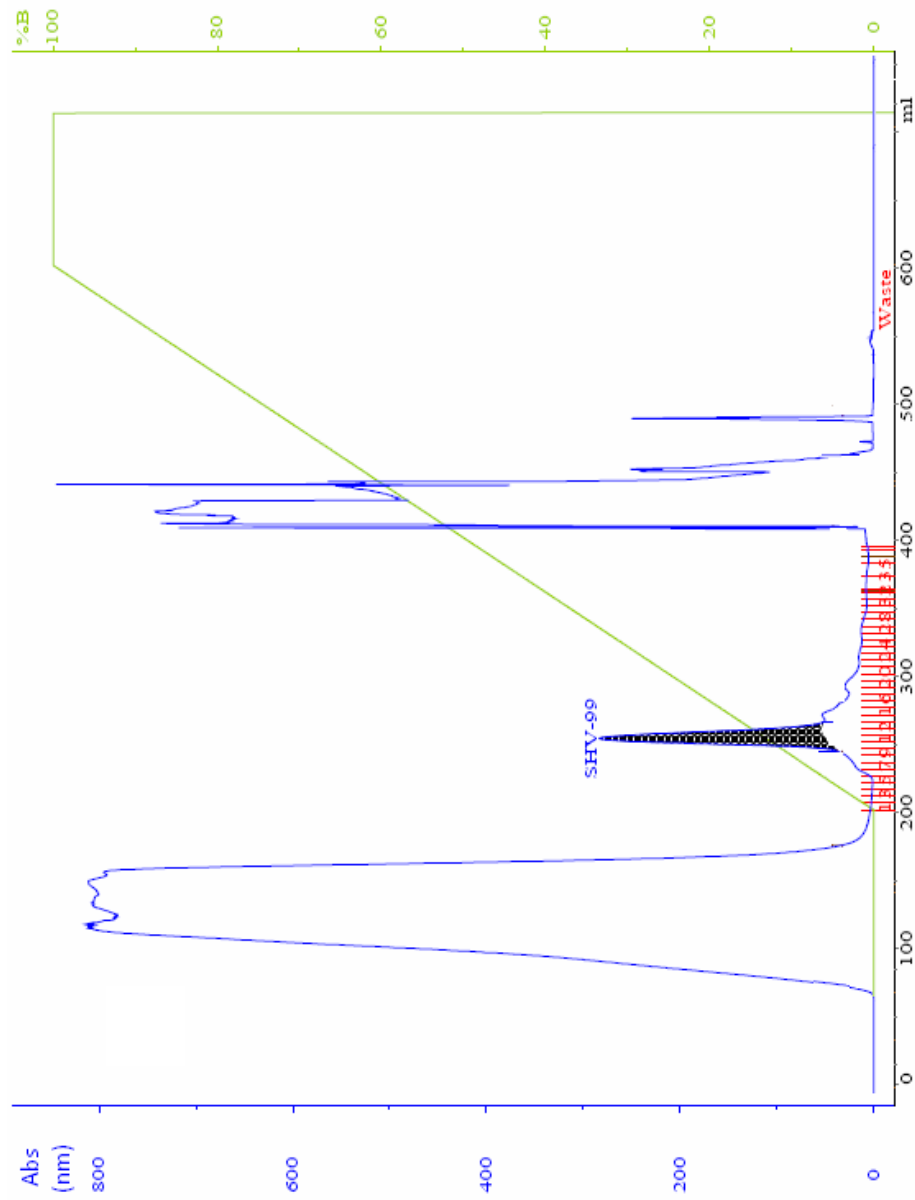
## Anexo iii.

**Tabela a.** CIMs da estirpe clínica *K. pneumoniae* Arg220, transformante produtor de SHV-99 e da estirpe receptora *Ec* DH5 $\alpha$   $\Delta ampC$ .

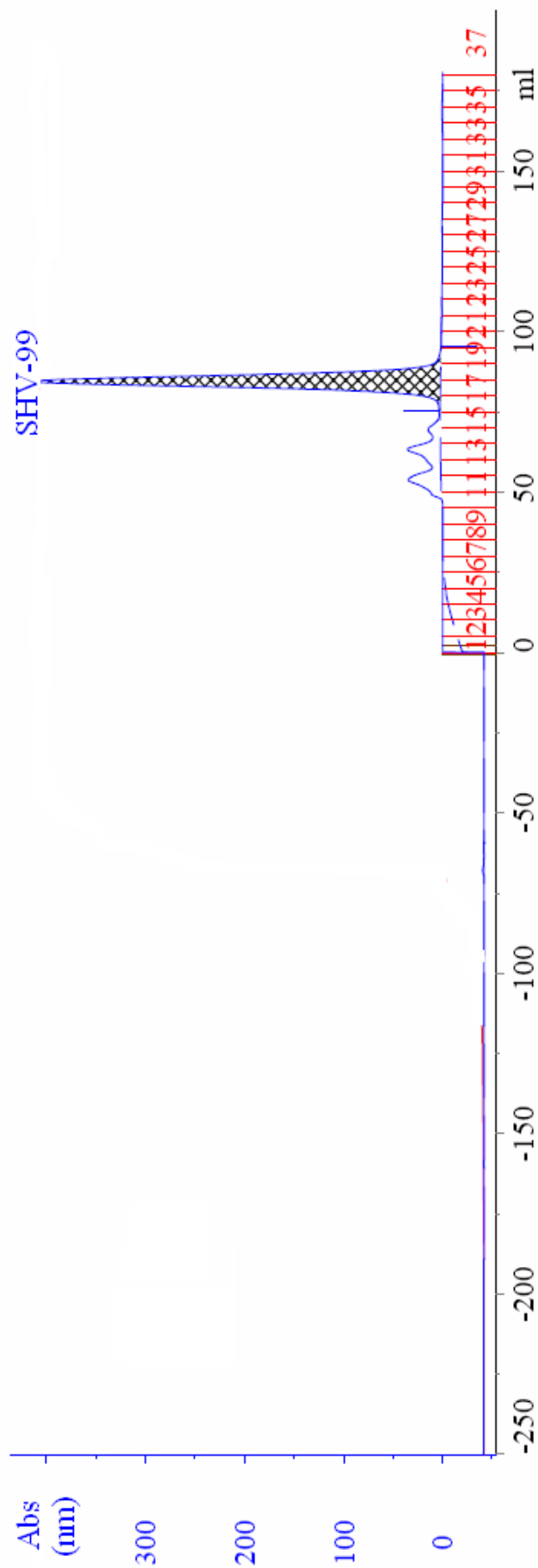
	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	<i>Ec</i> DH5 $\alpha$ $\Delta ampC$	<i>Kp</i> ARG220	<i>Ec</i> DH5 $\alpha$ <sup>a</sup> (SHV-99)
<b>AMX</b>	8	>4096	>4096
<b>AML</b> <sup>b</sup>	8	>64	8
<b>TIC</b>	4	>4096	>4096
<b>PIP</b>	2	>256	>256
<b>TZP</b> <sup>c</sup>	1	256	8
<b>CF</b>	8	>1024	32
<b>CXM</b>	4	>512	8
<b>CRO</b>	0,03	>512	0,125
<b>CCRO</b>	0,06	0,5	0,03
<b>CTX</b>	0,06	512	0,06
<b>CCTX</b>	0,06	1	0,06
<b>CAZ</b>	0,25	64	0,25
<b>CCAZ</b>	0,125	1	0,125
<b>ATM</b>	0,06	512	0,06
<b>FEP</b>	0,03	64	0,25
<b>IMP</b>	0,25	0,125	0,25

<sup>a</sup>*Ec*DH5 $\alpha$  (SHV-99) foi o transformante que produziu SHV-99. <sup>b</sup> Ácido clavulânico a uma concentração fixa de 2  $\mu\text{g/ml}$ . <sup>c</sup> Tazobactam a uma concentração fixa de 4  $\mu\text{g/ml}$ . Ver abreviaturas de antibióticos na *Tabela 8*.

Anexo iv.



**Figura a.** Absorvância (azul) em função do volume de amostra (preto) e da concentração de NaCl 100mM (Solução B, verde) no âmbito da técnica de cromatografia de troca iônica com SHV-99. A vermelho encontram-se representadas as frações de amostra recolhidas.



**Figura b.** Absorvância (azul) em função do volume de amostra (preto) no âmbito da técnica de cromatografia de filtração em gel com SHV-99. A vermelho encontram-se representadas as frações de amostras recolhidas.

