

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**Impacto da sobre-expressão de bombas de efluxo de
estirpes *E. coli* MDR clínicas na resistência aos
compostos antimicrobianos**

NADIA BORGES CHAREPE



2008

Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**Impacto da sobre-expressão de bombas de efluxo
em estirpes *E.coli* MDR clínicas na resistência
aos compostos antimicrobianos**

NADIA BORGES CHAREPE

*Tese apresentada para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biomédicas*

**Orientador:
Prof. Doutor Miguel Viveiros**

COMUNICAÇÕES APRESENTADAS

CHAREPE, N.; VIVEIROS, M.; MARTINS, M.; RODRIGUES, L.; COUTO, I.; CARDOSO, A.; CORREIA, A.; AMARAL, L.; 2008. O papel do efluxo na multirresistência aos antibióticos em isolados clínicos de *Escherichia coli*; IX Congresso Nacional de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica, 7º Congresso Nacional sobre Sida e XII Congresso Português de Parasitologia.

AGRADECIMENTOS

Após a realização deste trabalho de dois anos, queria dedicar este pequeno espaço para deixar alguns agradecimentos a um conjunto de pessoas que para mim foram muito importantes, que me acompanharam e apoiaram durante este período.

Assim, em primeiro lugar quero agradecer a todos os elementos da Unidade de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical nomeadamente, Professora Isabel Couto, Marta Martins, Liliana Rodrigues, Diana, Jorge, Gabriella Spengler, D^a Mariana, D^a Fernanda, e um especial agradecimento à minha amiga e colega Sofia Santos Costa, por estar sempre do meu lado, e por tanto me ter ensinado ao longo deste tempo, e ainda à Ana Catarina por me ter acompanhado nos meus primeiros passos desta aprendizagem.

Queria dedicar um agradecimento especial ao Professor Doutor Miguel Viveiros, pela orientação cedida, ciente que sem ela não conseguiria concluir este trabalho. Agradeço-lhe pela disponibilidade e paciência demonstrada ao longo deste percurso.

Agradeço à minha família, à minha mãe e avó, por cuidarem de mim enquanto pessoa, por me apoiarem nos momentos mais difíceis. À minha irmã, por estar sempre do meu lado e pela transmissão dos preciosos conselhos.

Um obrigado às minhas amigas, Irina e Augusta, pelo apoio incondicional e amizade.

Finalmente, a minha eterna gratidão para com o meu companheiro Cláudio, por ser o pilar fundamental na minha vida, por me compreender e apoiar sempre em todas as minhas decisões, sem ele a construção deste projecto seria impossível.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	63
1. Importância do fenómeno da infecção associada aos cuidados de saúde e a emergência da multirresistência aos antibióticos.....	28
2. As <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>Escherichia coli</i>	34
3. Antibióticos e mecanismos responsáveis pela multirresistência.....	41
4. Multirresistência por sistemas de efluxo. A estrutura dos sistemas de efluxo parietal em bactérias e sua caracterização bioquímica.....	55
5. Compostos inibidores de bombas de efluxo - <i>efflux pumps</i> <i>Inhibitors</i> (EPIs).....	60
6. Metodologias aplicadas na detecção dos mecanismos de efluxo em bactérias.....	63
II. OBJECTIVOS.....	64
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	90
1. Estirpes clínicas e controlo.....	70
2. Antibióticos e compostos antimicrobianos.....	71
3. Reagentes utilizados na actividade experimental.....	72
4. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) para antibióticos e EPIs.....	73
5. Método de <i>Screening</i> de BEs - <i>EB-Agar Cartwheel Method</i>	74
6. Método de <i>Screening</i> da actividade dos EPIs.....	79
7. Método de <i>Screening</i> de BEs – <i>EB - Agar Cartwheel Method</i> / EPIs.....	79

8. Método de Etest® e Kirby Bauer.....	81
9. Fluorimetria em termociclador de tempo-real (Rotor-Gene 3000™) – método semi-automático com a utilização de EtBr.....	85
10. Extração de RNA total.....	87
11. Análise génica das estirpes clínicas por qRT-PCR.....	90
IV. RESULTADOS.....	128
1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) das estirpes clínicas para os EPIs.....	95
2. Método de <i>Screening</i> de BEs – EB - <i>Agar Cartwheel Method</i>	97
3. Método de <i>Screening</i> da actividade dos EPIs.....	103
4. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) das estirpes clínicas para os antibióticos na presença dos EPIs.....	107
5. Método de <i>Screening</i> de BEs – EB - <i>Agar Cartwheel</i> <i>Method/EPIs</i>	113
6. Método de Kirby Bauer / Etest®.....	115
7. Fluorimetria em termociclador de tempo-real (Rotor-Gene 3000™) - método semi-automático com a utilização de EtBr.....	123
8. qRT-PCR (<i>quantitative reverse - transcriptase - polimerase chain reaction</i>).....	128
V. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	138
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1 - Eventos para a multirresistência aos antibióticos.....	27
Figura I.2 - Esquema representativo da parede celular em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	30
Figura I. 3 - Coloração de Gram (<i>E. coli</i>).	33
Figura I. 4- Mecanismos de resistência da bactéria.	39
Figura I. 5 - Representação esquemática dos sistemas exportadores de drogas em bactérias gram- negativas.....	40
Figura I. 6- Sistema ABC em bactérias Gram-negativas.....	43
Figura I. 7 - Modelo do complexo tripartido de efluxo AcrAB- TolC de <i>Escherichia coli</i>	49
FiguraI. 8 - Estrutura das proteínas AcrA, AcrB and TolC de <i>Escherichia coli</i>	49
Figura III.1 - Representação esquemática do método de <i>Screening</i> da actividade dos EPIs.....	76
Figura IV. 1 - Representação esquemática da localização das estirpes nas placas utilizadas no método de <i>Screening</i> de BE.....	94
Figura IV. 2 - Placas de TSA com EtBr com concentrações de 0 a 2,5 ug/ml- análise das estirpes clínicas e controlos de efluxo.....	95
Figura IV. 3 - Reversão da resistência ao TMP da estirpe <i>E.coli</i> 5 (UFCs) na presença de TZ e PAN.....	98
Figura IV. 4 - Reversão da resistência ao TMP da estirpe <i>E. coli</i> 13 (UFCs), na presença da TZ.....	99
Figura IV. 5- Redução da resistência à GN da estirpe <i>E. coli</i> 13 (UFCs), na presença do EDTA e do PAN.....	100

Figura IV. 6- Reversão da resistência à CIP da estirpe <i>E. coli</i> 16 (UFCs), na presença do VP e redução da resistência com TZ.....	101
Figura IV.7 Reversão da resistência à CIP da estirpe <i>E.coli</i> 19 (UFCs) na presença de TZ e VP e ainda redução da resistência com o PAN.....	102
Figura IV. 8 - <i>E. coli</i> 5 em placas com EtBr e EPIs incubadas a 37°C.....	108
Figura IV. 9- <i>E. coli</i> 5 em placas com EtBr e EPIs incubadas a 4°C.....	109
Figura IV. 10 - <i>E. coli</i> 16 em placas com EtBr e EPIs incubadas a 37°C.....	110
Figura IV. 11 - <i>E. coli</i> 16 em placas com EtBr e EPIs incubadas a 4°C.....	111
Figura IV.12- <i>E. coli</i> 19 em placas com EtBr e EPIs incubadas a 37°C.....	112
Figura IV. 13- <i>E. coli</i> AG100 - ensaio de acumulação de EtBr, na presença de CPZ, TZ, CCCP, PAN.....	116
Figura IV. 14- <i>E. coli</i> AG100 - ensaio de efluxo (fluorescência relativa) a 37°C e na presença de 0.4% de glucose (glu), carregada com 3 µg / mL de EtBr, na presença de CPZ, após normalização dos dados.....	117
Figura IV. 15 - <i>E. coli</i> 5 - ensaio de efluxo (fluorescência relativa) a 37°C e na presença de 0.4% de glucose (glu), carregada com 3 µg/mL de EtBr, na presença de CPZ, após normalização dos dados.....	119
Figura IV. 16 - <i>E. coli</i> 13 – ensaio de efluxo (fluorescência relativa) a 37°C e na presença de 0.4% de glucose (glu), carregada com 3 µg/mL de EtBr, na presença de CPZ, após normalização dos dados.....	120
Figura IV. 17- <i>E. coli</i> 16 - ensaio de efluxo (fluorescência relativa) a 37°C e na presença de 0.4% de glucose (glu), carregada com 3 µg/mL de EtBr, na presença de CPZ, após normalização dos dados.....	121
Figura IV. 18 - <i>E.coli</i> 19 – ensaio de efluxo (fluorescência relativa) a 37°C e na presença de 0.4% de glucose (glu), carregada com 3 µg/mL de EtBr, na	

presença de CPZ, após normalização dos dados.....	122
Figura IV. 19- Efluxo das estirpes clínicas e estirpe controlo (fluorescência relativa), na presença de glucose.....	123
Figura IV. 20 - <i>E. coli</i> 16 - média dos ensaios de RT- PCR e respectivas barras de erro.....	126
Figura IV. 21- <i>E. coli</i> 19 - média dos ensaios de RT- PCR e respectivas barras de erro.....	127
Figura IV. 22- <i>E. coli</i> 16 e 19 – Gráfico comparativo da média dos ensaios de qRT- PCR.....	128

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I.1 -Medidas de controlo da resistência aos antimicrobianos.....	23
Tabela I. 2 - Mecanismos de resistência aos antibióticos.....	35
Tabela I.3 - Transportadores principais de efluxo e seus respectivos substratos.....	54
Tabela III. 1 - Perfil de resistência e dados clínicos das estirpes clínicas.....	69
Tabela III. 2 - Soluções e discos de antibiótico utilizados.....	71
Tabela III. 3 - Soluções stock dos compostos antimicrobianos preparadas.	71
Tabela III. 4 – Soluções tampão, enzimas e corantes utilizados.....	72
Tabela III. 5 - Estirpes clínicas e respectivos antibióticos / EPIs testados.....	78
Tabela III. 6 - Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> usados na metodologia qRT -PCR, e respectivos amplicões.....	89
Tabela IV. 1 - CMI dos EPIs para as estirpes clínicas.....	92
Tabela IV. 2 - CMI de outros compostos testados para as estirpes clínicas.....	92
Tabela IV.3 - Concentração inicial de fluorescência das estirpes <i>E. coli</i> MDR em placas de TSA com EtBr com concentrações de 0 a 2.5 µg/mL, após incubação a 37°C e 4°C.....	95
Tabela IV. 4 - CMIs da estirpe controlo (AG 100) para os antibióticos.....	104
Tabela IV. 5 - CMIs e CMBs para as estirpes clínicas <i>E. coli</i> 5 e 13 do Trimetoprim e na presença ou ausência dos EPIs.	104
Tabela IV. 6 - CMIs e CMBs para a estirpe clínica <i>E. coli</i> 13 da gentamicina e na presença ou ausência dos EPIs.	105
Tabela IV. 7 - CMIs e CMBs para as estirpes clínicas <i>E. coli</i> 16 e 19 da ciprofloxacina (CIP) e na presença ou ausência dos EPIs.....	106
Tabela IV. 8 - Concentração visível do aumento da fluorerscência em placas de	

EtBr e EPIs inoculadas com as estirpes clínicas, quer a 37°C como a 4°C.....113

Tabela IV. 9 - Resultados E test[®] para as estirpes clínicas para os quatro
antibióticos em estudo e EPIs a ½ CMI.....114

LISTA DE ABREVIATURAS

1. Ácido etileno diamino tetracético (EDTA)
2. *Adenosina trifosfato* (ATP)
3. AG100 adaptada à tetraciclina (AG100A_{TET})
4. Ampicilina (AMP)
5. Antibioterapia (AB)
6. *ATP- (adenosina trifosfato) binding cassette superfamiliy* (ABC)
7. Bombas de efluxo (BE)
8. Brometo de etídeo (EtBr)
9. *Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone* (CCCP)
10. *Centers for Disease Control* (CDC)
11. Ciprofloxacina (CIP)
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)
13. Clorpromazina (CPZ)
14. *Comparative threshold cycle* (C_T)
15. Comissões de Controlo da Infecção (CCI)
16. Concentração ([])
17. Concentração mínima inibitória (CMI)
18. Controlo negativo (C-)
19. Concentração mínima bactericida (CMB)
20. *Escherichia coli* (*E. coli*)
21. *E. coli* enteropatogénica (EPEC)
22. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

23. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)
24. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)
25. *E. coli* enteroagregativa (EAEC)
26. *Efflux pump inhibitors* (EPIs)
27. Feminino (♀)
28. Gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase (Gap A1)
29. Gentamicina (GEN)
30. Serviços de Assistência Médico-Social do Sindicato dos Bancários do Sul e Ilhas (SAMS)
31. Igual (=)
32. Infecção associada aos cuidados de saúde (IACS)
33. Lipopolissacáridos (LPS)
34. *L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide* (PAN)
35. Luria-Bertani (LB)
36. *Major facilitator superfamily* (MFS)
37. Masculino (♂)
38. *Membrane fusion protein* (MFP)
39. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)
40. Mistura (MIX)
41. Mueller Hinton Broth (MHB)
42. Mueller Hinton Agar (MHA)
43. *Multidrug and toxic compound extrusion family* (MATE)
44. *Multiple antibiotic resistance* (*mar*)
45. Multirresistentes (MDR)
46. *Outer membrane proteins* (Omps)

47. *Penicilin binding proteins* (PBPs)
48. Programa Nacional de Controlo da Infecção (PNCI)
49. *Quantitative Reverse Trascrption- Polimerase Chain Reaction* (qRT – PCR)
50. Resistente (R)
51. *Resistance nodulation division family* (RND)
52. *Small multidrug resistance family* (SMR)
53. Superior (>)
54. *Surviving Sepsis Campaign* (SSC)
55. Tampão fosfato (PBS)
56. Tioridazina (TZ)
57. Transcriptase reversa (RT)
58. *Transmenbrantar segments* (TMS)
59. Trimetoprim (TMP)
60. Tryptone Soya Broth (TSB)
61. Tryptone Soya Agar (TSA)
62. Teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA)
63. Unidades formadoras de colónias (UFC)
64. Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs)
65. Verapamil (VP)

RESUMO

A multirresistência aos antibióticos é actualmente uma questão de enorme relevância clínica, que coloca sérias limitações em termos de opções terapêuticas. Este problema tem ganho particular visibilidade em Enterobacteriaceas, assistindo-se a um aumento de infecções por estirpes de *Escherichia coli* multirresistentes.

Com este trabalho pretendem-se estudar os mecanismos fisiológicos de resistência aos antibióticos em *E. coli*, com particular ênfase na detecção e quantificação da componente de efluxo nesta resistência.

Foram estudadas 8 estirpes clínicas de *E. coli* multirresistentes, isoladas no serviço de Patologia Clínica do Hospital dos SAMS, de pacientes internados neste hospital entre o último semestre de 2007 e o primeiro semestre de 2008. A presença de actividade de bombas de efluxo nestas estirpes foi avaliada por:

- (1) Determinação de concentrações mínimas inibitórias para a ciprofloxacina, trimetoprim e gentamicina na presença/ausência de inibidores de bombas de efluxo (Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, phenylalanyl arginyl- β -naphthylamide, verapamil, tioridazina e clorpromazina);
- (2) Detecção da possível sobre-expressão de bombas de efluxo por aumento da extrusão de brometo de etídeo, um substrato de bombas de efluxo, por métodos qualitativos em placa e quantitativos por fluorimetria em tempo real, utilizando um termociclador em tempo real (Rotor-Gene 3000TM da Corbett).
- (3) Quantificação relativa dos níveis de expressão de mRNA (qRT-PCR) dos genes *acrA*, *acrB*, *acrE*, *acrF*, *marA*, *yhiV* e *emrB*, codificantes e reguladores de bombas de efluxo relacionadas com a resistência aos antibióticos em *E. coli*.

Das 8 estirpes de *E. coli* testadas, 4 demonstraram possuir um efluxo aumentado de brometo de etídeo, que é fortemente inibido pelos inibidores de bombas de efluxo testados, tendo-se verificado concomitante reversão/redução da resistência aos antibióticos nestas estirpes quando na presença de inibidores de bombas de efluxo. A análise por qRT-PCR das 2 estirpes com maior actividade de efluxo, foi possível verificar a sobre-expressão dos genes codificantes para as bombas de efluxo estudados, destacando-se a sobre-expressão (50x aumentado) do principal sistema de efluxo em *E. coli*, o sistema *acrAB*, numa das estirpes altamente resistente aos antibióticos. Igualmente foi possível caracterizar uma estirpe clínica de *E.coli* multirresistente com actividade de efluxo aumentada devido à sobre expressão do sistema *AcrEF*.

Verificou-se que a sobre-expressão de bombas de efluxo é uma realidade nas estirpes clínicas de *E. coli*, contribuindo significativamente para a multirresistência aos antibióticos. A utilização de técnicas simples e rápidas com recurso a substratos fluorescentes, poderá contribuir para detectar precocemente a resistência aos antibióticos por sobre-expressão de bombas de efluxo. No futuro, o uso de inibidores de bombas de efluxo como compostos adjuvantes da terapêutica poderá vir a constituir uma opção clínica a considerar de forma a recuperar a actividade de antibióticos em estirpes resistentes.

ABSTRACT

The multidrug resistance to antibiotics is nowadays an important issue with clinical significance, and that brings restrictions to therapeutic options. This problem has gained visibility mostly in *Enterobacteriaceae*, with an increase in *Escherichia coli* (*E. coli*) multidrug resistant infections.

The aim of this work is to study physiologic mechanisms of antibiotic resistance in *E. coli*, with particular emphasis in the detection and quantification of efflux component in bacterial resistance.

We have studied 8 multidrug resistant *E. coli* strains, isolated in the Clinical Pathology Laboratory of SAMS Hospital, Lisbon from hospitalized patients between the last semester of 2007 and the first semester of 2008. The presence of efflux pumps activity in these strains was evaluated with different methods:

- (1) Determination of the Minimum inhibitory concentration (MICs) for ciprofloxacin, gentamicin, trimethoprim in the presence/absence of efflux pump inhibitors (Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, phenylalanyl arginyl- β -naphthylamide, verapamil, thioridazine e chlorpromazine);
- (2) Detection of the efflux pumps over expression due to an increase in expulsion of ethidium bromide, that is an efflux pump substrate, with qualitative (solid medium plates) and quantitative methods (real time fluorimetry, with the use of the Rotor-Gene 3000™ Corbett thermocycler).
- (3) Relative quantification of mRNAs (qRT-PCR) of *acrA*, *acrB*, *acrE*, *acrF*, *marA*, *yhiV* e *emrB* efflux pumps encoded genes in *E. coli*.

From the 8 strains of *E. coli* studied, 4 showed increased ethidium bromide efflux, and we were able to observe reversion/reduction of their antibiotic resistance when in presence of efflux pump inhibitors. The qRT-PCR analysis of the two strains that showed the most active efflux activity revealed the over expression of their efflux-pump genes, with particular importance on the most important efflux system of *E. coli*, the AcrAB efflux system (50x increased). It was also demonstrated and characterized a clinical *E. coli* MDR strain with its MDR phenotype associated with the over-expression and increased activity of the AcrEF system.

The methods used in this work allowed the detection of the increase efflux activity in multidrug resistant *E. coli* clinical strains and this increased activity was correlated with the over expression of their efflux-pump systems, with direct relation to their multidrug resistance. Therefore, over expression of efflux pump is a fact in *E. coli* clinical strains and this has direct implications in their multidrug resistance. The application of simple and fast techniques might contribute to early detect antibiotic resistance due to efflux pumps over expression in clinical strains. In the future, the application of efflux pump inhibitors as helper compounds in antibiotherapy might be a clinical option to consider.

“Antimicrobial resistance will always be with us. The challenge before us is to transform this increasingly urgent threat into a manageable problem.”

J. Todd Weber

National Center for Infectious Diseases, Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA

INTRODUÇÃO

1. A importância do fenómeno da infecção associada aos cuidados de saúde e a emergência da multirresistência aos antibióticos

A infecção associada aos cuidados de saúde (IACS) é definida como sendo uma infecção adquirida pelos doentes em consequência dos cuidados e procedimentos de saúde prestados, e que também pode afectar os profissionais de saúde durante o exercício da sua actividade (DGS, 2007). Previamente a esta definição, estas infecções eram também designadas como infecções nosocomiais, embora este conceito não fosse abrangente, pois excluía as infecções adquiridas em ambulatório. Desta forma tornou-se fundamental, definir este problema de forma mais alargada, permitindo uma articulação entre todas as unidades prestadoras de cuidados de saúde, com a finalidade de reduzir o risco de infecção cruzada.

A preocupação com as infecções adquiridas em meio hospitalar surgiu com os trabalhos pioneiros de Semmelweiss, Lister e Nightingale, nos quais se estabeleceram os primeiros esboços da prevenção e controlo da infecção hospitalar, numa era em que os hospitais exerciam uma vertente mais humanitária que científica (DGS, 2007).

Em Portugal, a infecção hospitalar foi abordada pela primeira vez em 1930, pela Direcção-Geral da Saúde e em 1979 pela Direcção-Geral dos Hospitais. Em 1993, a Direcção-Geral dos Hospitais, difundiu a necessidade da institucionalização de comissões de controlo da infecção nos hospitais. Foram desenvolvidos sectores orientadores para minimizar o risco e controlar a infecção nos hospitais, como foi o caso da criação de Comissões de Controlo da Infecção (CCI) nas unidades de saúde públicas

ou privadas, integradas na rede nacional de prestação de cuidados de saúde. Posteriormente, a Direcção-Geral da Saúde em 1999, instituiu o Programa Nacional de Controlo da Infecção (PNCI), com o objectivo de dar a conhecer a dimensão do problema e promover as medidas necessárias para a prevenção da infecção, através da identificação e modificação das práticas de risco (DGS, 2007).

A IACS, não sendo um problema novo, assume cada vez maior importância em Portugal e no mundo. À medida que a esperança de vida aumenta e que dispomos de tecnologias cada vez mais avançadas e invasivas, bem como de terapêuticas antibióticas agressivas e ainda a terapêutica imunossupressora, aumenta também o risco de infecção, quer em unidades de cuidados intensivos quer em outras unidades hospitalares. Estudos internacionais revelam que cerca de um terço das infecções adquiridas no decurso da prestação de cuidados são seguramente evitáveis (OMS). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), um em cada quatro doentes internados numa Unidade de Cuidados Intensivos (UCI) tem um risco acrescido de adquirir uma IACS, sabendo-se ainda, que esta estimativa pode duplicar nos países menos desenvolvidos (DGS, 2007).

Por todos os aspectos acima referidos, a IACS pode resultar em gastos elevados na saúde, pelo aumento da taxa de ocupação em unidades de saúde, aumento da morbilidade e mortalidade e ainda um decréscimo na qualidade de vida dos indivíduos, sendo um problema de saúde pública (DGS, 2007).

O uso alargado e muitas vezes indiscriminado de antibióticos desde o aparecimento em 1940 da penicilina tem conduzido ao aparecimento de infecções graves e que colocam em risco a vida humana, devido ao fenómeno da multirresistência. O termo antibiótico refere-se originalmente a compostos naturais produzidos por fungos ou outros microrganismos que são responsáveis por eliminar bactérias, tendo sido introduzido em 1942 por Waksman (Waksman, S.A., Tishler, M., 1942). Alguns

antibióticos podem ser compostos sintéticos que também podem matar ou inibir o crescimento de microrganismos (www.cdc.gov). Os antibióticos podem actuar de duas formas distintas: por efeito bacteriostático (ao impedir as bactérias de se dividirem, como o caso do cloranfenicol) e por efeito bactericida (agentes que eliminam as bactérias, como a penicilina) (Yoneyama & Katsumata, 2006).

A resistência aos antibióticos é definida como a capacidade da bactéria de se manter viável permanente ou temporariamente, sob condições que destroem ou inibem o crescimento da maioria dos membros da população, isto é, quando a população não é susceptível à concentração do antibiótico que é usado na prática clínica, impedindo a sua eliminação total (Cloete, 2003).

Como definição de multirresistência (*multidrug resistance*-MDR) entende-se a resistência a duas ou mais classes de antibióticos com estrutura diferente entre si (Mahamoud, Chevalier, Alibert-Franco; Kern, Pàges, 2007). A multirresistência não consegue ser corrigida facilmente uma vez instalada, pois existem vários mecanismos de resistência que, uma vez estabelecidos, não permitem a sua reversão, mesmo com a redução ou abolição do uso de determinado antibiótico, pois o fenótipo de resistência é estabilizado ao longo do tempo (Barbosa & Levy, 2000).

Porque este fenómeno se encontra actualmente em fase exponencial em unidades de cuidados de saúde, é premente que se tente desenvolver mecanismos de controlo do uso de antibióticos, como guias de utilização e manuais de boas práticas, assim como manter a vigilância epidemiológica nos diferentes locais onde o seu uso é frequente (Tabela I.1). Os programas de vigilância epidemiológica devem ser centrados em cada instituição e depois comparados com outras instituições, isto porque, cada instituição tem as suas próprias características no que diz respeito aos microrganismos mais frequentes e políticas de uso dos antibióticos (Barbosa & Levy, 2000).

No sentido de limitar o seu abuso, os antibióticos têm vindo a ser de declaração obrigatória em termos de prescrição, tendo que ser bem fundamentada a escolha de um em detrimento de outros, sendo frequente o aparecimento de novas estirpes resistentes, imediatamente após a introdução de novos antibióticos (Barbosa & Levy, 2000; Jones *et al*, 2004).

Medidas de controlo da resistência aos antibióticos
Prescrição apropriada do antibiótico: <ul style="list-style-type: none">- Utilização de <i>guidelines</i> para a administração dos antibióticos- Terapêutica combinada- Rotação de antibióticos- Antibióticos restritamente seleccionados
Programas de vigilância epidemiológica: <ul style="list-style-type: none">- Detecção de novos padrões de resistência- Detecção rápida de microrganismos resistentes
Controlo da infecção: <ul style="list-style-type: none">- Isolamento de doentes e uso de barreiras de protecção em doentes infectados/colonizados com microrganismos resistentes.
Educação dos profissionais de saúde
Monitorização computadorizada e feedback administrativo na prescrição dos antibióticos
Ênfase numa abordagem multidisciplinar para controlar a infecção
Revisão das políticas hospitalares e acreditações por comissões externas

Tabela I.1 - Medidas de controlo da resistência aos antimicrobianos. Adaptada: Karam & Heffner, 2000.

A multirresistência emerge sobretudo nos casos de doentes sob antibioterapia prolongada, como por exemplo, um doente com infecções urinárias de repetição sujeito a antibioterapia repetida ao longo do tempo. Muitas vezes estes doentes não sabem especificar a antibioterapia prévia, ou esta não consta nos registos clínicos, e ao ser internado devido a uma infecção sistémica grave, como uma septicémia de ponto de partida urinário, será tratado empiricamente com antibióticos muitas vezes de largo espectro, sem antes ter sido identificado o organismo e o seu perfil de resistência aos fármacos, o que conduz à eliminação da flora susceptível comensal. Esta situação pode conduzir a outras co-infecções por microrganismos patogénicos ou por microrganismos habitualmente comensais, cujo número de efectivos tenha aumentado por pressão selectiva do antibiótico, pois normalmente nas UCIs, os doentes tornam-se imunossuprimidos devido a factores como a malnutrição e a necessidade de usar dispositivos invasivos para administração de terapêutica/monitorização/ventilação.

Esta problemática deve-se sobretudo por cada vez mais se manterem doentes imunossuprimidos em UCIs, sendo este facto potenciado por uso de produtos antissépticos para a realização da higiene dos doentes e da própria unidade. Igualmente, os procedimentos invasivos e a cateterização dos doentes não ocorrem, por vezes, nas condições ideais de assepsia uma vez que a sua colocação é urgente em doentes nestas unidades, o que aumenta o risco de infecção. Quando o doente é transferido após estabilização, permite a disseminação dos microrganismos resistentes que adquiriu ou desenvolveu durante a passagem pela UCI, disseminando estes microrganismos no hospital (Karam & Heffner, 2000).

Normalmente neste cenário, as infecções são causadas por mais que um microrganismo. Está preconizado pela *Surviving Sepsis Campaign* (SSC), que se deve colher amostras biológicas dos locais possíveis de infecção, prévio à administração do

antibiótico e assim que os resultados são obtidos e isolado o agente, são retirados os antibióticos de largo espectro que devem ser substituídos por antibióticos de espectro menos amplo e mais específico, de forma a reduzir a pressão selectiva (www.survivingsepsis.org).

O uso de antibióticos como profilaxia sobretudo em pós-operatórios cirúrgicos, quando de forma prolongada, é também um dos factores predisponentes para a multirresistência (Barbosa & Levy, 2000). Assim, a utilização de terapêutica dirigida para o microrganismo causador da infecção é crucial nas primeiras horas para a sobrevivência do doente com infecções bacterianas sistémicas.

Vários são os factores que contribuem para o aparecimento da multirresistência aos antibióticos em doentes infectados, e como tal o doente deve ser analisado como um todo onde várias possibilidades devem ser consideradas, como seja o uso indevido de antibióticos para tratar infecções virais, ou doses e períodos de tempo incorrectos que potenciam a multirresistência, sendo os antecedentes pessoais fulcrais para o desenvolvimento de infecções multirresistentes (Figura I.1).

No entanto, o fenómeno da multirresistência pode ser muitas vezes evitado, efectuando-se um rigoroso controlo microbiológico. Cabe aos profissionais de saúde na cadeia multidisciplinar estarem informados e elucidados sobre os mecanismos de resistência, sobre a farmacocinética dos antibióticos dentro das várias classes, sobre as formas de prevenção da infecção e sobre as medidas de controlo face à mesma, microbiologia dos agentes e por fim, a execução ideal de técnicas para identificar o microrganismo causador da infecção.

Contudo, para que estes procedimentos se mantenham sem disrupções, é necessário que a informação seja partilhada por todos e que a própria instituição fomente essa

partilha nas suas práticas locais através de protocolos operacionais e manuais de procedimentos que necessitam de actualização constante (Barbosa & Levy, 2000).

Uma visão global do fenómeno da multirresistência, permite igualmente identificar os factores socioeconómicos, como a educação, pobreza, higiene e condições de vida, como sendo potenciadores desta problemática. Estes facilitam o aparecimento de reservatórios de estirpes MDR, na comunidade, sobretudo de bactérias comensais como *Escherichia coli* (*E. coli*) em indivíduos saudáveis, sem ter havido consumo prévio de antibióticos (Cava *et al*, 1996).

Os factores ambientais, alimentares e o abuso de desinfectantes domésticos e outros agentes antibacterianos, também são apontados como potenciadores da multirresistência, embora sejam escassos os estudos de correlação directa entre a emergência de estirpes MDR em animais, na agricultura e água, e as infecções em humanos (Barbosa & Levy, 2000).

No entanto, sabe-se que os antibióticos podem persistir na natureza, em muitos locais como na água e o solo de forma estável, tendo um efeito pós-utilização muito duradouro, devido aos detritos excretados pelos animais e resíduos sanitários. Daí a importância de não se instituir antibióticos para uso humano na promoção do crescimento veterinário (Barbosa & Levy, 2000).

Se se proporcionarem condições para uma presença constante de concentrações sub-terapêuticas e sub-inibitórias de antibiótico numa determinada população bacteriana, esta situação irá conduzir à selecção da resistência (Barbosa & Levy, 2000). Esta é a situação típica do ambiente hospitalar e em particular da UCI.

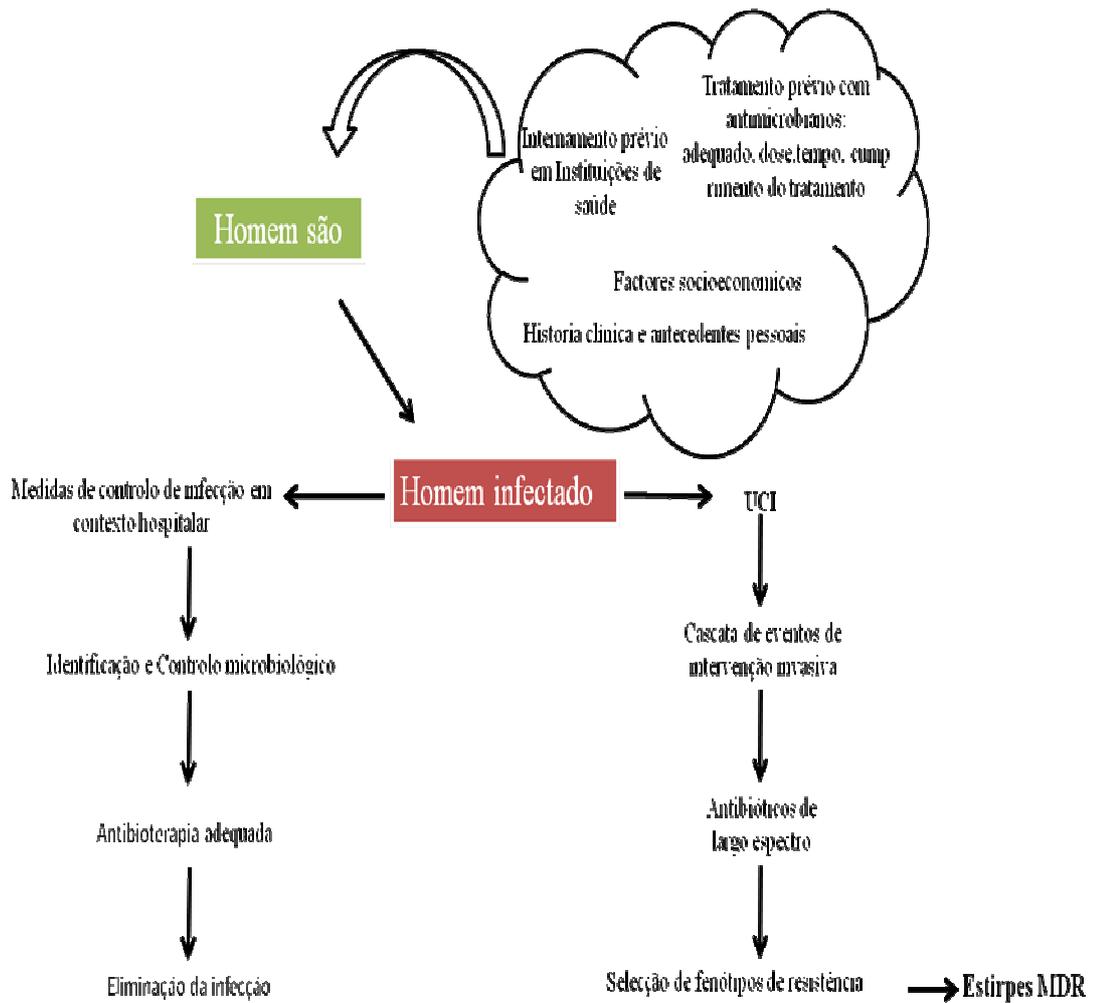


Figura I.1 - Eventos para a multirresistência aos antibióticos. Legenda: UCI- Unidade de Cuidados Intensivos; MDR- Multirresistentes.

Jones *et al* (2004) demonstrou num estudo de vigilância europeu e norte-americano de emergência da resistência em bactérias em UCI entre 2000 e 2002, que houve um aumento na resistência às fluoroquinolonas entre várias espécies Gram-negativas, devido ao seu uso indiscriminado, embora com variações entre países.

Especificamente na actualidade, assiste-se a um aumento gradual da resistência nas UCIs às fluoroquinolonas nas bactérias Gram-negativas de doentes internados nestas unidades, devido ao abuso destes fármacos, constituindo as *Enterobacteriaceae* cerca de 30% dos isolados com significância clínica em UCIs, embora a estatística não seja homogénea entre países (Jones *et al*, 2004).

O principal microrganismo causador de infecções sistémicas é *E. coli* com 5% de frequência, segundo dados do *Centers for Disease Control* (CDC), sendo esta bactéria uma das mais comuns causas de infecção nos doentes hospitalizados (Karam & Heffner, 2000).

Na comunidade este agente é o responsável pela maior parte das infecções urinárias, e observa-se um grande aumento de estirpes multirresistentes, o que torna difícil o seu tratamento. Estima-se que em cerca de 11% das mulheres nos Estados Unidos é-lhes diagnosticado pelo menos uma infecção do tracto urinário por ano, sendo a probabilidade de ocorrência deste tipo de infecção ao longo da vida, cerca de 60% (Manges *et al*, 2001).

Num estudo realizado num hospital de referência em Oman (*Royal Hospital*), com o principal objectivo de descrever a prevalência de resistência aos antibióticos entre bactérias Gram-negativas em relação ao uso de antibióticos numa UCI, observou-se que entre os microrganismos mais comuns encontrava-se *E. coli* em terceiro lugar com 13 isolados em 100 amostras colhidas, sendo 7 destas provenientes de infecções urinárias (Al-Lawati, Crouch, Elhag, 2000).

Em outro estudo realizado entre 1986 e 1997, verificou-se que *E. coli*, era uma das quatro principais espécies de agentes causadores de infecção associada aos cuidados de saúde, e no que diz respeito às infecções do tracto urinário, era o primeiro agente com cerca de 19.2% (Weber, Raasch, Rutala, 1999).

Por esta razão, torna-se premente estudar as infecções causadas por esta bactéria comensal, que quando pressionada pelos antibióticos facilmente adquire fenótipos de multirresistência colocando grandes dificuldades ao seu tratamento e erradicação.

2.As *Enterobacteriaceae* e *Escherichia coli*

As *Enterobacteriaceae* são um grupo heterogéneo de bacilos Gram-negativos que constituem uma família onde se incluem géneros e espécies clinicamente importantes, algumas das quais sempre associadas a infecções graves como *Salmonella typhi*, *Shigella spp.*, *Yersinia pestis*, e outras pertencentes à flora comensal como a *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *E. coli*, que podem ainda causar infecções oportunistas.

E. coli foi descrita pela primeira vez por Theodor Escherich em 1885 como *Bacterium coli commune*, que a isolou nas fezes de recém-nascidos, tendo-se depois atribuído o nome pelo qual até hoje é conhecida (Brooks *et al*, 2005). *E. coli* faz parte da flora normal do tracto gastrointestinal animal, em conjunto com outras bactérias entéricas, não sendo por norma causadora de doenças, facilitando o normal funcionamento intestinal e nutrição.

Como características bioquímicas salienta-se serem todas fermentadoras da glucose, oxidase negativas, catalase positivas e reduzem os nitratos a nitritos. Podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos, móveis ou imóveis e com distribuição ubiqüitária. É anaeróbia facultativa, ou seja, pode crescer na presença ou ausência de oxigénio, são bacilos com cerca de 1 µm de diâmetro e 2 a 6 µm de comprimento, sendo geralmente móveis por flagelos peritricos, e possuem adesinas o que lhes permite aderir à mucosa intestinal (Brooks *et al*, 2005). O genoma de *E. coli* é conhecido na totalidade desde 1997. Não apresenta requerimentos de crescimento adaptando-se bem a diferentes habitats (aeróbios ou anaeróbios), podendo transformar metabolicamente glucose nos componentes macro-moleculares que constituem a célula.

Em relação à sua estrutura, caracteriza-se pela elevada quantidade de ribossomas o que lhe confere um elevado nível metabólico. A sua parede celular é constituída por duas membranas (citoplasmática e externa) com uma camada intermédia de peptidoglicano que confere rigidez e forma à célula (Figura I.2). A membrana externa é constituída por lípidos, proteínas e lipopolissacáridos (LPS), e é responsável pela impermeabilidade da bactéria a muitos compostos tóxicos, enquanto a membrana citoplasmática é a camada mais interna, seguida pelo espaço periplasmático onde se encontram as moléculas que sofrem selecção de entrada/saída da célula, existindo neste espaço alta actividade enzimática (Prescott, Harley, Klein, 1999).

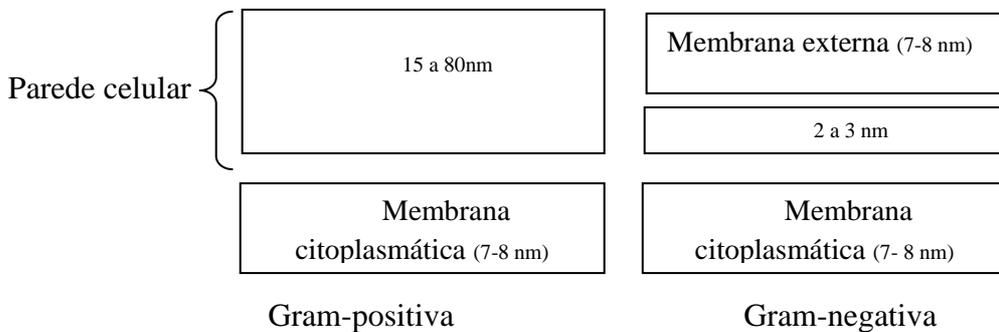


Figura I.2 - Esquema representativo da parede celular em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Na membrana externa também é possível observar pequenos canais hidrofílicos, denominados porinas e também designadas por Omps (*outer membrane proteins*), destacando-se a OmpC e a OmpF, constituídas por cilindros de 16 folhas β , formando um poro transmembranar na membrana externa (Nikaido, 2003). Nem todas as Omps têm funções de transporte mas as porinas têm a sua expressão e actividade relacionada com as condições nutritivas e ambientais existentes, havendo um aumento desta expressão o que conduz à entrada de substâncias nutritivas, e a uma diminuição para evitar a entrada de substâncias nocivas (Viveiros *et al*, 2007).

Entre os antígenos da parede celular, encontra-se o antígeno O (lipopolissacárido-estrutura antigénica da bactéria), K ou Vi (proteínas ou lipopolissacárido da cápsula que previne a fagocitose), H (proteínas flagelares), classificação esta que permite diferenciar serotipos e constituem os factores de virulência destas estirpes bacterianas, assim como as toxinas e as fímbrias (ligação e persistência) (Brooks *et al*, 2001).

Esta bactéria apresenta vários mecanismos de sobrevivência, em ambientes adversos como por exemplo, consegue variar a sua estrutura e comportamento sendo sensível aos químicos, pH, temperatura, osmolaridade, entre outros factores. As alterações estruturais incluem o desenvolvimento de fímbrias para se fixarem a uma célula ou receptor, variação do diâmetro das porinas para permitir a entrada de moléculas maiores para a sua nutrição, ou ainda sintetizar enzimas para excluir determinados compostos tóxicos (Brooks *et al*, 2005).

Apesar de serem bactérias habitualmente comensais da flora humana, quando estas invadem locais não habituais para a sua existência, podem ser causadoras de infecções, produzindo várias manifestações não específicas de acordo com o local. Assim clinicamente, os locais de infecção mais comuns são: o tracto urinário e o tracto gastrointestinal, podendo ocasionalmente provocar doença sistémica (sepsis) sobretudo em meio hospitalar e em doentes imunossuprimidos (Brooks *et al*, 2005).

No caso das infecções do tracto urinário, *E. coli* é responsável por cerca de 90% das primeiras infecções em mulheres jovens e causa sintomatologia específica que inclui disúria, hematúria, poliúria e dor nos flancos o que pode indicar infecção das vias urinárias superiores. Também são causadoras de infecções urinárias em UCI (Brooks *et al*, 2005).

No que diz respeito às infecções do tracto gastrointestinal salientamos 5 classes (serotipos), são eles (Brooks *et al*, 2005):

- *E. coli* **enteropatogénica (EPEC)**, responsável pela diarreia em lactentes, principalmente em países em desenvolvimento, provocando diarreia aquosa normalmente auto limitada.

- *E. coli* **enterotoxigénica (ETEC)**, mais frequentemente designada como “diarreia do viajante”.

- *E. coli* **enterohemorrágica (EHEC)**, que está associada à colite hemorrágica, síndrome hemolítico-urémico, anemia hemolítica microangiopática e trombocitopénia.

- *E. coli* **enteroinvasiva (EIEC)**, que provoca patologia semelhante à shigelose.

- *E. coli* **enteroagregativa (EAEC)** que conduz à diarreia crónica e aguda, em países em desenvolvimento mas também transmitida por alimentos em países industrializados.

A via de transmissão das estirpes patogénicas de *E. coli* causadoras de sintomatologia intestinal, é sobretudo alimentar, enquanto as infecções sistémicas devem-se sobretudo a uma infecção oportunista associada ao estado imunológico do indivíduo, ou ainda à patologia de base. Por vezes doentes submetidos a tratamento cirúrgico abdominal podem desencadear um quadro de abdómen agudo com a proliferação de bactérias entéricas pelo organismo. O tratamento destes quadros clínicos, encontra-se sobretudo a cargo de antibioterapia, no entanto, a susceptibilidade destes microrganismos é muito variável, e é mandatório a realização do antibiograma para uma terapêutica mais dirigida.

Em relação ao diagnóstico laboratorial, as estirpes de *E. coli* são isoladas normalmente em meios selectivos como o meio de MacConkey, entre outros. A sua identificação pode ser feita através de testes bioquímicos com kits comerciais (API 20 E) ou automatizados (VITEK). A utilização da coloração Gram é comum, mas é pouco sensível. Este método foi proposto por Christian Gram em 1884, para categorizar as

bactérias na base das diferenças estruturais da sua parede celular, sendo as Gram-positivas as bactérias que ficam coradas com uma coloração roxo escura e as Gram-negativas coradas de vermelho vivo, devido às diferenças de espessura das suas camadas de peptidoglicano (Figura I.3) (Brooks *et al*, 2005).

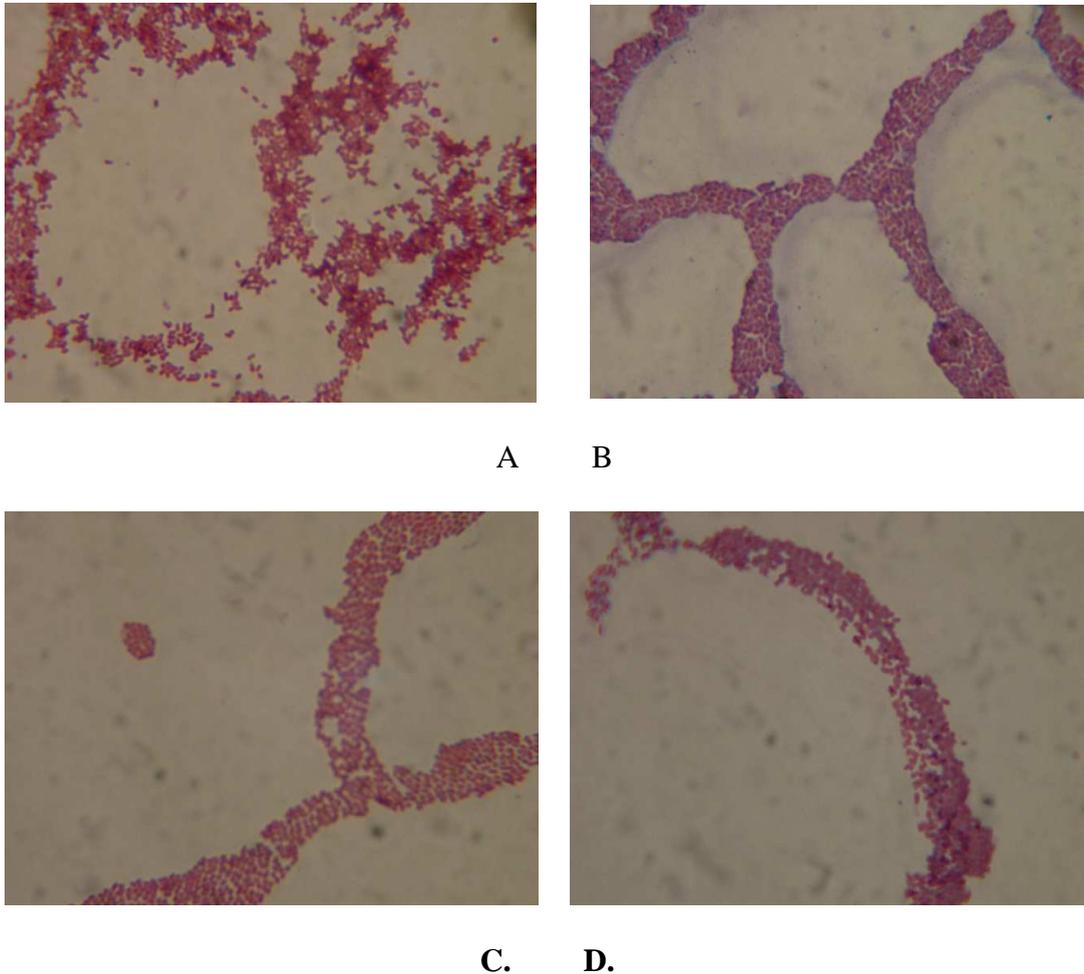


Figura I.3 - Coloração de Gram de estirpes clínicas de *E. coli* estudadas neste trabalho cedidas pelo Hospital dos SAMS, Lisboa. A. (5) Isolada em hemocultura. B. (16) Isolada em hemocultura. C. (13) Hemocultura. D. (19) Urina.

Entre os antibióticos disponíveis para o tratamento de infeções urinárias e em particular causadas por *E. coli*, os que mais são prescritos na clínica são, as sulfonamidas, fluoroquinolonas, ampicilina, cefalosporinas e aminoglicosídeos (Brooks *et al*, 2005). A maior parte dos antibióticos são excretados na urina, assim sendo, diferentes regimes podem ser usados para curar as infeções urinárias. O antibiótico

mais comum para o tratamento das cistites é uma combinação de sulfonamida e trimetoprim (TMP), e ainda amoxicilina, ciprofloxacina (CIP) e outras quinolonas.

No entanto, a amoxicilina hoje em dia tem-se tornado ineficaz no combate às infecções urinárias, pelos padrões de resistência observados em infecções causadas por *E. coli*. Os aminoglicosídeos e as cefalosporinas são também frequentemente utilizados na prática clínica. Tem-se provado que regimes terapêuticos de longa duração, são tão efectivos como os de curta duração (3 dias). O uso de antibióticos endovenosos apenas se justifica em casos de infecção grave das vias urinárias como o caso da pielonefrite ou prostatite (Brooks *et al*, 2005).

3. Antibióticos e mecanismos responsáveis pela multirresistência

Entre 1940 e 1960, foram descobertos inúmeros antibióticos de forma empírica, sem pré-selecção dos alvos, tendo sido utilizados para a monoterapia sistémica e a partir destes, novos compostos foram desenvolvidos. No entanto, a falta de conhecimento dos mecanismos de acção e de actuação destes compostos, conduziu ao aparecimento de toxicidade, espectro de acção reduzido ou desenvolvimento de resistências, e assim muitos destes compostos foram excluídos da sua utilidade clínica, ou apenas utilizados em esquemas terapêuticos combinados ou em uso tópico (Silver, 2007). Ao longo do tempo, a resistência aos antibióticos tem vindo a aumentar, o que tem conduzido à total ineficácia de alguns dos antibióticos para combater as infecções.

Para que se possam compreender os mecanismos de resistência, tem que se compreender como é que os antibióticos actuam. Assim, apresenta-se na Tabela I. 2, um resumo dos mecanismos de acção e respectiva resistência aos antibióticos.

Mecanismos de ação dos antibióticos	Mecanismos de resistência	Referências
<p><u>Interferência na síntese da parede celular:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - β-lactâmicos, penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactâmicos - Glicopéptidos: vancomicina, teicoplanina 	<p>Redução da afinidade das PBPs (penicilin binding proteins) pelo antibiótico;</p> <p>Produção de β-lactamases</p>	<p>Blanc <i>et al</i>, 2006 Briñas <i>et al</i>, 2005 Fluit, Visser, Schmidz, 2001 Paterson, 2006 Samaha & Araj, 2003</p>
<p><u>Inibição da síntese proteica:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Ligação à subunidade 50S ribossomal: macrólidos, cloranfenicol, clindamicina, linezolid. - Ligação à subunidade 30S ribossomal: aminoglicosídeos, tetraciclina. -Ligação à <i>tRNA_sintetase</i> (RNA transferência): mupirocina. 	<ul style="list-style-type: none"> - Impermeabilidade da membrana celular (efluxo) - (macrólidos). - Produção de enzimas que provocam alterações estruturais no antibiótico, efluxo (aminoglicosídeos). - Alteração da permeabilidade celular (efluxo) – tetraciclina. 	<p>Chollet, Chevalier, Bryskier, Pâges, 2004</p> <p>Fluit, Visser, Schmidz, 2001</p> <p>Retsema & FU, 2001</p> <p>Bambeke, Pâges, Lee, 2006</p> <p>Davies & Wright, 1997</p>
<p><u>Interferência na síntese dos ácidos nucleicos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Inibição da síntese do DNA: fluoroquinolonas. - Inibição de síntese RNA: rifampicina. 	<p>Mutações no gene que codifica a enzima DNA girase e topoisomerase IV</p> <p>Modificação da permeabilidade celular (efluxo/porinas).</p>	<p>Collignon & Angulo, 2006</p> <p>Fluit, Visser, Schmidz 2001</p> <p>Li, 2005</p> <p>Paterson, 2006</p>
<p>Inibição de vias metabólicas: sulfonamidas, inibição da síntese de ácido fólico.</p>	<p>Mutações no gene associado à síntese de ácido fólico (enzima DHPS (dihidropteroato sintetase). Plasmídeos com genes codificantes DHPS que são resistentes às sulfamidas.</p>	<p>Skold, 2000</p>
<p>Disrupção da estrutura membranar bacteriana: daptomicina (polimixinas).</p>	<p>Modificação estrutural da parede celular quer por mutação, quer por adaptação.</p>	<p>Falagas & Kasiakou, 2005</p>

Tabela I. 2 – Mecanismos de resistência aos antibióticos. Adaptado de Tenover, 2006. Mechanisms of antimicrobial Resistance in Bacteria vol, 119, S5.

Do ponto de vista da aquisição dos mecanismos de resistência anteriormente expostos, existem duas formas de estes emergirem nas populações bacterianas infectantes: por aumento da resistência intrínseca (mecanismos de resistência fisiológica e genética inatos à bactéria) e por resistência adquirida (aquisição de informação genética nova na forma de determinantes genéticos para a resistência) (Anderson, 2004).

No que diz respeito à resistência intrínseca, esta pode ser aumentada impedindo o antibiótico de entrar na célula, não se incluindo neste tipo de resistência as mutações cromossómicas ou a aquisição de elementos genéticos móveis, mas sim, o controlo através da permeabilidade da membrana externa e das bombas de efluxo (BE) que expõem o antibiótico do interior da célula (Anderson, 2004). Exemplo clássico deste tipo de resistência é a eficácia da membrana externa das bactérias Gram-negativas que atrasa o influxo de vários antibióticos, detergentes e corantes através da sua impermeabilidade estrutural e da actividade das BEs. As BEs são responsáveis pela extrusão do antibiótico ou qualquer agente nocivo para a bactéria do espaço periplasmático para o ambiente, permitindo a sua sobrevivência (Viveiros *et al*, 2007) ou ainda a sobre-expressão de enzimas de degradação permite a viabilidade da célula bacteriana (Silver, 2007).

Pode-se definir este tipo de resistência como sendo inata e presente em todas as estirpes dentro da mesma espécie bacteriana, para uma ou mais classes de antibióticos (Tenover, 2006).

Por exemplo, a inactivação do antibiótico é o principal mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, sendo a sua inactivação mediada pelas penicilinasas que promovem a catálise da hidrólise do anel β -lactâmico (Spratt, 1994). Existem outras enzimas que promovem a inactivação do antibiótico como as transferases no caso do

cloranfenicol (Alton & Vapnek, 1979) e as enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos (Chevereau *et al*, 1974).

A protecção da bactéria pela alteração do alvo do antibiótico pode impedir a sua interacção estando estas alterações relacionadas com substituições de aminoácidos, o que diminui a afinidade dos antibióticos. Por exemplo, a resistência à penicilina pode ser devida a alterações nas *Penicilin Binding Proteins* (PBPs) formando complexos irreversíveis impedindo a síntese do peptidoglicano (Spratt, 1994). Modificações nos ribossomas podem tornar as bactérias menos susceptíveis aos antibióticos, como no caso da resistência à eritromicina e tetraciclina (Takata *et al*, 1970; Speer *et al*, 1992).

Como já referido anteriormente, a principal barreira que impede a entrada de muitos antibióticos é a membrana celular, que se torna mais difícil de ultrapassar no caso da membrana das bactérias Gram-negativas, enquanto a espessa camada de peptidoglicano das bactérias Gram-positivas é menos efectiva. Existem alterações membranares como a quantidade de porinas e lipopolissacáridos na membrana externa que potenciam a resistência aos antibióticos, embora não evitem totalmente a sua entrada (Jarlier & Nikaido, 1994).

Por outro lado, a extrusão activa dos antibióticos conduz à redução da concentração citoplasmática do antibiótico e aumenta a sua resistência intrínseca (Levy, 1992). Em estudos onde se recorreu a isolados clínicos como tentativa de demonstrar o efeito do uso de antibióticos em doentes ao nível da flora comensal e emergência da resistência, observou-se que isolados fecais de uma determinada espécie, tinham uma resistência elevada às fluoroquinolonas comparativamente a outros isolados da mesma espécie a partir de outras localizações, como por exemplo da pele. Estes resultados foram explicados pelo facto de grande parte das fluoroquinolonas ligarem-se a diversos

compostos nas fezes, o que provoca a manutenção de uma concentração reduzida do antibiótico nestes locais.

Assim, foi hipotetizado que exista uma mais forte selecção para a resistência nas fezes do que na transpiração porque a bactéria é exposta à janela selectiva de concentrações sub-inibitórias de antibiótico por um período de tempo longo, entendendo-se como janela selectiva, o período em que a concentração de antibiótico é elevada o suficiente para eliminar a flora susceptível (Gustafsson *et al*, 2003). Assim existem 4 mecanismos gerais que são responsáveis pela resistência aos antibióticos em bactérias (Figura I.4):

- Produção de enzimas responsáveis pela inactivação de antibióticos pela hidrólise destes, (1)
- Alteração do alvo celular por mutação ou modificação enzimática, reduzindo a apetência deste alvo para o antibiótico, (2)
- Inibição da entrada do antibiótico na célula (permeabilidade da célula bacteriana), (3)
- Presença das BEs. (4)

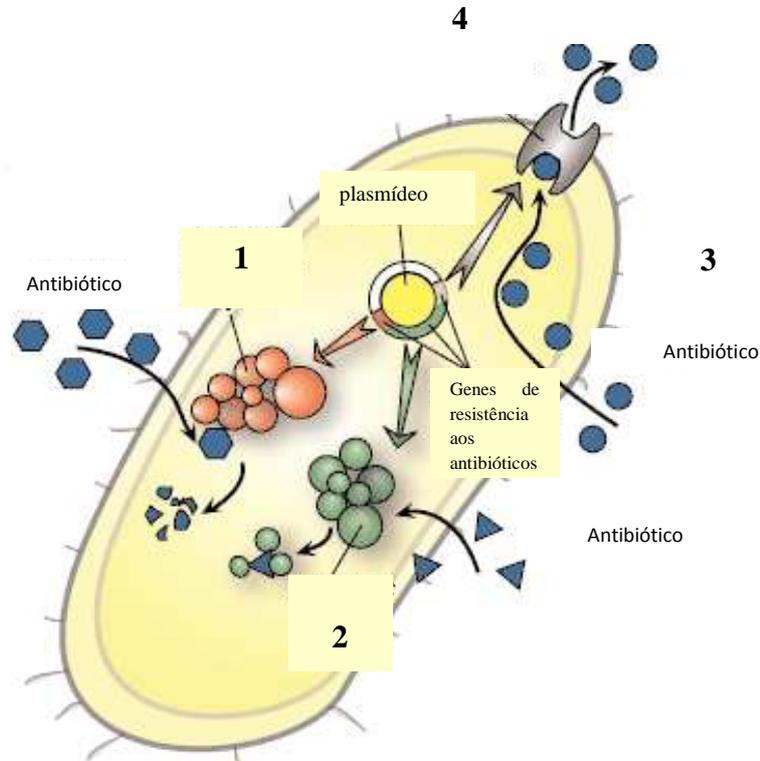


Figura I.4 - Mecanismos de resistência aos antibióticos em bactérias. Adaptado: Andersson, 2004. The Ways in which bacteria resist antibiotics, 1.

É possível que os microrganismos desenvolvam um fenótipo de MDR através da sobre-expressão de BEs, que bombeiam uma grande variedade de antibióticos de diferentes classes. Este fenómeno é hoje reconhecido como responsável pela multirresistência em muitos isolados clínicos com ou sem determinantes genéticos conhecidos para a resistência às diferentes classes de antibióticos (Viveiros *et al*, 2007). Este fenómeno está também associado à redução da entrada dos antibióticos na célula, através da redução no número de porinas e também pela alteração das características da membrana externa, levando à diminuição da entrada dos compostos tóxicos para a bactéria, não os impedindo totalmente, podendo este efeito ser sinérgico com a tarefa executada pelas BEs (Hooper, 2005).

A membrana externa, sendo composta por uma bicamada fosfolipídica e de lipopolissacáridos, é selectiva quanto às moléculas que permite entrar, sendo mais permeável à passagem através das porinas, dos compostos hidrofílicos, enquanto os agentes hidrofóbicos são excluídos pelas proteínas desta membrana (Figura I.5).

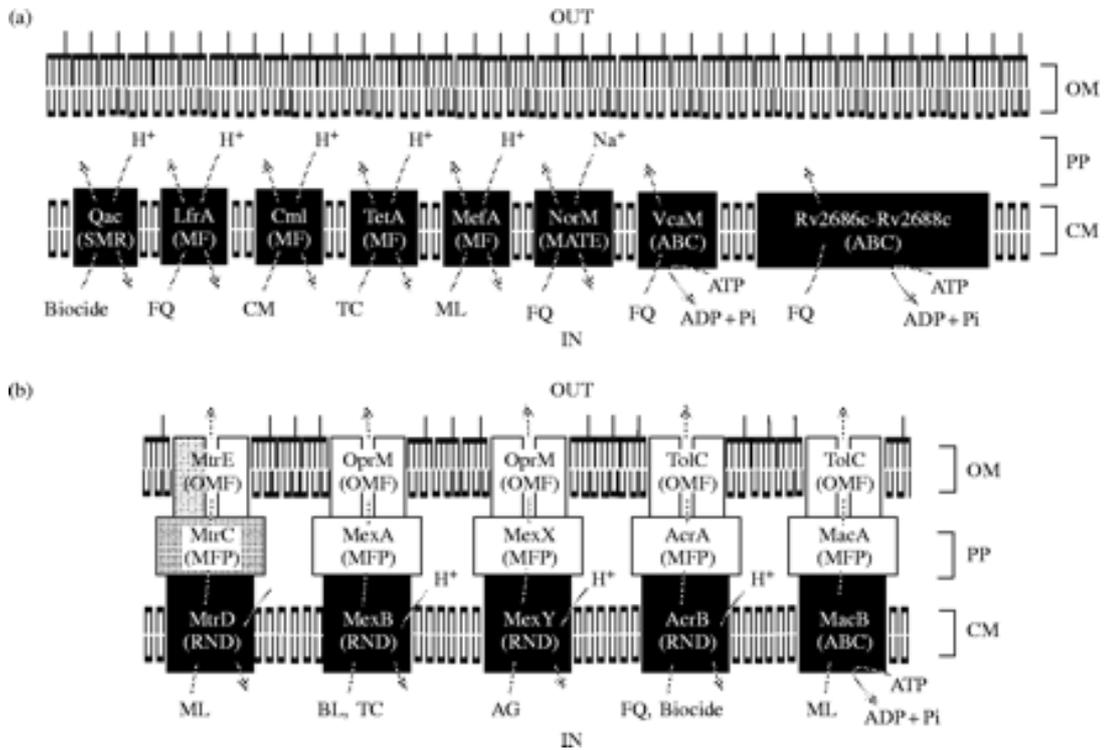


Figura I. 5 - Representação esquemática dos sistemas exportadores de compostos em bactérias Gram-negativas. **a)** Bombas localizadas na membrana citoplasmática. **b)** Bombas de efluxo na parede celular. FQ, fluoroquinolona, CM, cloranfenicol, TC, tetraciclina, ML, macrólidos, BL, β -lactâmicos. Adaptado de Poole, 2005, Efflux-mediated antimicrobial resistance, 56, 20-51.

A resistência adquirida baseia-se na aquisição de material genético através de mecanismos de conjugação, transformação ou transdução (Barbosa & Levy, 2000). A conjugação diz respeito à passagem de plasmídios que contenham genes de resistência para uma bactéria adjacente, através de uma estrutura designada por *pilus* que liga as duas bactérias. Por outro lado, o fenómeno da transdução é devido à passagem de elementos de resistência, via bacteriófagos (vírus bacterianos), e a transformação é um

processo em que a bactéria adquire e incorpora segmentos de outras bactérias no seu DNA, pela sua captura do ambiente aquando da lise celular de bactérias resistentes (Barbosa & Levy, 2000).

Este processo também se designa por evolução horizontal, ocorrendo entre estirpes da mesma espécie ou entre espécies bacterianas diferentes. A transferência de material genético pode ocorrer devido à presença de plasmídeos, transposões e cassetes génicas.

A evolução vertical deve-se a mutações cromossómicas, que se desenvolvem na presença do antibiótico, eliminando alguns indivíduos de uma população mas permitindo que outros sobrevivam, ou seja, aqueles que apresentem mutações que confirmam resistência a determinado antibiótico (Tenover, 2006).

4. Multirresistência por sistemas de efluxo. A estrutura dos sistemas de efluxo parietal em bactérias e sua caracterização bioquímica.

Entre os mecanismos de resistência anteriormente descritos, encontra-se a multirresistência por sistemas de efluxo, sendo este o objectivo de estudo deste trabalho.

As BEs são proteínas que se encontram presentes em todos os organismos, embora quando se encontram sobre-expressas, tornam-se poderosos mecanismos de resistência aos antibióticos. As primeiras BEs a serem descritas foram as bombas Tet, que bombeiam especificamente tetraciclina e são codificadas por genes que se podem encontrar no cromossoma ou em plasmídeos em *E. coli*. Os genes mais comuns são *tetB* e *tetA* (Levy, McMurry, Petrucci 1980). O influxo da tetraciclina pelos membros da família *Enterobacteriaceae* é bifásico, sendo uma fase inicial independente de energia, em que o antibiótico se liga à superfície da célula e passa por difusão de forma rápida pelas camadas externas da célula. Numa fase secundária dependente de energia, a

tetraciclina atravessa a membrana citoplasmática, talvez pela força motriz de prótons ou pelo potencial prótonico, pois este transporte específico ainda não foi identificado. A resistência à tetraciclina é devida à diminuição nos níveis de acumulação do antibiótico por diminuição do influxo e aumento do efluxo podendo ambos participar em simultâneo. Este é um problema major porque se localiza em plasmídeos na proximidade de locais de inserção, podendo as bactérias adquirir outro tipo de informação genética e aumentar assim o espectro da sua resistência. Esta resistência pode ser transferida em plasmídeos intra e inter espécies (Chopra, 2001).

O conhecimento destas BEs permitiu assim entender o mecanismo de resistência e a especificidade de determinadas BEs e os seus compostos alvo, tendo sido identificadas nove BEs em *E. coli* (dependentes de energia), muitas delas designadas como transportadores/BE MDR, podendo bombear uma grande variedade de compostos sem relação aparente (Paulsen *et al*, 1996).

Algumas das BEs não são apenas responsáveis pela extrusão de antibióticos mas também compostos como a hemolisina em *E. coli* (TolC) (Pidcock, 2006), ou esteróides como a progesterona e o cortisol, que são substratos de AcrAB-TolC de *E. coli*, ou ainda exportar adesinas, toxinas e outras proteínas importantes para a colonização e infecção de células humanas e animais (Elkins & Mullins, 2006).

Com base no critério bioenergético e estrutural, as BEs podem ser catalogadas em duas grandes classes: *secondary multidrug transporters*, que utilizam o gradiente transmembranar electroquímico de prótons e sódio, para conduzir os antibióticos para fora da célula, e as *ATP (adenosina trifosfato) binding cassette superfamily* (ABC), que usam a energia da hidrólise de ATP, constituindo os sistemas de transporte primários (Lage, 2003).

Os transportadores da classe *ATP-binding cassette superfamily* (ABC) são complexos multi-proteicos (formando um canal de transporte pela membrana citoplasmática) e proteínas citoplasmáticas com actividade de ATPases, envolvidos no efluxo de toxinas, metabolitos e antibióticos (Figura I.6). Um dos transportadores ABC mais bem estudados é a P-glicoproteína dos mamíferos (P-gp, MDR1), cuja sobre-expressão confere resistência aos compostos citotóxicos usados na quimioterapia (Lage, 2003).

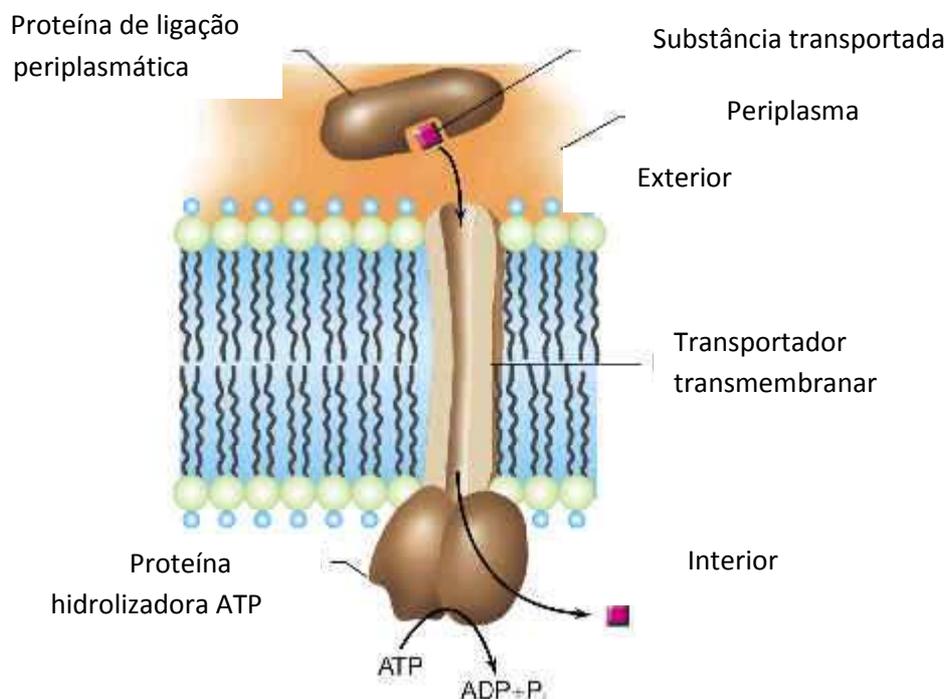


Figura I.6 - Sistema ABC em bactérias Gram-negativas. Adaptado de www.ugr.es.

Os transportadores da classe dos *secondary multidrug transporters* englobam quatro famílias fundamentais de BEs (Putman *et al*, 2000):

- 1-*Major facilitator superfamily* (MFS),
- 2-*Multidrug and toxic compound extrusion family* (MATE),
- 3-*Small multidrug resistance family* (SMR),
- 4-*Resistance nodulation division family* (RND).

A sua caracterização estrutural e bioquímica depende do número de regiões transmembranares proteicas, número de componentes da bomba, da fonte de energia utilizada e do tipo de substratos que a bomba exporta. Assim temos:

1. *Major facilitator superfamily* (MFS)

As proteínas transmembranares que pertencem a esta família participam no simporte, antiporte e uniporte de vários substratos, como açúcares, oligossacarídeos e antibióticos (Saier *et al*, 1999). As proteínas de membrana interna das BEs pertencendo a esta superfamília, apresentam normalmente 12 ou 14 segmentos transmembranares (*transmembranar segments* - TMS), dividindo-se assim em duas subfamílias. As com 12 TMS apresentam aproximadamente 400 aminoácidos e formam um arranjo de 12 hélices membranares com um *loop* citoplasmático entre as hélices 6 e 7, e um segundo grupo, mais pequeno destes transportadores que apresentam uma topologia de 14 hélices com um *loop* citoplasmático inferior (Saier *et al*, 1999).

São descritas como bombas com um único componente, no entanto podem funcionar associadas a outras proteínas como é o caso da EmrAB-TolC em *E. coli*, que é o transportador mais importante da família MFS para esta espécie (Lomovskaya & Lewis, 1990).

Outros importantes transportadores da família MFS de *E. coli* são o MdfA (Cmr), que é descrito como sendo responsável pela resistência ao cloranfenicol e a uma grande variedade de compostos com carga positiva e neutra (Edgar & Bibi, 1997; Nilsen, Bakke, Vader, Olsvik, El- Gewely, 1996), e o EmrD, que está envolvido na resposta adaptativa de choque de baixa energia. A expressão do EmrD confere protecção a desacopladores como o *carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone* (CCCP), que é

responsável por dissipar o gradiente de prótons membranar, inibindo o efluxo, mas não afecta a resistência ao cloranfenicol ou às fluoroquinolonas (Nagata, 1995).

Acessoriamente e ainda mal descritos temos os transportadores EmrB de 513 aminoácidos e o EmrA, que é uma proteína membranar de fusão com 42.7 kDa, tidos como responsáveis por conferir resistência a desacopladores e antibióticos (Furukawa, Jackowski, Takamura, Rock, 1993; Lomovskaya & Lewis, 1992).

Um grupo importante da família MFS é os transportadores Tet, em que já foram descritos 10 tipos diferentes, codificados por determinantes genéticos transportados por plasmídeos e transposões (Yin *et al*, 2000, Butaye 2003).

As BEs dividem-se em seis grupos, sendo esta divisão baseada na sequência de aminoácidos. Assim sendo, no grupo 1 encontra-se Tet(A), Tet(B), Tet(C), Tet(D), e Tet(E), onde é possível identificar semelhanças a nível dos aminoácidos (Roberts, 2005). A maior parte das BEs Tet conferem resistência apenas à tetraciclina, no entanto, *tet* (B), permite a extrusão de tetraciclina e minociclina (Petersen; Jacobus; Weiss; Sum; Testa; 1999).

Transportadores MDR de *E. coli* da família *Major facilitator superfamily* (MFS):

- Bcr (Bentley, Hyatt, Aimley, Parish, Herbert, White, 1993)
- EmrD (Naroditskaya, Schlosser, Fang, Lewis, 1993)
- MdfA (Cmr/Cm1A) (Edgar & Bibi, 1997; Nilsen, Bakke, Vader, Olsvik, El-Gewely, 1996)
- EmrB (Lomovskaya & Lewis, 1992)
- TetA (B) Tet(A), Tet(B), Tet(C), Tet(D), Tet(E), Tet(G), Tet(H), Tet(J), Tet(Y), Tet(Z), (Yin *et al*, 2000, Butaye 2003)

2. Multidrug and toxic-compound extrusion family (MATE)

Inicialmente, as proteínas pertencentes a esta família foram identificadas como fazendo parte da superfamília MFS, contudo não apresentam uma homologia de sequência com as proteínas desta família. Fazem parte desta classe, o transportador YdhE para a *E. coli*, que é homólogo de NorM de *Vibrio parahaemolyticus*, que por sua vez é responsável pela resistência a corantes, fluoroquinolonas hidrofílicas e aminoglicosídeos (Morita *et al*, 1998).

Estas proteínas são constituídas por cerca de 450 resíduos de aminoácidos e contêm 12 TMS. As proteínas pertencentes a esta família usam o gradiente de sódio como fonte de energia para efluxar as fluoroquinolonas e corantes (Morita *et al*, 1998). Pouco mais se sabe acerca da estrutura desta família, mas pensa-se que têm importância no que diz respeito à resistência a fluoroquinolonas.

3. Small multidrug resistance family (SMR)

São constituídos tipicamente por cerca de 107 resíduos de aminoácidos e 4 TMS, e devido ao seu tamanho, estas proteínas funcionam como tetrâmeros (Ma & Chang, 2004). A fonte de energia é a força motriz de prótons (Kumar & Schweizer, 2005). A proteína EmrE (MvrC) (Morimyo, Hongo, Hama-Inaba, Machida, 1992) é a melhor representante desta família em *E. coli* sendo responsável pela extrusão de brometo de etídeo (EtBr) e compostos relacionados. Um segundo elemento ainda mal estudado é a proteína de 36 kDa com 10 TMS codificada pelo gene *tehA*, que também é responsável pelo transporte de EtBr. A proteína TehA apenas contém uma das três regiões

conservadas da família SMR e é maior que os transportadores desta família, podendo representar um membro distante da mesma (Paulsen *et al*, 1996).

4. *Resistance nodulation division superfamily (RND).*

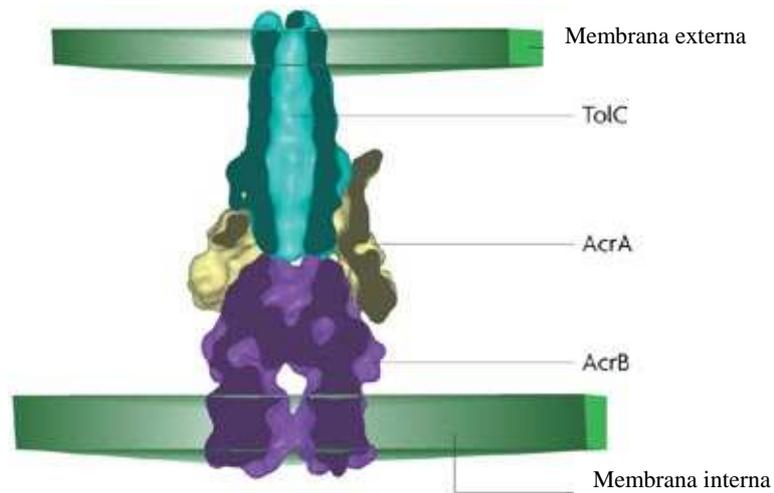
Os transportadores RND são compostos tipicamente constituídos por 1000 resíduos de aminoácidos (Tseng *et al*, 2003) e funcionam formando complexos proteicos, que consistem numa proteína de transporte de membrana com 12 TMS, com funções de facilitação no transporte, uma segunda proteína com papel acessório, proteína de fusão membranar (MPF), e ainda uma OMP que faz a canalização dos substratos para o exterior.

Uma característica destes transportadores é a presença de 2 grandes *loops* periplásmicos entre o TMS 1 e 2, o TMS 7 e 8. A sua estrutura tripartida atravessa todo o envelope celular e exerce um papel sinérgico com a redução da permeabilidade da membrana externa, razão pela qual é uma das famílias de transportadores com mais importância na resistência em estirpes clínicas.

Nas bactérias Gram-negativas, as BEs desta família têm uma importante função na resistência intrínseca a uma grande variedade de fármacos. Observa-se ainda que as bombas da família RND têm uma grande afinidade para os sais biliares, efluxando-os, o que explica a adaptação fisiológica de *E. coli* ao tracto gastrointestinal, uma vez que este habitat apresenta sais biliares (Thanassi *et al*, 1997).

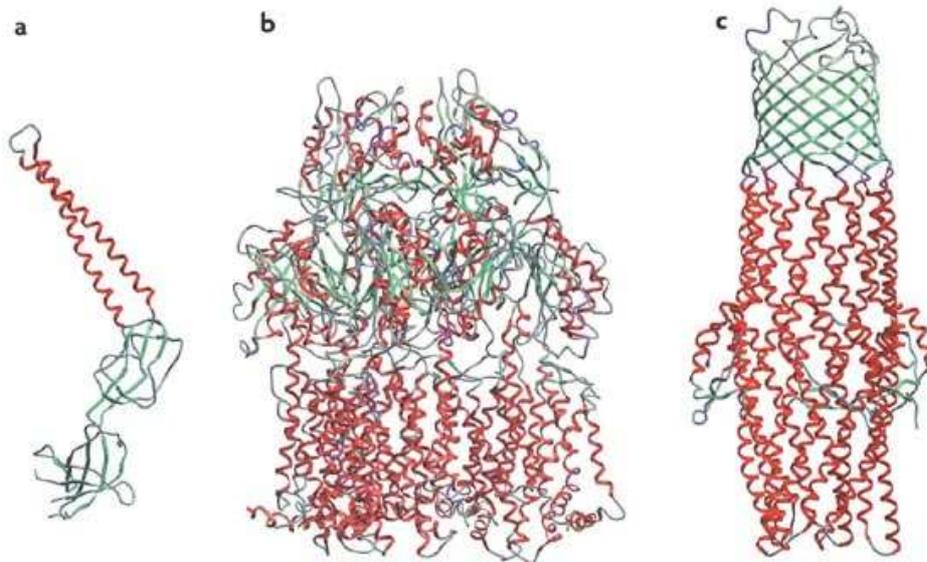
Foram revelados sete transportadores desta família em *E. coli*, cinco dos quais funcionalmente caracterizados, AcrEF, AcrD, YhiUV, MdtABC, AcrAB, todos eles com associação ao canal TolC (Kumar & Schweizer, 2005).

O sistema AcrAB é considerado o sistema multicomponente mais importante de *E. coli* sendo constituído por uma proteína membrana de fusão ou proteína acessória (MFP - *membrane fusion protein*), a AcrA, uma proteína membrana externa ou OMP, a proteína TolC, e uma proteína transportadora com as características clássicas das proteínas da família RND, o transportador AcrB (Kumar & Schweizer, 2005). A AcrA é uma proteína altamente assimétrica e considerada acessória, enquanto que AcrB, é um homotrímero com 12 hélices α , e um grande domínio periplasmático. É tripartido numa região superior em forma de funil, numa região central composta por três vestíbulos e em um domínio inferior em forma de poro (Pidcock, 2006). Em relação à proteína TolC, esta apresenta três promotores que formam um túnel contínuo que atravessa a membrana externa e o espaço periplasmático. Este túnel pode transitoriamente abrir pela interação com um transportador membrana interno energizado, possibilitando a comunicação do citoplasma e o exterior (Putman, Veen, Konings, 2000). A estrutura de TolC é composta por três monómeros, que contribuem com dois resíduos de aspartato para formar um grupo de seis que rodeiam a região portal deste transportador. Mutações a este nível podem conduzir a um alargamento desta região, aumentando assim o efluxo (Andersen *et al*, 2002). Este processo de abertura/encerramento é mediado também por alterações do pH, encerrando com a diminuição deste (Andersen, Koronakis, Hughes, Koronakis, 2002). Inserções de mutações a este nível demonstraram que é necessário este conjunto AcrA-AcrB-TolC para que haja resistência aos antibióticos e outros compostos (Ma, Cook, Alberti, Pon, Nikaido, Hearst, 1995) (Figuras I.7 e I.8).



Nature Reviews | Drug Discovery

Figura I. 7 - Modelo do complexo tripartido de efluxo AcrAB- TolC de *Escherichia coli*. Adaptado: Lomovskaya, Zgurskaya, Totrov, Watkins, 2007. *Waltzing transporters and 'the dance macabre' between humans and bacteria*, 6, 56-65.



Nature Reviews | Drug Discovery

Figura I.8 - Estrutura das proteínas AcrA, AcrB and TolC de *Escherichia coli*. Adaptado: Lomovskaya, Zgurskaya, Totrov, Watkins, 2007. *Waltzing transporters and 'the dance macabre' between humans and bacteria*, 6, 56-65.

Em *E. coli* existem ainda transportadores homólogos do sistema AcrAB que são o *acrEF*, *yhiUV* e ainda o gene *acrD*, este último sendo homólogo do *acrB* e que se crê que opere em conjugação com *acrA* e TolC, na sua função de transportador (Rosenberg, Ma, Nikaido, 2000; Elkins & Nikaido, 2002).

Evidências relatadas demonstram que AcrEF quando inativado, conduz a uma redução da resistência para determinados compostos, detergentes e corantes (Ma, Cook, Alberti, Pon, Nikaido, Hearst, 1993), assim como, mutações em YhiUV conduzem a uma hipersensibilidade a determinados fármacos (Ma, Cook, Hearst, Nikaido, 1994; Ma, Cook, Alberti, Pon, Nikaido, Hearst, 1995).

Os genes *acrEF* e *acrAB* têm semelhanças na especificidade dos substratos, logo estes dois transportadores permitem o intercâmbio das proteínas de fusão de membrana entre os complexos, podendo funcionar em conjunto (*acrA* e *acrF*), necessitando ambos do mesmo canal de membrana externa TolC (Elkins & Nikaido, 2003). Em células de *E. coli* deficientes em AcrEF, a sobre-expressão de AcrA e AcrB é tóxica para as células logo a existência do complexo AcrEF é fundamental para a fisiologia normal das mesmas, mas no entanto, não contribui por si só para a resistência intrínseca a vários antibióticos.

É proposto, que o complexo AcrEF seja importante para a divisão celular, tendo a função de eliminar os produtos tóxicos resultantes da hidrólise no periplasma, logo, a sua expressão é aumentada para conseguir efluxar estas substâncias de forma a não interferir neste processo (Lau & Zgurskaya, 2005).

A bomba AcrD, que necessita de AcrA e TolC para efluxar aminoglicósídeos, sais biliares e novobiocina funciona como BE acessória à AcrAB (Elkins & Nikaido, 2002).

Transportadores MDR de *E. coli* da família RND:

- AcrF (EnvD) (Klein, Henrich, Plapp, 1991)
- YhiV (Ma, Cook, Alberti, Pon, Nikaido, Hearst, 1995)
- AcrB (Ma, Cook, Alberti, Pon, Nikaido, Hearst, 1993)
- AcrD (Rosenberg, Ma, Nikaido, 2000; Elkins & Nikaido, 2002)

No que diz respeito à regulação do operão AcrAB é efectuada pelo repressor AcrR, e sobretudo pelo sistema regulador universal *mar*. O AcrR é um modulador específico secundário da transcrição do AcrAB (Ma, Alberti, Lynch, Nikaido, Hearst, 1996). O regulador universal *mar* (*multiple antibiotic resistance*) compreende os operões *marRAB* e *marC*. MarA conduz à sobre-produção de proteínas do sistema AcrAB-TolC, mas também à diminuição da permeabilidade, através da diminuição da produção de porinas, pela activação do gene *micF*, que por sua vez diminui a expressão de *ompF* (Kumar & Schweizer, 2005; Piddock, 2006; Viveiros *et al*, 2007).

O regulador *quorum-sensing* de *E. coli* SdiA controla a bomba AcrAB, em combinação com os activadores globais de transcrição, MarA, SoxS e Rob (Viveiros *et al*, 2007). O processo de *quorum-sensing* permite a comunicação entre bactérias, e consiste no uso de moléculas químicas. A acumulação de sinais de *quorum-sensing* no meio de cultura inibe a densidade celular. Este processo está associado ao controlo de compostos tóxicos no ambiente, à bioluminescência, expressão de factores de virulência, formação de biofilmes, entrada na fase estacionária, transferência de plasmídeos e formação de esporos (Yang *et al*, 2005).

Assim, o sistema AcrAB-TolC é identificado com sendo o principal mecanismo de efluxo em *E. coli*, apresentando uma amplitude de substratos aos quais pode apresentar resistência como: macrólidos, β -lactâmicos, sais biliares, cloranfenicol, violeta de cristal, EtBr, ácidos gordos, solventes orgânicos, fluoroquinolonas e SDS. É essencial à sobrevivência de *E. coli* e quando se encontra na presença de sais biliares ou de antibióticos, ocorre a sobre-expressão desta bomba (Kumar & Schweizer, 2005; Putman *et al*, 2000).

Na Tabela I.3 encontram-se descritas as principais BEs de *E. coli* e os seus respectivos substratos.

Genes	Família	Substratos das bombas de efluxo	Referências
EmrE (MvrC)	SMR	Tetraciclina, macrólidos, sulfamidas, EtBr, acriflavina,	Morimyo, Hongo, Hama- Inaba, Machida, 1992 Yerushalmi, Lebendiker, Schuldiner, 1995
YdhE (NorE)	MATE	Cloranfenicol, fluoroquinolonas, trimetoprim, canamicina,	Morita <i>et al</i> , 1998 Poole, 2005 Nishino & Yamaguchi, 2001
Tet(A), Tet(B), Tet(C), Tet(D), Tet(E), Tet(G), Tet(H), Tet(J), Tet(Y), Tet(Z)	MFS	Tetraciclina	Butaye, Cloeckert, Schwarz, 2003 Agersø & Guardabassi, 2005 Roberts, 1996
Bcr	MFS	Tetraciclina, sulfamidas	Bentley, Hyatt, Ainley, Parish, Herbert, White, 1993
MdfA	MFS	Aminoglicósidos, tetraciclina, macrólidos, cloranfenicol, rifampicina, fluoroquinolonas, trimetoprim, EtBr, eritromicina, neomicina,	Poole, 2004 Poole, 2000 Yang, Clayton, Zechiedrich, 2003 Nilsen, Bakke, Vader, Olsvik, El-Gewely, 1996 Edgar & Bibi, 1997
YceL	MFS	Fluoroquinolonas	Bambeke, Pàges, Lee, 2006
YidY	MFS	Cloranfenicol	Nishino & Yamaguchi, 2001
emrAB	MFS	Tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas, ácido nalidíxico, CCCP,	Lomovskaya & Lewis, 1992 Bambeke, Pàges, Lee, 2006

Tabela I.3 - Transportadores principais de efluxo e seus respectivos substratos. Adaptado de Bambeke *et al*, 2003; Borges - Walmsley *et al*, 2003.

Genes	Família	Substratos das bombas de efluxo	Referências
emrD	MF	CCCP	Naroditskaya, Schlosser, Fang, Lewis, 1993
YebQ	MFS	Trimetoprim	Nishino & Yamaguchi, 2001
SetA	MFS	Aminoglicósidos	Saier, 2000
Fsr	MFS	Trimetoprim	Nishino & Yamaguchi, 2001
AcrAB- TolC	RND	Penicilinas, ácido fusídico, tetraciclina, oxazolidinonas, macrólidos, rifampicina, EtBr, violeta de cristal, SDS, ácidos biliosos, solventes orgânicos, fluoroquinolonas, trimetoprim, ácido nalídixico	Poole, 2004 Chollet <i>et al</i> , 2004 Jellen-Ritter & Kern, 2001 Fralick, 1996 Ma, Cook, Alberti, Pon, Nikaido, Hearst, 1993
AcrD	RND	Aminoglicósidos	Poole, 2004 Rosenberg, Ma, Nikaido, 2000 Elkins & Nikaido, 2002
AcrEF- TolC	RND	Penicilinas, ácido fusídico, tetraciclina, macrólidos, rifampicina	Ma, Cook, Alberti, Pon, Nikaido, Hearst, 1994 Klein, Henrich, Plapp, 1991
YeGEN	RND	Ácido nalídixico, fluoroquinolonas	Bambeke, Páges, Lee, 2006
YhiUV	RND	Macrólidos	Nishino, Yamaguchi, 2002
MacAB-TolC	ABC	Macrólidos, azitromicina, eritromicina, cloranfenicol,	Kobayashi, Nishino, Yamaguchi, 2001
MsbA	ABC	Transportador major de lípidos do citoplasma para a membrana externa	Chang & Roth, 2001

Tabela I.3 – (Continuação da Tabela anterior) Transportadores principais de efluxo e seus respectivos substratos. Adaptado de Bambeke *et al*, 2003; Borges - Walmsley *et al*, 2003.

Como anteriormente referido, a resistência por sobre-expressão de BEs, constitui uma das causas de resistência encontrada nos isolados clínicos, sobretudo por sobre-expressão de BEs da família RND em *Enterobacteriaceae*.

Por este motivo, torna-se essencial o estudo mais aprofundado destas BEs, da sua estrutura e substratos, de forma a testar novas moléculas que possam vir a constituir novos antibióticos e/ou a restabelecer a eficácia dos antibióticos usados na prática clínica.

Tem-se realizado muitos estudos *in vitro*, onde se utilizam compostos designados como inibidores de BEs (*efflux pump inhibitors* -EPIs), que actuam bloqueando o efluxo e desta forma conduzem a uma redução da concentração mínima inibitória (CMI) para os isolados clínicos MDR em laboratório. O uso destes compostos pode ser importante na reversão da resistência, no entanto, teria que se observar efeito com concentrações não tóxicas para as células eucariotas, o que se tem demonstrado difícil, assim como tem sido difícil encontrar um inibidor específico para todas as bombas que se encontrem sobre-expressas nas estirpes clínicas MDR.

5. Os compostos inibidores de BEs - *efflux pumps inhibitors* (EPIs)

Ao nível do laboratório de microbiologia médica é determinante confirmar quer fenotipicamente, quer genotipicamente a causa da resistência aos antibióticos de forma a antecipar a ocorrência de resistências durante a AB, em particular no caso de resistência devida à actividade de BEs, uma vez que esta situação tende a agravar-se durante a AB, dando lugar a que com maior facilidade surjam estirpes com resistência genética de alto nível que tornam a terapêutica totalmente ineficaz (Bambeke, Glupczynski, Plésiat, Pechère, Tulkens, 2003).

Existem várias estratégias descritas para ultrapassar a resistência aos antibióticos mediada pelo efluxo. Uma dessas estratégias, é a descoberta de novas moléculas, constituindo novos antibióticos, como é o caso da tigeciclina (Wyeth), que ultrapassa a

resistência à tetraciclina, com a vantagem de o agente por si só, ser suficiente para ultrapassar o efluxo, embora mutações possam surgir nos genes responsáveis pelo mesmo (Pankey, 2005).

A inibição do efluxo é outra estratégia levada a cabo pelos inibidores específicos de locais de ligação de substratos, embora ainda se encontrem em fase de optimização. Podem inibir várias BEs que partilhem o mesmo substrato, mas também podem ser específicos para um determinado antibiótico ou ainda, podem ser eles próprios os substratos, podendo necessitar de longo tempo de exposição. A inibição da expressão dos genes responsáveis pela regulação do efluxo é possível, por exemplo tendo como alvo o locus *mar* que regula o sistema AcrAB-TolC (conservado em todos os organismos entéricos) e assim comprometer a expressão do gene em muitas bactérias Gram-negativas.

Por outro lado, estes genes são específicos para cada bomba, logo seriam necessários inibidores para cada uma delas (Alekhshun, 1999). O efeito dos inibidores sobre os genes que regulam a sobre-expressão das bombas é outro mecanismo possível de actuação, como é o caso de *marA* na regulação do sistema AcrAB-TolC em *E. coli* (Poole & Lomovskaya, 2006).

Vários compostos não antibióticos têm sido utilizados no sentido de se obter uma reversão ou diminuição da resistência aos antibióticos. O objectivo do uso destes compostos é o de reverter ou diminuir a resistência com o uso concomitante de antibióticos, potenciando o seu efeito.

Os efeitos desejados do uso dos EPIs são:

- Diminuição da resistência intrínseca da bactéria aos antibióticos,
- Reversão da resistência adquirida mesmo em estirpes altamente resistentes com múltiplos alvos,

- Reduzir a frequência da emergência de estirpes mutantes (Marquez, 2005).

Podemos então diferenciar dois grupos de EPIs: os “*helper compounds*” ou adjuvantes da antibioterapia que são responsáveis por alterar a susceptibilidade de um microrganismo aos antimicrobianos, e os “*macrophage modulators*” ou moduladores da resposta imunitária, que activam a actividade de eliminação das bactérias fagocitadas pelos macrófagos por inactivação de BEs (Martins *et al*, 2008). Muitos dos EPIs pertencem às duas categorias, uma vez que promovem ambos os efeitos.

Um grupo importante de EPIs, as fenotiazinas, demonstrou capacidade de inibir o transporte de cálcio, prevenindo a ligação deste a proteínas transportadoras deste catião, como a calmodulina. Isto conduz, por sua vez a que enzimas que estão dependentes do cálcio, como as intervenientes nos processos de hidrólise do ATP, sejam inibidas conduzindo assim a um aumento da acidificação do fagolisossoma do macrófago, actuando como moduladores da actividade lítica destas importantes células do sistema imune (Martins *et al*, 2008). As fenotiazinas mais utilizadas são a clorpromazina (CPZ) e a tioridazina (TZ), tendo estas a capacidade adicional de permitir o efluxo de potássio do exterior para o interior dos compartimentos celulares, como os canais de transporte cardíacos e os glóbulos vermelhos, mecanismo este que auxilia à acidificação destes compartimentos (Sun *et al*, 2006 & Kim, Kim, 2005).

Igualmente, as fenotiazinas conseguem inibir o efluxo intrínseco dos compostos nocivos para a bactéria, pela diminuição da disponibilidade energética para as BEs, o que eventualmente permite que o antibiótico atinja o seu alvo sem ser efluxado (Kaatz, Moudgal, Seo, Kristiansen, 2003, Martins *et al*, 2008).

Verificou-se que crianças com pielonefrites recorrentes devido a infecções por *E. coli* podem ser curadas com associações de CPZ e gentamicina (GEN), enquanto o tratamento apenas com o antibiótico é ineficiente (Martins *et al*, 2008).

Outro composto muito utilizado como EPI é o desacoplador CCCP que actua a nível energético na membrana bacteriana, abolindo assim o efluxo de vários compostos pela dissipação da força motriz de prótons devida ao potencial protónico. No entanto, coloca-se em questão se o seu efeito se baseia na capacidade de aumentar a penetração do antibiótico, ou se deve à alteração do envelope celular, resultando na morte da célula, sendo este composto considerado altamente citotóxico.

Existem ainda outros compostos como a reserpina e o verapamil (VP), que são inibidores de BEs de largo espectro, sendo o VP, inibidor de BEs MDR em células neoplásicas e parasitas assim como promove o efeito da tobramicina, considerado um antagonista dos canais de cálcio (Nikaido, 2004). No entanto, no seu uso clínico associado sobretudo ao controlo da hipertensão, a concentração para este fim é muito reduzida comparativamente aquela necessária para bloquear o efluxo bacteriano, tornando-se neurotóxica (Li & Nikaido, 2004).

O *L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide* (PAN), é outro composto capaz de alterar a função das BEs, tendo sido o primeiro EPI identificado para restaurar a susceptibilidade à levofloxacina em estirpes clínicas de *P. aeruginosa*, sendo também responsável pela reversão da resistência a outros antibióticos como o cloranfenicol e macrólidos (Pàges, 2007), e ainda com efeito sobre o sistema AcrAB-TolC de *E. coli* (Mazzariol *et al*, 2000).

A capacidade deste agente de repor a actividade do antibiótico em bactérias resistentes ao mesmo deve-se ao facto de inibir o efluxo de mais que um antibiótico, sendo assim considerado inibidor de largo espectro. Pode actuar como um agente competitivo pois é substrato de BEs, impossibilitando assim a ligação do antibiótico (Lomovskaya & Bostian, 2006).

Nas bombas RND, os inibidores competitivos podem aumentar a actividade de vários antibióticos, pois está provado que estas bombas apresentam múltiplos locais de ligação e uma estrutura tripartida, logo, os inibidores podem dissipar os seus elementos constituintes e inibir o efluxo, dificultando a criação de resistência a estes compostos por mutações nas BEs (Poole & Lomovskaya, 2006).

Uma das desvantagens do uso de inibidores competitivos é a sua reduzida afinidade ao alvo, o que conduz ao uso de elevadas doses e exposição temporal prolongada. Outra desvantagem relaciona-se com o facto destes inibidores ao serem específicos para determinadas BEs, tornam complexa a gestão do fenómeno de MDR, por nele estarem envolvidos diversas BEs de diferentes famílias.

Uma das apostas futuras, é o desenvolvimento de novos EPIs com base na estrutura tridimensional das BEs, obtida por cristalografia, sendo possível desenvolver compostos que inibam o seu efeito, ou ainda obter novas estruturas de antibióticos já existentes no mercado, de forma a não serem efluxados. Com a recente resolução da estrutura 3D dos transportadores de drogas, como a co-cristalização do AcrAB com alguns substratos e a análise dos efeitos biológicos de mutações ao nível da bomba, no futuro será possível o desenvolvimento de um desenho racional de alvos localizados no interior da BE e assim, o desenvolvimento de novas moléculas inibidoras de efluxo.

Moléculas que apresentam uma estrutura semelhante às quinolonas têm sido testadas como EPIs ou quimiosintetizadores, com efeito na redução da resistência ao antibiótico (Martins *et al.*, 2007), como é o caso da aminoquinolona que actua como inibidor da bomba de efluxo AcrAB-TolC. Outra abordagem alternativa consiste na síntese de péptidos que mimetizem o efeito de proteínas envolvidas na sobre-expressão do efluxo e assim competir com estas (Mallea, Mahamoud, Chevalier, Alibert - Franco, Brouant, Barbe, Pàges, 2003).

Para além do uso dos compostos aceites como EPIs, outras alternativas também têm sido testadas como a utilização de quelantes. O uso de substâncias quelantes de determinados iões como o cálcio, e para este ião específico o ácido etileno diamino tetracético (EDTA), tem sido reportado como muito eficaz no controlo de biofilmes em cateteres venosos centrais usados em doentes internados nas UCIs, hemodiálise e sujeitos a quimioterapia (Raad *et al*, 2003).

As referências a este composto como tendo possível actividade inibitória sobre as BEs, associa-se ao facto deste possuir um efeito ao nível do ião cálcio assim como as fenotiazinas e o verapamil, podendo afectar a viabilidade bacteriana. O quelante e permeabilizador da membrana externa bacteriana, EDTA (Goton *et al*, 1989), mostra-se eficaz no aumento da actividade de vários agentes antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* (Richards & Cavill, 1976); (Suginaka *et al*, 1979). A adição de uma concentração sub-inibitória de EDTA, reduz a CMI do cefprozil para *E. coli* e *Serratia marcescens* (Ushimoto *et al*, 1991). O uso de EDTA e minociclina foi demonstrado ter um efeito sinérgico na erradicação de microrganismos e biofilmes.

Num estudo levado a cabo por Raad em 2003, verificou-se que o uso apenas de EDTA não teve efeito na erradicação de MRSA em biofilmes. No entanto, ao se adicionar minociclina com ou sem EDTA, era observado uma redução do crescimento dos microrganismos, com maior eficácia quando se utilizava a combinação de minociclina e EDTA, mesmo após 24 horas de incubação a 37°C (Raad *et al*, 2003).

Os EPIs, são hoje em dia utilizados sobretudo para determinar a susceptibilidade da estirpe bacteriana *in vitro*, verificando a existência de padrões de resistência, devido à sobre- expressão de BEs. No entanto, espera-se que no futuro seja possível desenvolver ensaios clínicos de forma a determinar o efeito destes compostos em infecções bacterianas.

6. Metodologias aplicadas na detecção dos mecanismos de efluxo em bactérias

Como a presença de multirresistência devido à sobre-expressão de BEs é hoje um dos mecanismos de resistência mais importantes detectados em estirpes clínicas, sobretudo em doentes sob antibioterapias prolongadas, é importante o desenvolvimento de métodos de detecção desta sobre-expressão, embora estes ainda se encontrem numa fase de investigação e desenvolvimento.

Não havendo ainda disponível, metodologias e tecnologias que permitam detectar rapidamente a presença de fenómenos de sobre-expressão de BEs nas estirpes isoladas de doentes sob AB, o único recurso disponível tem sido a determinação das CMIs de cada estirpe para cada antibiótico na presença e ausência de EPIs. Sendo um método indirecto e pouco preciso, apenas permite uma qualificação indirecta da estirpe.

Métodos que permitam a qualificação/detecção rápida das estirpes MDR que permitam a quantificação do efluxo são hoje uma necessidade premente no laboratório de Microbiologia Médica. As metodologias de detecção do transporte parietal do composto quaternário fluorescente EtBr, usado como marcador visual da actividade de efluxo devido às suas características de baixa fluorescência quando no exterior das células, e máxima fluorescência aquando a sua ligação no interior das mesmas, são hoje uma das metodologias experimentais mais desenvolvidas (Viveiros, 2008). Este composto fluorescente pode-se ligar transientemente a vários níveis no interior da bactéria como seja ao RNA de cadeia dupla, RNA de cadeia simples, DNA de cadeia simples, oligonucleótidos e proteínas (Martins *et al*, 2006) entrando por difusão passiva

a favor do gradiente de concentração e sendo o seu excesso extruído das células pelos mecanismos de efluxo pois é substrato de vários sistemas de efluxo, em particular do sistema AcrAB-TolC (Jernaes & Steem, 1994; Viveiros, 2008).

As metodologias foram desenvolvidas no laboratório da Unidade de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa (IHMT/UNL) e serão expostas e utilizadas ao longo deste trabalho, aplicadas a estirpes com fenótipo MDR provenientes de doentes internados no Hospital dos SAMS.

Os métodos fenotípicos de detecção de sobre-expressão de BEs utilizando o efluxo de EtBr, aplicados neste trabalho, são:

1) *EB-Agar Cartwheel*, em que se utiliza placas de agar com EtBr incorporado, podendo ainda ser adicionados vários EPIs. O objectivo do método baseia-se na observação da fluorescência emitida pelas colónias bacterianas após a entrada de EtBr na célula e ligação aos diferentes componentes intracelulares que fazem com que a molécula fluoresca, permitindo a avaliação da sobre-expressão das BEs pela diminuição da fluorescência face à estirpe de referência. Os isolados bacterianos que exibam fluorescência a uma concentração elevada de EtBr, comparativamente à fluorescência a concentrações mais baixas de EtBr para a estirpe controlo, apresentam sinais de sobre-expressão de BEs. Isto porque é necessário uma concentração de EtBr no meio gelosado mais elevada para se obter o mesmo nível de fluorescência das colónias comparativamente à estirpe controlo.que é tida como a referência para a resistência intrínseca por efluxo. (Martins *et al*, 2006).

2) Utilização do termociclador em tempo real Rotor-GeneTM 3000 (Corbett Research, Sydney, Austrália), em que é possível observar a actividade de efluxo em tempo real por medição fluorimétrica directa do efluxo de EtBr das células bacterianas (Viveiros *et al*, 2008).

Estas metodologias são ainda complementadas pela aplicação do Método de *Screening* da actividade dos EPIs que procura avaliar o efeito dos EPIs nas estirpes e assim confirmar, por uma metodologia mais simples do que a determinação das CMIs, na presença dos EPIs, a presença de sobre-expressão de BEs e a possível reversão da resistência pelos mesmos.

3) Para a determinação genotípica desta sobre-expressão, utilizou-se a Reacção de Polimerização em Cadeia (Polimerase Chain Reaction – PCR) por transcrição reversa em tempo real quantitativo (qRT - PCR – *quantitative Reverse Trascription- Polimerase Chain Reaction*), para a determinação da expressão dos genes que codificam para as BEs que estão sobre-expressas nos isolados em estudo (Viveiros *et al*, 2005).

Os fundamentos teóricos e práticos de cada uma destas técnicas e metodologias encontra-se exposto na secção Materiais e Métodos.

II. OBJECTIVOS

- Objectivo geral

Caracterização biológica, fenotípica e genotípica, dos mecanismos de resistência intrínseca aos antibióticos por sobre-expressão de BEs em estirpes de *E. coli*, sujeitas a pressão antibiótica prolongada em ambiente hospitalar.

- Objectivos específicos

Detectar, quantificar e caracterizar a componente de efluxo activo de antibióticos nos mecanismos de resistência presentes nas estirpes clínicas de *E. coli* com fenótipo de MDR isoladas no Serviço de Patologia Clínica do Hospital dos SAMS;

- Determinar as CMI's para diversos antibióticos, aos quais os isolados *E. coli* em estudo são resistentes (estirpes multirresistentes MDR) e usar EPI's, com o objectivo de avaliar o seu potencial efeito na diminuição ou reversão da resistência aos antibióticos nestas estirpes MDR;

- Melhorar o conhecimento sobre os mecanismos através dos quais as BEs actuam ao nível da bactéria, aumentando a sua resistência intrínseca aos antibióticos. Desenvolver e aplicar, em situações reais, novas tecnologias que permitam a detecção e quantificação deste fenómeno e contribuir para a avaliação de possíveis novas alternativas terapêuticas que permitam evitar ou diminuir este fenómeno em estirpes de *E. coli* causadoras de infecção em ambiente hospitalar.

III.MATERIAL E MÉTODOS

1.Estirpes clínicas e controlo

As estirpes clínicas utilizadas no estudo são provenientes de diferentes serviços do Hospital dos SAMS como dos Serviços Ambulatórios. O Hospital dos SAMS é constituído por 11 pisos, e dispõe:

- 121 Camas de internamento;
- Bloco Operatório com 4 salas de grande e média cirurgia, mais uma sala de pequena cirurgia no Hospital Ambulatório;
- UCIP (Unidade de Cuidados Intensivos Polivalente) com capacidade de 8 camas de internamento, duas das quais permitem o isolamento dos doentes, admitindo doentes quer do foro médico quer do foro cirúrgico;
- 3 Unidades de Cuidados Intermédios;
- Maternidade com 3 salas de parto, 1 sala de operações, 1 sala de recobro.
- Neonatologia com UCI e berçário;
- Atendimento Permanente em Ginecologia/Obstetrícia;
- Nefrologia e Diálise;
- Meios Complementares de Diagnóstico (Análises Clínicas, Anatomia Patológica, Imagiologia incluindo TAC e RM, Cardiologia);
- Exames especiais, incluindo endoscopias, CPRE's e angiografias.
- Urgência referenciada (pelo Atendimento Permanente do Centro Clínico, Médico Assistente, Unidade Hospitalar e INEM). Não existe Urgência Pediátrica, Urológica, Oftalmológica, Neurocirúrgica, de Otorrinolaringologia e de Cirurgia Vascular.

Foram cedidas pelo Laboratório de Patologia Clínica do SAMS, 8 estirpes de *E. coli* MDR representativas do período temporal iniciado no último semestre de 2007 e terminado no primeiro semestre de 2008.

As estirpes foram isoladas nos meios de cultura clássicos para isolamento de Enterobactereaceas, nomeadamente Gelose de Sangue e MacConkey Agar (bioMérieux, La Balme, França), de acordo com o protocolo de trabalho que é utilizado na rotina do laboratório para isolamento de microrganismos a partir de amostras clínicas. Para a sua identificação, após re-isolamento em meio gelosado para obtenção de um isolamento puro, utilizou-se o sistema VITEK[®] 2 (bioMérieux) e restantes técnicas de identificação de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006).

As estirpes de *E. coli* foram codificadas como: estirpe 5, 9, 12, 13, 14, 16, 18, 19. Esta numeração foi efectuada pelo serviço de forma a permitir a codificação das amostras, assegurando assim a confidencialidade dos resultados e protecção dos doentes de onde as estirpes foram isoladas, tendo sido obtido o consentimento da direcção do Hospital dos SAMS.

Segundo os dados da vigilância epidemiológica (ano de 2006), fornecidos pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital dos Serviços de Assistência Médico-Social do Sindicato dos Bancários do Sul e Ilhas, Hospital dos SAMS, a estirpe isolada em maior percentagem durante o ano de 2006 neste Hospital foi *E. coli* com 21%, seguida dos fungos leveduriformes com 13%. No que diz respeito às infecções sistémicas nosocomiais, *E. coli* posicionou-se no 6º lugar com 9%, sendo que esta ocupa o 1º lugar com 16%, nas amostras de pus isoladas e de urina com cerca de 31%. No respeitante a infecções do trato respiratório *E. coli* ocupou o 3º lugar com 11% de todos os agentes de infecção respiratória isolados neste hospital em 2006. De entre os isolados

de *E. coli* durante 2006 mais de 20% evidenciava resistência a duas ou mais classes de antibióticos com estrutura diferente entre si (Pàges, 2007), o que as qualifica como MDR (SAMS, comunicação pessoal).

Comparando com estatísticas equivalentes para os anos noventa, para o mesmo hospital, verificou-se um significativo aumento de infecções a *E. coli*, com multirresistência associada, com diminuição proporcional de outros agentes multirresistentes, como o Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ou os Enterococcus, devido às rigorosas medidas de controlo e monitorização destas infecções implementadas no hospital desde essa data (SAMS, comunicação pessoal).

Na tabela III.1 encontram-se sumariados os dados cedidos pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital dos SAMS referente às estirpes clínicas isoladas.

Estirpe <i>E. coli</i>	Produto	Proveniê- cia	Antibiótico	Dados/ Diagnóstico	TSA	Classes de antibióticos (resistência)
5	Sangue (hemo- cultura)	Diálise	Sem AB prévia	64 anos, ♂, Hemo dialisado, suspeita de colangite	Ampicilina (> = 32 R) trimethoprim/ sulfa (> = 320 R)	Penicilina βlactâmicos Sulfonamidas
9	Urina jacto médio	Urgência	Ciprofloxacina	35 anos, ♀, Infecção urinária	Ampicilina (>=32 R) Amoxicilina/CA (>=32 R) Piperacilina (>=128 R) Cephalotin (>= 64 R) Cefoxitina (32R) Trimetoprim /sulfa (>= 320 R) Ceclacor(R)	Sulfonamidas Penicilinas Cefalosporinas
12	Urina jacto médio	Medicina	Sem AB prévia	♂ doente neoplásico (quimio- terapia), Infecção urinária	Ampicilina (>= 32 R) Amoxicilina/CA (R) Cephalotin (>= 64 R) Trimetoprim /sulfa (>= 320 R) Ceclacor(R)	Penicilina (β-lactâmicos) sulfonamidas Cefalosporinas
13	Sangue	Medicina	Sem AB prévia	♂ 64 anos, pionefrose	Ampicilina (>= 32 R) Gentamicina (> 0 16 R) Trimetoprim/ sulfa (> = 320 R)	Penicilina (β-lactâmicos) sulfonamidas aminoglicó- sidos
14	Pús de ferida opera-tória	UCIP	Cefazolina+ Netilmicina Piperacilina+ Tazobactam	♀, Colecistecto-mia	Ampicilina (>=32 R) Amoxicilina/CA (>=32 R) Piperacilina (>=128 R) Cephalotin (32 R) Gentamicina (>= 16 R) Tobramicina (>= 16 R) Norfloxacin (>= 16 R) Ofloxacin (>= 8 R) Ciprofloxacina (>=4R) Trimetoprim /sulfa (> = 320 R) Ceflacor (R)	Penicilina (β-lactâmicos) sulfonamidas aminoglicó- sidos fluoroquino- lonas

Estirpe <i>E. coli</i>	Produto	Proveniênci	Antibiótico	Dados/ Diagnóstico	TSA	Classes de antibióticos (resistência)
16	Sangue (hemo-cultura)	Cirurgia		♀	Ampicilina (>= 32 R) Norfloxacina (>= 16 R) Ofloxacina (>= 8 R) Ciprofloxacina (>= 4R) Trimetoprim/sulfa (>= 320 R)	Penicilina (β-lactâmicos) sulfonâmidas Fluoroquinolonas
18	Urina jacto médio	Urgência	Ciprofloxacina	♂ Infecção urinária	Ampicilina (>=32 R) Amoxicilina/CA (>=32R) Cephalotin (32 R)	Penicilina (β-lactâmicos) Cefalosporinas
19	Urina jacto médio	Neonatalogia	AB prévia não especificada	♀ 2 Episódios infecção urinária-suspeita Pielonefrite	Ampicilina (>= 32 R) Norfloxacina (>=16 R) Ofloxacina (>= 8R) Ciprofloxacina (>=4 R) Nitrofurantoina (128 R)	Penicilina (βlactâmicos) Fluoroquinolonas

Tabela III. 1 - Perfil de resistência e dados clínicos das estirpes clínicas de *E. coli* cedidas pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital dos SAMS. Legenda: AB (antibioterapia), TSA (teste de sensibilidade aos antibióticos), R (resistente), ♀ (feminino), ♂ (masculino), > (superior), = (igual)

Todas as estirpes foram repicadas e inoculadas em 10 mL de Mueller Hinton Broth (MHB) (Oxoid, Basingstoke Hampshire), a 37°C com agitação (220 rpm), tendo-se observado a morfologia colonial em placas de Mueller Hinton Agar (MHA) (Oxoid). Foram feitos dois *stocks* das estirpes em meio MHB suplementado com 10% (v/v) de glicerol (J. T. Baker, Philipsburg, E.U.A.), e estes mantidos a - 80°C.

As estirpes laboratoriais utilizadas como controlo negativo e positivo de efluxo foram respectivamente: AG100 ou K12- ATCC23716 e AG100A adaptada à tetraciclina (AG100A_{TET}). A estirpe AG100 corresponde à estirpe de *E.coli* K-12 selvagem (*argE3*

thi-1 rpsL xyl mtl Δ (*gal-uvrB*) *supE44*), que contém a BE AcrAB intacta e funcional (George & Lèvy, 1983), tendo sido gentilmente cedida por Hiroshi Nikaido (University of California Berkeley, CA). A estirpe AG100A_{TET} (*argE3 thi-1 rpsL xyl mtl galK supE441* Δ (*gal-uvrB*) λ ⁻ Δ *acrAB:kan*) possui resistência fenotípica induzida à tetraciclina por sobre-expressão de BEs e resistência genética à canamicina por inserção do gene Kan^r do transposão Tn903, tendo assim sido crescida com adição de canamicina (100 μ g/mL) e tetraciclina (8 μ g/mL) em MHB (Okusu *et al*, 1996; Viveiros, 2005).

2. Antibióticos e compostos antimicrobianos

Os antibióticos usados para a realização dos ensaios foram seleccionados com base no perfil de resistência das estirpes clínicas MDR, obtido pelo antibiograma realizado no serviço de patologia clínica do Hospital dos SAMS, pelo uso do sistema de identificação automatizado VITEK[®] 2 (bioMérieux), sendo representativos das classes de antibióticos à qual a estirpe exibia resistência laboratorial e clínica.

Os antibióticos seleccionados foram: ampicilina (AMP), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), trimetoprim/sulfametoxazole (TMP); pertencendo às classes de antibióticos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfonamidas respectivamente, que foram fornecidos pela Sigma Aldrich Química S.A. (St Louis, EUA), preparados em água bidestilada estéril e conservados a -20°C.

Antibiótico	Solução <i>stock</i> (concentração)	Carga do Disco (μg)
Ampicilina	2 mg/mL	10
Gentamicina	1024 $\mu\text{g/mL}$	10
Ciprofloxacina	640 $\mu\text{g/mL}$	5
Trimetoprim/ sulfametoxazole	12 mg/mL	1.25/23.75

Tabela III.2 - Soluções e discos de antibiótico utilizados e suas respectivas concentrações.

Os compostos antimicrobianos seleccionados como inibidores de bombas de efluxo (EPIs) foram: clorpromazina (CPZ), tioridazina (TZ), verapamil (VP), *L-Phe-L-Arg- β -naphthylamide*(PAN), *carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone* (CCCP), ácido etileno diamino tetracético (EDTA), adquiridos à Sigma- Aldrich Química S.A. Todas as soluções/diluições preparadas foram armazenadas devidamente a -20°C , excepto as soluções de EDTA que foram armazenadas à temperatura ambiente (Tabela III.3).

Composto	Solução <i>stock</i>
CCCP	0.5 mg/mL em água bidestilada estéril e metanol a 1:1 (preparação sob aquecimento a 45°C)
CPZ	10 mg/mL em água bidestilada estéril
PAN	25 mg/mL em água bidestilada estéril
TZ	19 mg/mL em água bidestilada estéril
VP	15 mg/mL, 32 mg/mL em água destilada
EDTA	0.5 M em água bidestilada estéril, e pH ajustado a 8.0 (preparação sob aquecimento a 45°C)

Tabela III. 3 - Soluções *stock* dos compostos antimicrobianos utilizadas neste trabalho.

3. Reagentes utilizados na actividade experimental

Os reagentes utilizados na actividade experimental, encontram-se descritos na seguinte Tabela III.4.

Solução	Composição/Preparação da solução <i>stock</i>
PBS (Sigma-Aldrich)	10 mM tampão fosfato; 2.7 mM KCL; 137 mM NaCl, pH 7.4
TAE 1x	40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8.0
TE 1x	Tris-HCL 10mM pH 8.0; EDTA 1mM, pH 8.0
EtBr (Sigma-Aldrich)	10 mg/ml (água bidestilada, preparado sob aquecimento e conservado a 4°C, protegido da luz)
DNase (QIAGEN, GmbH, Hilden, Alemanha)	1500 unidades em 1.5 mL de água RNase-free
Lisozima (Sigma-Aldrich)	10 mg/mL em água bidestilada estéril

Tabela III. 4 – Soluções tampão, enzimas e corantes utilizados neste trabalho.

4. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) para antibióticos e EPIs

As CMIs para os antibióticos e EPIs foram determinadas de acordo com as normas do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2006). Como referido anteriormente, foram utilizadas 8 estirpes clínicas de *E. coli* e AG100/AG100A_{TET} (estirpes controlo) para a determinação inicial das CMIs dos EPIs a testar. O

crescimento das estirpes bacterianas para a determinação das CMI's foi feito em MHB, (Oxoid, Basingstoke Hampshire), sendo as pré-culturas incubadas a 37°C com agitação (220 rpm), durante a noite. A densidade óptica (DO_{600nm}) das estirpes foi ajustada a 0.5 na escala de McFarland em tampão fosfato (PBS) (10 µL de cultura em 10 mL de PBS).

A CMI para cada agente foi determinada pelo método de microdiluição em meio líquido, em placas de 96 poços. Foram efectuadas diluições seriadas dos antibióticos de forma a se obter a concentração desejada e com o volume final de 170 µL, sendo posteriormente adicionado apenas 20 µL de inóculo na placa. De seguida as placas foram incubadas por 18h a 37°C e a sua leitura realizada às 16 e 18 horas, considerando-se a CMI como a menor concentração de antibiótico a partir da qual não é visível o crescimento da estirpe, comparando-se sempre com o controlo do meio de cultura e com o controlo sem antibiótico. Para a interpretação dos resultados das CMI's compararam-se os mesmos com os *breakpoints* definidos no CLSI (CLSI, 2006).

Seguiu-se a determinação da CMB, em que se retiraram 100 µL dos poços que não apresentavam crescimento e plaqueou-se em MHB, incubando-se por 18 horas a 37°C. Para a determinação da CMB, considerou-se a menor concentração de antibiótico onde não se observou crescimento nas placas de cultura.

5. Método de Screening de BEs - EB-Agar Cartwheel Method

O método utilizado nesta tese é uma versão modificada do método EB-Agar Method (Martins *et al*, 2006), tendo como objectivo, a avaliação do aumento da actividade de BEs em estirpes bacterianas multirresistentes.

As estirpes foram crescidas em Tryptone Soya Broth (TSB) (Scharlau Chemie SA-Barcelona, Espanha) e foram utilizadas placas de Tryptone Soya Agar (TSA) (Scharlau

Chemie SA) contendo concentrações crescentes de EtBr, 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluídas a partir de uma solução *stock* de 1mg/mL de EtBr.

Após preparação das placas, e ajuste das culturas bacterianas a 0.5 na escala de MacFarland, foi feito o espalhamento das estirpes com zaragatoa esterilizada bem como dos controlos negativo (AG100) e positivo (AG100A_{TET}) de efluxo, em linhas desenhadas para a localização de cada estirpe.

Depois de inoculadas, as placas foram incubadas por 16h e 18h a 37°C e foram observadas num transiluminador U.V. (Uvi Tec Limited-Cambridge, Inglaterra), que pela excitação do EtBr à luz ultravioleta, torna possível observar a fluorescência emitida por cada estirpe, comparativamente às estirpes controlo.

Em seguida, a fluorescência foi registada num aparelho Gel-doc XR (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, U.S.A.), onde é possível observar a fluorescência através da radiação U.V. e registá-la, procedimento este repetido após 18h das placas armazenadas a 4°C. O motivo pelo qual a fluorescência foi novamente gravada mas desta vez a 4°C, baseia-se no processo de funcionamento das BEs, pois estas são dependentes de energia logo, ao se colocarem as placas a uma temperatura inferior, vai permitir que as BEs diminuam a sua actividade, acumulando mais EtBr no interior da célula, observando-se assim maior fluorescência nas estirpes estudadas.

A interpretação dos resultados relaciona-se com a fluorescência, ou seja, as estirpes clínicas consideradas como tendo um aumento da actividade das BEs, são aquelas que apresentam menor fluorescência (acumulam menos EtBr no seu interior) que a estirpe de controlo negativo para o efluxo (AG100), a uma mesma concentração de EtBr, sendo o controlo positivo de efluxo aquele que não fluoresce às concentrações utilizadas devido à sua sobre-expressão de bombas de efluxo (AG100A_{TET}).

6. Método de *Screening* da actividade dos EPIs

As estirpes *E. coli* MDR que mostraram um aumento da actividade de BEs no método *EB-Agar Cartwheel*, foram inoculadas em MHB, tendo sido testadas na presença dos antibióticos para os quais estas exibiam resistência na presença e na ausência de EPIs.

O objectivo desta técnica é visualizar quais os EPIs que ao impedirem o efluxo dos antibióticos, permitem a reversão ou redução da resistência em cada estirpe. Ou seja, detectar/confirmar a sobre-expressão das BEs, através da observação do crescimento bacteriano (turvação) em meio líquido na presença de antibiótico e observar a reversão/redução da resistência aos antibióticos na presença e ausência dos EPIs.

Os discos de antibióticos utilizados foram adquiridos à Oxoid e as placas de cultura de células de 24 poços foram adquiridos à Nalgene (Nalge Nunc International, Washington, DC, EUA), como demonstrado na Figura III.1. O volume final que se pretende em cada poço é de 1 mL. Assim, o poço apenas com MHB (controlo) e com o disco do antibiótico corresponde a 1 mL, o poço com o EPI corresponde a 900 µL de meio de cultura, e os poços com o EPI e o inóculo correspondem a 800 µL de meio de cultura, sendo adicionado 100 µL quer de inóculo quer de EPI. Duas colunas de poços (8 no total) foram utilizadas para os controlos, consistindo em um poço apenas com MHB, outro com MHB e discos de antibiótico (controlos negativos), MHB e o inóculo (controlo positivo) e os restantes MHB e EPIs numa concentração correspondente a 1/2 da CMI e num volume de 100 µL (controlos negativos). Os controlos negativos são utilizados no sentido de se obter um controlo de esterilidade quer do meio de cultura (MHB) quer dos discos de antibióticos e soluções de EPIs.

Aos restantes poços foram adicionados os antibióticos, inóculo e EPIs, estes últimos a ½ da CMI, isto porque desta forma pretende-se evitar a inibição do crescimento devido ao efeito exclusivo do EPI. As placas foram cobertas com as respectivas tampas e colocadas a 37°C, por uma hora para permitir a difusão do antibiótico no meio, procedimento este antes da aplicação nos poços dos EPIs e do inóculo (Figura III.1).

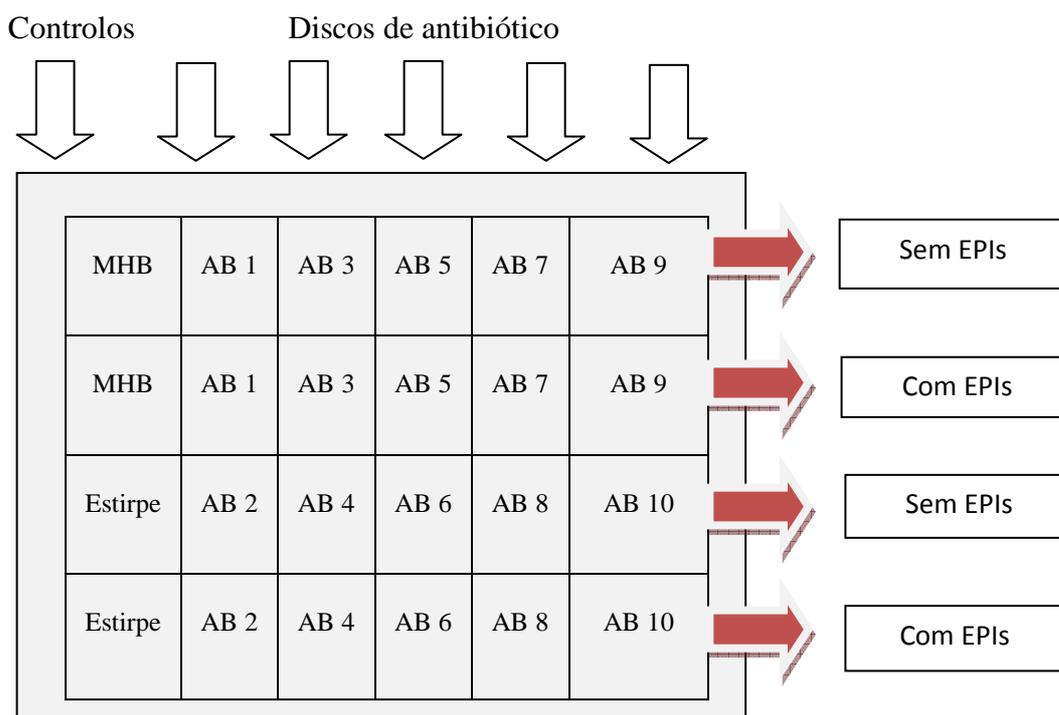


Figura III.1 - Representação esquemática do método de *Screening* da actividade dos EPIs.

Legenda: MHB (meio Mueller Hinton líquido); AB-antibiótico.

Os antibióticos e EPIs estudados para cada estirpe estão descritos na Tabela III.5. As diluições preparadas de EPIs utilizadas que por sua vez correspondem a ½ CMI num volume de 100 µL foram:

CCCP a 50 µg/mL (2.43 mM)

TZ a 250 µg/mL (0.614 mM)

CPZ a 250 µg/mL (0.7036 mM)

PAN a 200 µg/mL (0.385 mM)

VP a 15 mg/mL (3 mM)

EDTA a 4.6 μ M (*E. coli* 19) e 9.3 μ M (*E. coli* 5)

As estirpes em estudo foram diluídas em 10 mL de PBS, num volume de 100 μ L, o que permite o ajuste a 0.5 na escala de McFarland, sendo posteriormente inoculadas nas placas de 24 poços, tendo-se permitido a incubação por 16h a 37°C.

Foi observada a turbidez ou ausência da mesma em todos os poços inoculados com a estirpe, permitindo perceber se houve ou não reversão da resistência, nos poços onde foram aplicados o disco de antibiótico, o EPI e o respectivo inóculo.

A ausência de turbidez significou reversão total da resistência e o meio menos turvo indicou a redução da resistência. Os poços que apresentaram redução ou inibição do crescimento foram plaqueados num volume de 100 μ L, e incubados a 37°C, permitindo a contagem das unidades formadoras de colónias (UFC). Para este procedimento ser possível, teve que se recorrer a diluições seriadas de cada poço (até um máximo de E+13) e inóculou-se as diluições pretendidas em cada placa (mínimo 3 para cada poço) tendo sido posteriormente incubadas durante a noite. Procedeu-se à contagem das UFCs, e representou-se graficamente os resultados correspondentes à média das três placas por poço.

De referir, que com esta metodologia, é possível confirmar que as estirpes mantêm o seu fenótipo MDR, pois estas crescem no poço com o disco de antibiótico, logo são-lhe resistentes. Assim, ao se adicionar o EPI e a turbidez do poço é reduzida ou inibida, podemos inferir o efeito do EPI sobre a resistência prévia devida à actividade de efluxo.

Após a realização deste método, foram seleccionadas os EPIs que evidenciaram reversão ou redução da resistência das estirpes clínicas aos antibióticos.

<i>E. coli</i>	Antibióticos testados		EPIs
5	Ampicilina	Trimetoprim	CCCP
12	Ampicilina	Trimetoprim	TZ
13	Gentamicina	Trimetoprim	VP
16	Trimetoprim	Ciprofloxacina	PAN
19		Ciprofloxacina	EDTA

Tabela III. 5- Estirpes clínicas e respectivos antibióticos/EPIs testados.

7.Método de *Screening* de BEs-EB-Agar Cartwheel Method / EPIs

Como já foi referido, este método foi utilizado com o objectivo fundamental de seleccionar quais as estirpes clínicas que evidenciavam sinais de sobre-expressão das BEs.

A variação ao método, isto é, a adição de EPIs às placas, constitui uma aplicação importante, uma vez que desta forma é possível observar o efeito directo dos EPIs na acumulação de EtBr nas colónias quando estas crescem em placas com diferentes concentrações de EtBr (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 µg/mL) e na presença do EPI.

Procedeu-se à preparação das placas de TSA com EtBr nas concentrações já referidas anteriormente, sendo adicionados os EPIs em volume inferior a 1 mL, a 20 mL de meio de cultura gelosado. As concentrações usadas foram: ½ da CMI para todos os EPIs, de forma a não se verificar efeito sobre a replicação da estirpe, e as concentrações das soluções *stocks* utilizadas de VP foi de 40 mg/mL, TZ de 19 mg/mL e CPZ de 12 mg/mL.

As estirpes foram diluídas em PBS, 10 µL do inoculo em 10 mL de tampão, (correspondendo a 0.5 na escala de MacFarland) e foi feito um esfregaço em toda a placa.

As placas foram incubadas durante a noite a 37°C, foram tiradas fotografias das colónias crescidas em placas com EPI e em placas controlo (sem EPI) (Gel-doc XR (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, U.S.A.), estabelecendo-se a comparação de fluorescência entre ambas.

Assim, é possível concluir que as placas com EPI que evidenciam maior fluorescência comparativamente ao controlo da mesma estirpe em placas sem EPI, o efeito inibitório deste ao nível da actuação das BEs leva a uma maior acumulação de EtBr e como tal, permite-nos confirmar as suspeitas anteriores de que as estirpes clínicas evidenciavam sinais de sobre-expressão das BEs.

8.Método de Kirby-Bauer e Etest®

Estes métodos foram realizados de acordo com as recomendações do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2006), tendo como principal objectivo a determinação do padrão de resistência/susceptibilidade das estirpes na técnica de Kirby-Bauer e a quantificação das CMI's em meio sólido na técnica de E-test® (AB Biodisk, Solna, Suécia).

As estirpes foram crescidas durante a noite em MHB e incubadas a 37°C, com agitação de 220 rpm. Após incubação a DO_{600nm} foi ajustada a 0.5 na escala de MacFarland. Foi feito um esfregaço em toda a placa, colocando-se *a posteriori* (10 minutos após o esfregaço) os discos impregnados de antibiótico a pelo menos 15 mm dos bordos da placa. Após 15 minutos de difusão do disco, inverteram-se as placas e

foram incubadas a 37°C durante a noite (18 horas). O halo de inibição foi medido e os resultados registados, de acordo com as tabelas de interpretação do CLSI, podendo-se classificar a estirpe como resistente, intermédia ou sensível.

Este método sofreu alterações, uma vez que se utilizou placas com EPIs, de forma a avaliar o seu efeito em termos de halo de inibição. Em cada ensaio foi inoculada uma placa contendo MHA, que funcionou como controlo apenas com disco de antibiótico aplicado no centro da placa e as restantes placas de MHA com os EPIs (a ½ CMI).

As concentrações usadas de EPIs foram:

- TZ a 50 µg/mL
- CPZ a 25 µg/mL
- VP a 1500 µg/mL

No que diz respeito ao método do Etest® (AB Biodisk), é uma técnica que permite quantificar o valor da CMI em meio sólido. Este método pode ser utilizado tanto em estirpes Gram-positivas como em Gram- negativas.

O sistema consiste numa tira inerte e não porosa impregnada num antibiótico específico, em concentrações pré-definidas sendo aplicada no centro da placa. Este método para além da determinação da CMI, permite verificar a redução da mesma em meio sólido, quando a tira é aplicada numa placa contendo um determinado EPI.

Os EPIs testados foram os que apresentaram resultados de reversão ou redução da resistência, e as concentrações foram as mesmas utilizadas para o Kirby- Bauer.

A estirpe a testar foi incubada em 5 mL de MHB durante a noite, posteriormente diluída em PBS, de forma a se ter uma turbidez da suspensão bacteriana, equivalente a 0.5 na escala de MacFarland.

Esta suspensão foi depois aplicada na placa com o auxílio de uma zaragatoa, deixando-se secar durante 10 minutos. Aplicou-se de seguida a tira no centro da placa

de MHA, com o auxílio de uma pinça estéril, aplicando alguma pressão, e após 15 minutos inverterm-se as placas de agar e incubou-se a 37°C durante cerca de 18 horas.

A leitura da CMI foi efectuada no ponto de intersecção entre a elipse de inibição e a escala da tira do Etest® de acordo com as instruções do fabricante.

Assim foi possível obter um resultado adicional de concordância com os outros métodos utilizados na avaliação do efeito dos EPIs em estirpes clínicas.

9. Fluorimetria em termociclador de tempo-real (Rotor-Gene 3000™) - método semi-automático com a utilização de EtBr

Este método consiste na utilização de um termociclador, Rotor-Gene 3000™, com software de análise em tempo real (Corbett Research, Sydney, Austrália) para a visualização do efluxo activo nas estirpes clínicas que evidenciavam sinais de sobre-expressão das BEs. Este instrumento permite a selecção ideal dos comprimentos de onda para a detecção da fluorescência de determinados compostos e reagentes, no caso do EtBr, a detecção da excitação é 530 nm e da emissão é 585 nm *band pass e high pass filters* respectivamente, que são filtros de detecção que permitem detectar os fluóforos como o EtBr.

Para este estudo foram levados a cabo dois ensaios fundamentais: o ensaio de acumulação e o de efluxo de EtBr tendo sido estudado o efeito da fonte de carbono (energia) e o efeito inibitório dos EPIs.

Este método apresenta uma grande sensibilidade e permite em tempo real observar e registar o comportamento da estirpe no que diz respeito à acumulação e ao efluxo do EtBr.

Para este método, as estirpes foram crescidas em meio de cultura Luria-Bertani (LB) preparado no laboratório com peptona, extracto de levedura (Merk-Darmstadt, Alemanha), agar (Scharlau-Barcelona Espanha) e cloreto de sódio (Panreac Química SA-Barcelona Espanha) e as culturas incubadas a 37°C com agitação (220 rpm), entre 2h30 e 4h até atingir uma $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.6 (Viveiros *et al*, 2008).

As concentrações usadas de inibidores foram TZ a 500 µg/mL e CPZ a 500 µg/mL, EDTA a 300 µM e VP a 30 mg/mL.

9.1. Ensaio de acumulação:

O protocolo utilizado para a realização dos ensaios de acumulação, já tinha sido previamente otimizado por autores anteriores (Viveiros *et al*, 2008) e consistiu em determinar quais os compostos (EPIs) que induziam a acumulação intracelular máxima do EtBr relativamente à estirpe a analisar.

As culturas bacterianas foram inoculadas em LB e incubadas a 37°C até atingirem uma $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.6, correspondendo à fase logarítmica ou fase exponencial de crescimento, sendo a leitura efectuada num espectrofotómetro PU8620 UV/VIS/NIR (Pye/unicam Ltd, Philips, Cambridge, Reino Unido). Tanto para as estirpes clínicas como para a AG100, o tempo de crescimento foi variável entre as 2 h30 e as 3h30.

Quando esta condição foi atingida, uma alíquota de 1 mL foi centrifugada a 13000 rpm durante 3 minutos, numa centrífuga (Biofuge pico Heraeus, DJB Labcare Ltd, Reino Unido).

As células foram recolhidas lavando-se o *pellet* com tampão PBS pH 7.4, num volume de 1 mL, e após este procedimento novamente centrifugadas nas condições anteriores.

Posteriormente, a DO_{600nm} foi ajustada a 0.3 em PBS e adicionada glucose a 0.4 % (20 μ L de uma solução de 20%), e EtBr numa concentração final de 1 μ g/mL (5 μ L de uma solução de 200 μ g/mL, em 1mL de suspensão bacteriana).

Foi distribuído 0.1 mL (valor recomendado pelo apoio técnico do Rotor-gene 3000TM) em tubos de Eppendorf de 0.2 mL e de seguida adicionados os EPs na concentração correspondente a $\frac{1}{2}$ da CMI para as estirpes a testar. Foram também preparados tubos controlo, que consistem num tubo com EtBr na concentração utilizada, um tubo com a suspensão celular e glucose.

As medições fluorimétricas em tempo real foram efectuadas a 37°C no comprimento de onda anteriormente descrito e as aquisições de sinal de fluorescência foram efectuadas a cada 60 segundos, durante 100 ciclos (2h) de forma a captar o seu efluxo nos parâmetros anteriormente aplicados.

9.2. Ensaio de efluxo:

O protocolo já optimizado por outros autores foi testado (Viveiros *et al*, 2008), mas constatou-se que ao se recorrer ao mesmo, não se observou efluxo nas estirpes clínicas comparativamente à *E. coli* AG100 (controlo), onde a curva padrão de efluxo era observada. Por este motivo, recorreu-se a uma optimização do protocolo em vigor na Unidade de Micobactérias do IHMT, tendo como base científica alguns artigos pesquisados em que se fazia referência ao uso de gelo durante a manipulação das alíquotas (Jernaes, M. W., Steen, H. B., 1994) e também o tempo de aquisição no termociclador de tempo real ser feita aos 30 segundos na utilização do Rotor-Gene 3000TM.

Por se admitir que as BEs das estirpes clínicas se encontram sobre-expressas, a extrusão dos compostos será feita de forma mais rápida que a estirpe controlo, motivo pelo qual, não se conseguia “captar” o seu efluxo.

Desta forma, decidiu-se ajustar o tempo da primeira aquisição de sinal no Rotor-Gene™ para 15 segundos e posteriormente de 30 em 30 segundos. Sendo que toda a manipulação das alíquotas foi feita em gelo, para atrasar a actuação das BEs e consequentemente a extrusão EtBr.

As culturas bacterianas foram inoculadas em LB a 37°C até atingirem uma DO_{600nm} de 0.6, medido num espectrofotómetro PU8600 UV/VIS (Pye/unicam Ltd, Philips).

O primeiro passo deste protocolo corresponde à inibição das BEs, efectuando-se o carregamento das células com o inibidor que mais evidencia acumulação de EtBr.

Esta primeira fase correspondeu ao protocolo levado a cabo no ensaio de acumulação, em termos de procedimento, mas ajustando-se a DO_{600nm} a 1.0, ficando as células 1h em fase de carregamento à temperatura ambiente na ausência de glucose e protegidas da luz pois o EtBr é fotossensível (Viveiros *et al*, 2008).

Após este período, as células são centrifugadas e é-lhes adicionado PBS conservado a 4°C num volume de 1 mL, dividindo-se a amostra em igual volume (500 µL) em alíquotas de 1 mL. A metade da amostra adicionou-se 10 µL de glucose a 20%, sendo distribuídos 100 µL por microtubos de 0.2 mL e 95 µL nos microtubos onde se adicionaram os EPIs.

Toda a manipulação foi feita em gelo, assim como o seu transporte até ao aparelho Rotor-Gene 3000™.

A leitura de sinal foi feita num canal criado para o efeito com o mesmo comprimento de onda, 530/585 nm, mas a sua captura foi aos 15 segundos e posteriormente de 30 em 30 segundos durante 60 ciclos (1 h).

Para a análise dos dados obtidos, é necessário a normalização dos mesmos, que consiste em atribuir o número 1 à fluorescência máxima, e assim comparar a fluorescência obtida em cada ponto com a fluorescência obtida nas condições ideais de acumulação (estirpe na presença do EPI com o qual é carregada), sendo obtido por este método de normalização dos dados um gráfico de fluorescência relativa em função do tempo.

10. Extracção de RNA total

Previamente à extracção de RNA total, a bancada assim como as micropipetas utilizadas foram limpas com detergente para evitar a degradação do mRNA pelas RNases (RNase away (Molecular BioProducts, San Diego, USA)).

O kit de extracção do mRNA utilizado foi o *Rneasy® Mini Kit* (Qiagen), sendo o primeiro passo a adição de um reagente de protecção às células, *RNAprotect bacteria*, de forma a se manter intacto o perfil de mRNA antes da lise.

As estirpes foram inoculadas em meio LB no volume correspondente a 5 mL, e incubadas a 37°C com agitação de 220 rpm, até atingirem uma DO_{600nm} de 0.6.

A presença do antibiótico no crescimento bacteriano em concentrações abaixo da sua CMI, obriga as bactérias a sobre-expressar as suas BEs, daí a importância de se adicionar o antibiótico ao meio de cultura para extracção de mRNA.

Da cultura, retiraram-se 500 µL e num microtubo estéril de 1.5 mL adicionou-se o reagente de estabilização de RNA, tendo-se agitado por 15 segundos e posteriormente incubado por 5 minutos à temperatura ambiente.

Recolheram-se as células bacterianas por centrifugação a 9000 rpm, durante 10 minutos, numa centrífuga (Biofuge pico Heraeus, DJB Labcare Ltd), tendo-se decantado o sobrenadante.

Ressuspendeu-se o pellet bacteriano em 100 μ L de tampão TE (10 mL de Tris-HCL, 1 mL de EDTA, pH 8.0) e 400 μ g/mL de lisozima, deixando-se incubar durante 5 minutos.

De seguida preparou-se o tampão RLT, com a junção de β - Mercaptoetanol na proporção de 1% (v/v) (1 μ L de β - Mercaptoetanol em cada 100 μ L de RLT), procedimento este realizado na *hotte*, devido à toxicidade do último. Seguidamente foi adicionado 500 μ L de tampão RPE.

Após este passo, foram adicionados a cada amostra 350 μ L de RLT com β -Mercaptoetanol, tendo-se agitado bem até o líquido ficar translúcido, centrifugou-se a 13 000 rpm durante 2 minutos.

Transferiu-se o sobrenadante para um microtubo estéril de 1.5 mL com um volume aproximado de 450 μ L, e adicionou-se 250 μ L de etanol puro (96 a 100%), homogeneizou-se por pipetagem.

Depois dos primeiros passos de preparação das amostras, o volume total de cerca de 700 μ L foi transferido para uma coluna mini *RNAeasy* adaptada a um microtubo de 2 mL.

A amostra foi então centrifugada a 13000 rpm em 15 segundos. Desprezou-se o eluído que se encontrava no tubo de 2 mL reaproveitando-se o mesmo.

É de salientar que se efectuou um passo opcional intermédio que diz respeito à digestão com DNase, de forma a evitar contaminações.

Foi preparado uma solução contendo tampão RDD num volume total de 70 μL e adicionado 10 μL de DNase I (1500 unidades em 550 μL de *RNase-free* água (H_2O)), misturou-se bem invertendo o tubo.

Adicionou-se primeiramente 350 μL de tampão RW1 à coluna Rneasy e centrifugou-se durante 15 segundos a 13000 rpm, descartando-se o sobrenadante.

Depois aplicou-se a solução de DNase e RDD directamente na coluna e deixou-se incubar a 37°C durante 30 minutos.

Após este período, foi adicionado novamente 350 μL de RW1 à coluna e voltou-se a centrifugar a 13000 rpm durante 15 segundos, transferindo-se a coluna para um novo tubo colector de 2 mL.

Este passo opcional ficou concluído, e como tal prosseguiu-se o protocolo de extracção, adicionando-se 500 μL de tampão RPE com centrifugação posterior a 13000 rpm em 15 segundos. Desprezou-se o líquido e reutilizou-se o tubo colector.

Este passo foi novamente repetido, adicionando-se 500 μL de tampão RPE e centrifugou-se nas mesmas condições para eliminar os resíduos de etanol da coluna.

A coluna foi transferida para um microtubo estéril de 1,5 mL e foi-lhe adicionado 40 μL de H_2O *Rnase-free*, centrifugando-se a 13000 rpm por 1 minuto.

Voltou-se a repetir este último passo, juntando-se novamente 40 μL de H_2O , centrifugando-se nas mesmas condições, obtendo-se um volume final de extracção de 70 μL , com cerca de 70 μg de RNA total, o que corresponde a uma solução de 1 μg RNA/ μL , e conservou-se a 4°C.

11. Análise génica das estirpes clínicas por qRT-PCR

Este método de reacção de polimerização em cadeia com transcrição reversa, permite detectar mRNA em pequenas quantidades. Torna possível a amplificação enzimática de sequências definidas de RNA, permitindo quantificar os mRNAs e desta forma, verificar a presença de alterações na expressão de genes relativamente a uma estirpe controlo.

O primeiro passo deste método corresponde à passagem do mRNA para cDNA, para permitir ser amplificado por PCR de forma exponencial, pelo que é necessária a enzima transcriptase reversa (RT).

A RT, também designada DNA polimerase RNA dependente, é uma enzima DNA polimerase que transcreve o RNA de cadeia simples em DNA de cadeia dupla.

O PCR em tempo real permite quantificar o produto de amplificação de cada ciclo de forma imediata utilizando um marcador fluorescente, que se intercala nas cadeias duplas de DNA, que se designa SYBR Green (Qiagen). A amplificação e a respectiva fluorescência detectada corresponde à quantidade de DNA produzido em cada ciclo.

Os *primers* testados para as estirpes clínicas foram o *acrA*, *acrB*, *acrE*, *acrF*, *emrB*, *yhiV*, *marA* e como *housekeeping gene* o Gap A1 (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) que codifica para uma enzima interveniente na glicólise. Os *primers* utilizados neste trabalho encontram-se descritos na Tabela III.6. O Gap A1 é utilizado uma vez que é possível com este comparar de forma relativa os genes testados para a estirpe clínica e estirpe controlo, pois este gene apresenta uma variabilidade mínima na expressão.

Gene	Primer (5'-3')	Amplificação (pares de bases)
<i>marA</i>	CATAGCATTTTGGACTGGATTACTTTCCTTCAGCTTTTGC	187
<i>yhiV</i>	GCACTCTATGAGAGCTGGTCCCTTCTTTCTGTTTCAGTAGCC	203
<i>emrB</i>	ATTATGTATGCCGTCTGCTTTTCGCGTAAAGTTAGAGAGG	196
<i>acrF</i>	TAGCAATTTCTTTGTGGTTCCTTTACCCTCTTTCTCCAT	247
<i>acrB</i>	CGTACACAGAAAGTGCTCAACGCTTCAACTTTGTTTTCTT	183
<i>acrA</i>	CTTAGCCCTAACAGGATGTGTTGAAATTACGCTTCAGGAT	189
<i>GAPDH</i>	ACTTACGAGCAGATCAAAGCAGTTTCACGAAGTTGTCGTT	170
<i>acrE</i>	GCCCTCCTTTATTCTGATCTGGCTATACGATAAGCATTGG	166

Tabela III. 6 - Sequências nucleotídicas dos *primers* usados na metodologia qRT - PCR, e respectivos amplicões utilizados neste trabalho. (Viveiros *et al*, 2007).

O RT-PCR em Tempo Real foi realizado através do *QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit* (Qiagen), no termociclador Rotor-GeneTM (Corbett Research).

Neste sistema é preparada uma mistura (*MIX*) que contém *RNAse-free water*, tampão de reacção *quantitect* e enzima RT, e cujo volume é calculado para o número de reacções a realizar, sendo de salientar que toda a preparação das soluções foi efectuada com conservação dos compostos em gelo.

Depois da *MIX* preparada, esta foi distribuída em igual volume pelos tubos de 0.1 mL que correspondem aos genes a testar, em duplicado (estirpe controlo e estirpe clínica).

Os *primers* foram depois adicionados (left/right) em cada tubo de reacção e foi também usado um controlo de DNA e controlo negativo. Para o controlo de DNA, a *MIX* foi preparada individualmente sem a enzima RT.

Após a preparação dos tubos de reacção, foi adicionado o mRNA de cada estirpe exceptuando o controlo negativo. Para os controlos foram também utilizados *primers* aleatórios.

Os tubos de reacção foram colocados no termociclador Rotor-Gene™, reacção com duração de aproximadamente 202 minutos.

Os primeiros 30 minutos correspondem ao passo da transcrição reversa a uma temperatura de 50°C, e de seguida a activação inicial do PCR a 95°C durante 15 minutos.

Seguem-se 35 ciclos que correspondem à desnaturação, emparelhamento, extensão de 60 segundos cada, e a temperaturas de 94°C, 52°C, 72°C respectivamente.

No final da reacção são efectuados dois passos adicionais, o primeiro de 5 minutos a 72°C e o segundo de 15 segundos a 50°C. Para a quantificação do mRNA de cada gene, foi utilizado o método CT (*Comparative Threshold Cycle*) tendo-se normalizado os dados os dados através da expressão matemática: $2^{-(\Delta C_{Pamostra} - \Delta C_{ppreferência})}$.

A forma de se poder controlar a quantidade de DNA complementar obtido que corresponde ao mRNA inicial da amostra, é estabelecendo uma comparação entre o gene *housekeeping* e a expressão de cada gene estudado, assim, é possível reduzir a influência de factores como a quantidade de RNA obtido em cada extracção e a eficiência da amplificação (Viveiros *et al*, 2005 e 2007).

IV.RESULTADOS

1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) das estirpes clínicas para os inibidores de BEs (EPIs)

Antes de se poder iniciar o nosso trabalho experimental e no sentido de se efectuar a caracterização biológica, fenotípica e genotípica dos mecanismos de resistência intrínseca aos antibióticos por sobre-expressão de BEs em estirpes de *E. coli* sujeitas a pressão antibiótica prolongada em ambiente hospitalar, há que determinar os limites de efectividade de cada um dos compostos a utilizar neste trabalho de forma a garantir que as concentrações utilizadas não afectam a viabilidade celular mas apenas a actividade de efluxo (Viveiros *et al*, 2005).

Por este motivo e como descrito previamente nos materiais e métodos, foram determinadas as CMIs e as CMBs para os EPIs a serem utilizados neste trabalho, de forma a ser possível testar o seu efeito como inibidores das BEs em estirpes de *E. coli* multirresistentes. Estes ensaios foram realizados em duplicado, sendo os resultados concordantes entre ensaios.

Assim sendo, apresenta-se na Tabela IV.1 e IV.2, os valores encontrados para as CMIs e CMBs dos compostos utilizados na realização dos ensaios, para o caso particular de cada estirpe *E. coli* MDR estudada neste trabalho e estirpes controlo.

<i>E. coli</i>	CPZ		VP		TZ		CCCP		PAN	
	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)								
AG100	60	ND	> 3000	> 3000	100	>100	10	>10	>100	>100
AG100A_{TET}	100	ND	> 3000	> 3000	120	>120	20	>20	>100	>100
5	50	50	>1500	>1500	85	170	>20	>20	500	>500
9	50	50	>1500	>1500	100	100	>20	>20	>100	>100
12	50	100	>1500	>1500	100	100	>20	>20	>100	>100
13	50	50	>1500	>1500	100	100	>20	>20	500	>500
14	50	50	>1500	>1500	100	100	>20	>20	>100	>100
16	100	100	>1500	>1500	100	100	>20	>20	250	>250
18	50	50	>1500	>1500	100	100	>20	>20	>100	>100
19	50	50	>1500	>1500	100	100	>20	>20	500	>500

Tabela IV. 1 - CMI dos EPIs para as estirpes clínicas. **Legenda:** > superior à concentração; CPZ-Clorpromazina; TZ-Tioridazina; VP-Verapamil; CCCP-carbonyl cyanide *m-chlorophenylhydrazone*. PAN- *L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide*.

<i>E. coli</i>	EDTA		EtBr	
	CMI (mM)	CMB (mM)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)
AG100	ND	ND	150*	>150
AG100A_{TET}	ND	ND	>200*	>200
5	1,87	30	>50	> 50
9	1,87	30	>50	> 50
12	0,93	3,75	>50	>50
13	0,93	30	>50	>50
14	0,93	0,93	>50	>50
16	0,93	30	>50	> 50
18	0,93	1,87	>50	>50
19	30	30	>50	> 50

Tabela IV. 2 - CMI de outros compostos testados para as estirpes clínicas. **Legenda:** > superior. EDTA- ácido etileno diamino tetracético; EtBr- Brometo de etídeo. ND- não determinado.

* Valores determinados em Viveiros *et al*, 2005. *Inducement and reversal of tetracycline resistance in E. coli K-12 and expression of proton gradient-dependent multidrug efflux pump genes*. AAC; 49(8): 3578-3582.

Após determinados os valores das CMIs para cada composto, foi utilizada a ½ CMI para cada um deles, de acordo com os resultados para cada estirpe. Deve-se fazer

referência que no caso do VP, utilizou-se para todas as estirpes clínicas, a ½ CMI para a AG100, pois o valor para as estirpes clínicas seria demasiado elevado, assim como o valor de CCCP utilizado foi ½ CMI para a AG100, neste caso por este composto demonstrar efeito inibitório do crescimento em estudos anteriores.

A concentração de EtBr utilizada nos ensaios de fluorimetria foi de 3 µg/mL, logo este valor é bastante inferior ao valor da CMI para todas as estirpes o que permite dizer que a concentração utilizada não influencia o crescimento da estirpe.

As CMIs para os EPIs não apresentaram divergência entre ensaios e mostraram-se semelhantes entre estirpes. Uma vez calculada a CMI ou o seu limite máximo, utilizou-se então a concentração referente a ½ de CMI para que nunca ocorresse inibição do crescimento da estirpe por acção directa do EPI. Há que garantir em cada ensaio, a actuação do EPI por si só, não tendo assim um efeito directo sobre a viabilidade das estirpes bacterianas (Viveiros *et al*, 2005 e 2007).

2. Método de Screening de BEs - *EB-Agar Cartwheel Method*

O método *EB-Agar Cartwheel Method* tem como objectivo a detecção rápida de estirpes bacterianas com aumento da actividade de BEs, sendo particularmente útil para se efectuar o despiste de estirpes bacterianas MDR (Martins *et al*, 2006). As oito estirpes de *E. coli* MDR disponibilizadas pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital dos SAMS foram recultivadas em riscado efectuado sobre placas de TSA contendo concentrações crescentes de EtBr, (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 µg/mL), (Figura IV.1). Para cada placa efectuou-se um riscado de duas estirpes de referência comumente usadas no Laboratório de Micobactérias do IHMT, a estirpe *E. coli wild-type* (AG100 ou K12- ATCC23716) que possui o nível de referência basal de actividade

das BEs e a estirpe *E. coli* AG100A_{TET} genotipicamente e fenotipicamente descrita como sobre-expressando BEs que bombeiam activamente EtBr (Viveiros *et al*, 2005 e 2007).

Depois de incubadas por 16h a 18h a 37°C e observadas num transiluminador para registo da fluorescência emitida por cada estirpe, comparativamente às estirpes controlo, as estirpes consideradas como tendo um aumento da actividade das BEs são as que apresentam fluorescência a uma concentração de EtBr maior que a estirpe controlo *E. coli wild-type* AG100, dado que esta sobre-expressão as capacita de efluxarem mais EtBr do que a estirpe de referência (Figura IV.2). O controlo positivo de efluxo (*E. coli* AG100A_{TET}) fornece o referencial experimental de maior actividade de efluxo, uma vez que as suas colónias necessitam de concentrações superiores a 2.5 µg/mL de EtBr para fluorescerem, dada a elevada sobre-expressão de BEs desta estirpe, responsável por bombear activamente o EtBr para o exterior das células (Viveiros *et al*, 2005 e 2007).

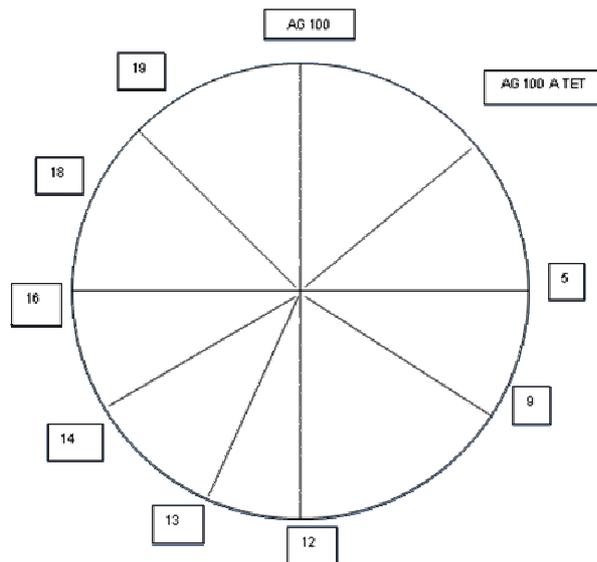
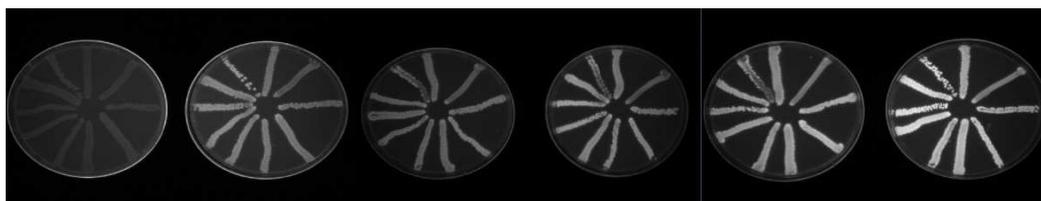


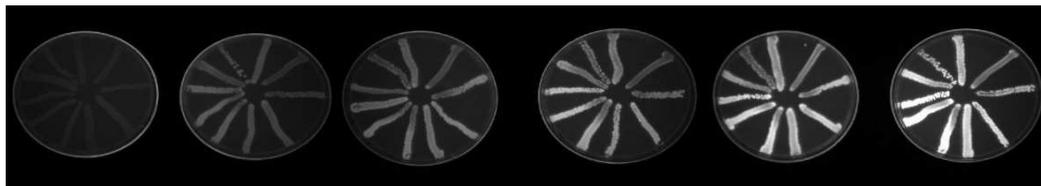
Figura IV.1-Representação esquemática da localização das estirpes nas placas utilizadas no método de *Screening* de BEs.

A.



EtBr [0 µg/mL] EtBr [0.5 µg/mL] EtBr [1.0 µg/mL] EtBr [1.5 µg/mL] EtBr [2.0 µg/mL] EtBr [2.5µg/mL]

B.



EtBr [0 µg/mL] EtBr [0.5 µg/mL] EtBr [1.0 µg/mL] EtBr [1.5 µg/mL] EtBr [2.0 µg/mL] EtBr [2.5 µg/mL]

FiguraIV.2- Placas de TSA com EtBr com concentrações de 0 a 2.5 µg/mL – análise das estirpes clínicas e controles de efluxo. **A.** Após incubação a 37°C, **B.** Após manutenção a 4°C.

A Tabela IV.3, representa a concentração inicial de fluorescência das estirpes clínicas, quer a 37°C quer a 4°C.

Estirpe <i>E. coli</i> MDR	Concentração inicial de fluorescência (µg/mL)	
	37°C	4°C
AG100	1.0	1.0
AG100A_{tet}	>2.5	>2.5
5	2.0	2.0
9	0.5-1.0	0.5-1.0
12	0.5-1.0	0.5-1.0
13	1.5-2.0	2.0
14	0.5-1.0	0.5-1.0
16	1.5-2.0	2.0
18	0.5-1.0	1.0
19	2.0-2.5	2.5

Tabela IV.3- Concentração inicial de fluorescência das estirpes *E. coli* MDR em placas de TSA com EtBr com concentrações de 0 a 2.5 µg/mL, após incubação a 37°C e 4°C.

A aplicação deste método permitiu verificar que das 8 estirpes em estudo, 4 evidenciaram fluorescência a concentrações mais elevadas de EtBr, comparativamente à estirpe controlo *E. coli* AG100. O controlo positivo de efluxo, a estirpe AG100A_{TET} demonstrou, conforme esperado, necessitar de valores superiores a 2.5 µg/mL de EtBr para fluorescer.

Assim, as estirpes seleccionadas para prosseguimento do trabalho foram as estirpes *E. coli* MDR 5, 13, 16, e 19, tendo-se excluído as *E. coli* 9, 12, 14 e 18, que como é possível observar pelas imagens da Figura IV.2, fluorescem a concentrações de EtBr idênticas ou menores do que a estirpe *wild-type* e as restantes estirpes clínicas, permitindo inferir que estas estirpes têm menor sobre-expressão de genes codificantes para BEs que as restantes e como tal excluíram-se do estudo.

Embora as fotografias da Figura IV.2 não permitam uma visualização clara das diferenças de fluorescência, era evidente ao olho do observador, que as estirpes *E. coli* MDR 9, 12, 14 e 18 fluoresciam aos 0.5 µg/mL ou a 1 µg/mL de EtBr, enquanto a estirpe *wild-type* tinha fluorescência visível a 1 µg/ml.

As restantes estirpes evidenciavam fluorescência a 1.5 µg/ml e superior. De notar que as estirpes *E. coli* MDR 5 e 19 foram as que apresentaram fluorescências a valores mais elevados (2 µg/ml e superior).

Assumindo válido o pressuposto da nossa hipótese de trabalho de que um nível de fluorescência idêntico ou abaixo da verificada para a estirpe controlo *E. coli wild-type* não evidencia sinais fenotípicos de sobre-expressão de BEs, coloca-se a hipótese do seu fenótipo de resistência aos antibióticos ocorrer por outros mecanismos, nomeadamente genéticos, e como tal afasta-se do objectivo definido para este trabalho, pelo que as estirpes *E. coli* MDR 9, 12, 14 e 18 não foram incluídas nos estudos posteriores.

Como descrito nos materiais e métodos, a fluorescência foi registada tanto a 37°C como a 4°C, sendo possível observar uma maior fluorescência de todas as estirpes a 4°C, evidência relacionada com o facto de se suprir a energia por diminuição da temperatura e assim obrigar as BEs a reduzirem a sua actividade o que promove a acumulação de EtBr no interior das células. A visualização da fluorescência das colónias depois de transferidas para 4°C, permite aumentar a sensibilidade da diferença visual da fluorescência e confrontar os dados obtidos a 37°C. No entanto, onde se observa uma maior diferença em termos de visualização de fluorescência, é numa concentração de 2.0 µg/mL.

Este método permite apenas uma avaliação em termos fenotípicos das estirpes, a partir do qual se seleccionou as estirpes para as metodologias seguintes, que por sua vez, vão permitir validar ou excluir a hipótese destas estirpes clínicas MDR, fluorescerem a concentrações mais elevadas de EtBr em placas gelosadas por actividade aumentada das suas BEs devido a uma sobre-expressão das mesmas, a qual estará directamente relacionada com o fenótipo de multirresistência.

3. Método de *Screening* da actividade dos EPIs

Como já referido no capítulo Materiais e Métodos, este método permite visualizar quais os EPIs, que ao se associarem aos antibióticos, permitem a reversão ou redução da resistência em cada estirpe, efeito este observado pela turvação ou ausência desta visualizada nas placas de 24 poços.

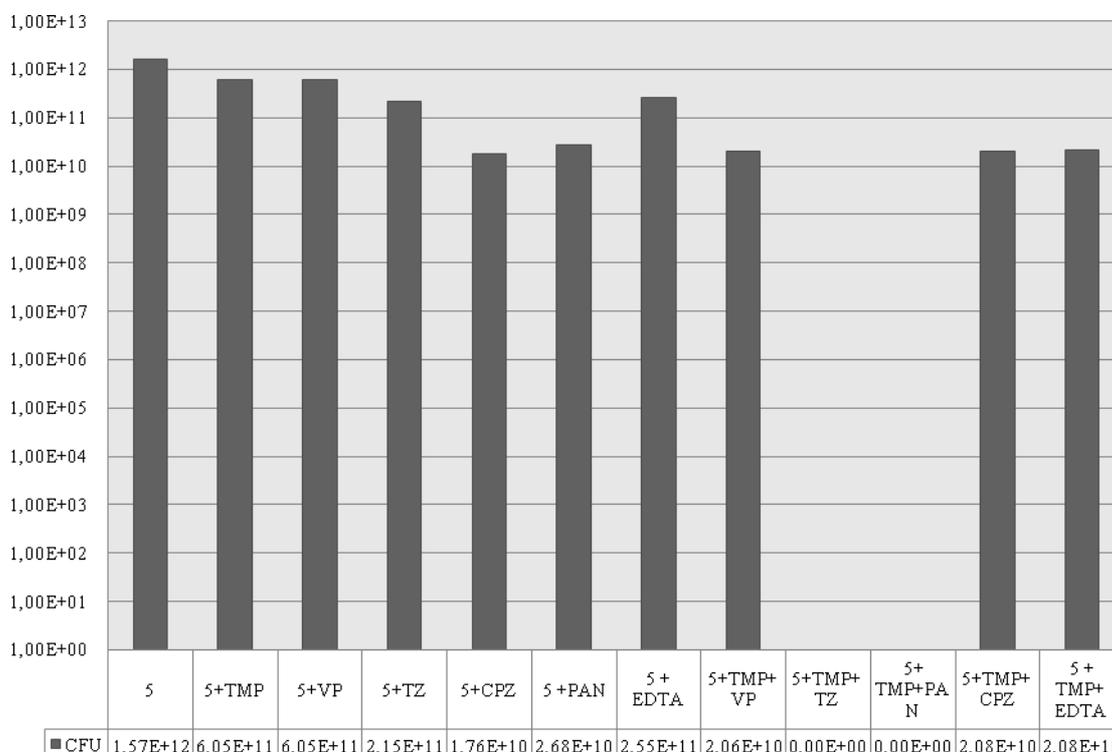
Assim, e porque os compostos utilizados são inibidores de BEs, permite-nos inferir que o mecanismo de multirresistência associado às estirpes *E. coli* MDR está relacionado com a sobre-expressão de BEs ao se observar uma redução ou reversão

dessa resistência. Foram então testadas as quatro estirpes clínicas MDR *E. coli* seleccionadas no ensaio anterior, por este método de *screening*, tendo-se testado quatro antibióticos (CIP, GEN, TMP, AMP), de acordo com o perfil de resistências apresentada por cada estirpe (Ver Tabela III.2 do capítulo Material e Métodos).

A estes adicionaram-se os EPIs e foi possível observar e quantificar o seu efeito em relação aos controlos, através da contagem das UFCs, possível pelas diluições seriadas dos poços, sendo os dados apresentados em escala logarítmica.

Salienta-se que os ensaios com resultados desejados foram repetidos por três a quatro vezes com concordância, e demonstrou-se que nas quatro estirpes clínicas se observa redução ou reversão da resistência. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras IV.3 a IV.7.

E. coli 5

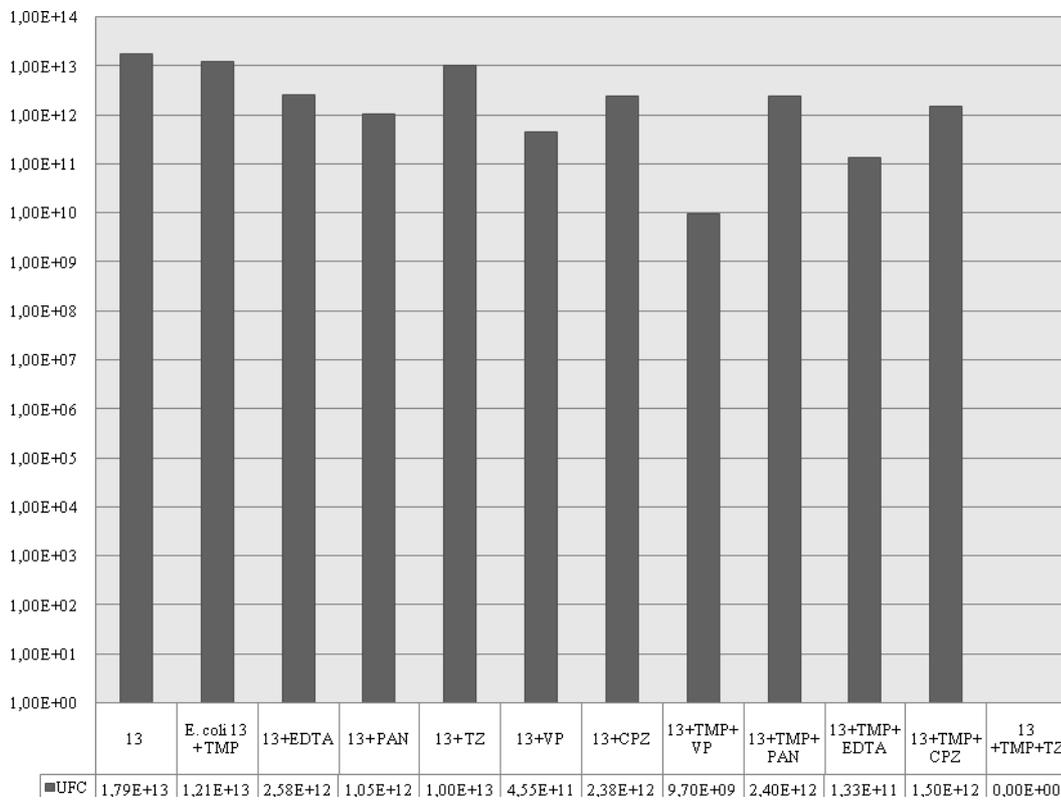


FiguraIV.3 – Contagem das UFCs para a estirpe MDR *E. coli* 5, na presença do disco de antibiótico (TMP) e EPIs. Os dados representados correspondem à média de três ensaios independentes. **Legenda:** TMP- Trimetoprim; VP- Verapamil; TZ- Tioridazina; CPZ- Clorpromazina; PAN- *L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide* (PAN); EDTA- ácido etileno diamino tetracético.

A estirpe MDR *E. coli* 5 (1.57E+12), quando testada para a reversão da sua resistência ao trimetoprim, observou-se que houve reversão da resistência quando se usou o PAN e a TZ (0.00E+00), facto este confirmado pela ausência de crescimento nos plaqueamentos.

Para os outros EPIs não foi possível observar efeito na reversão ou redução da resistência, observando-se crescimento de colónias aquando os plaqueamentos.

***E. coli* 13**



FiguraIV.4- Contagem das UFCs para a estirpe MDR *E. coli* 13, na presença do disco de antibiótico (TMP) e EPIs. Os dados representados correspondem à média de três ensaios independentes. **Legenda:** TMP-Trimetoprim; VP-Verapamil; TZ-Tioridazina; CPZ-Clorpromazina; PAN- *L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide*; EDTA- ácido etileno diamino tetracético.

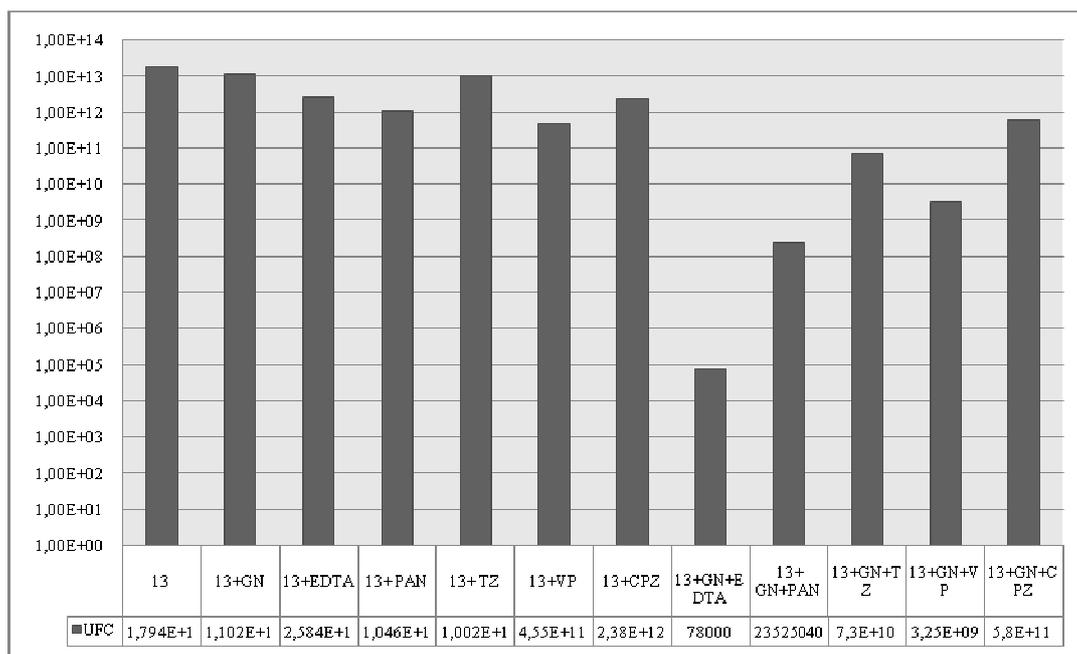
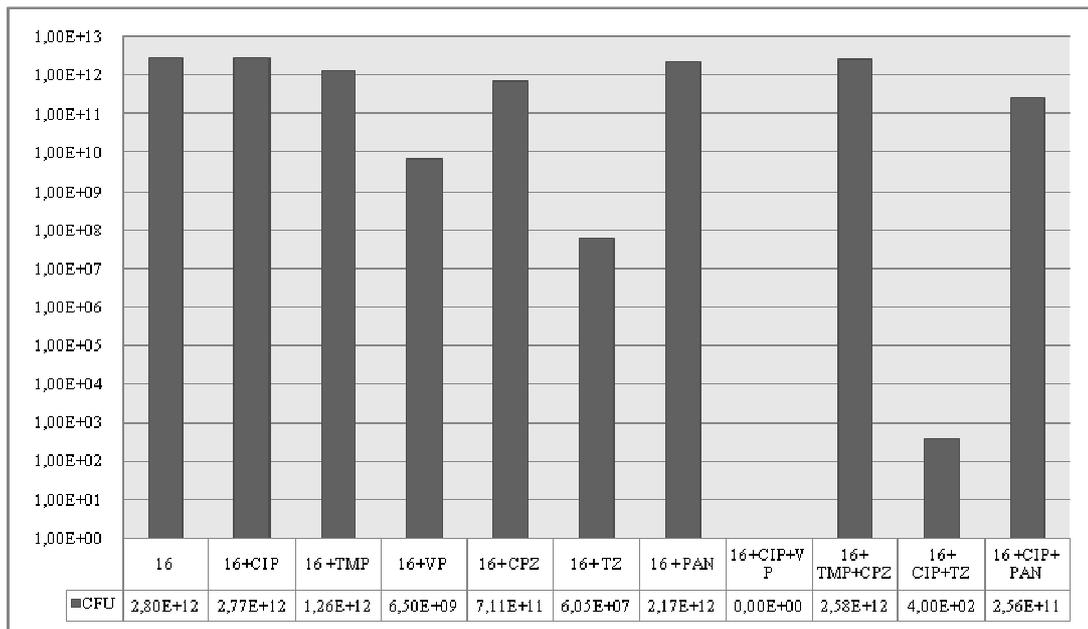
***E. coli* 13**

Figura IV. 5- Contagem das UFCs para a estirpe MDR *E. coli* 13, na presença do disco de antibiótico (GEN) e EPIs. Os dados representados correspondem à média de três ensaios independentes. **Legenda:** GEN-gentamicina; VP-Verapamil; TZ-Tioridazina; CPZ-Clorpromazina; PAN- *L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide*; EDTA- ácido etileno diamino tetracético.

Quando testada, a *E. coli* 13 (1.79E+13), observou-se reversão da resistência para o trimetoprim com a adição da TZ (0.00E+00), e redução da resistência para a gentamicina com a adição do PAN (8.00E+02), e do EDTA (7.8E+04), este último com maior efeito na redução.

Os restantes EPIs demonstraram-se ineficazes na tentativa de reversão da resistência aos antibióticos para esta estirpe.

***E. coli* 16**

FiguraIV.6- Contagem das UFCs para a estirpe MDR *E. coli* 16, na presença do disco de antibiótico (CIP) e EPIs. Os dados representados correspondem à média de três ensaios independentes. **Legenda:** CIP-Ciprofloxacina; VP-Verapamil; TZ-Tioridazina; CPZ-Clorpromazina; PAN-*L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide*.

No que diz respeito à *E. coli* 16 (2.8E+12), houve reversão para a resistência à ciprofloxacina com a adição do VP (0.00E+00), e efeito de redução da resistência ao se adicionar a TZ (4.00 E+02).

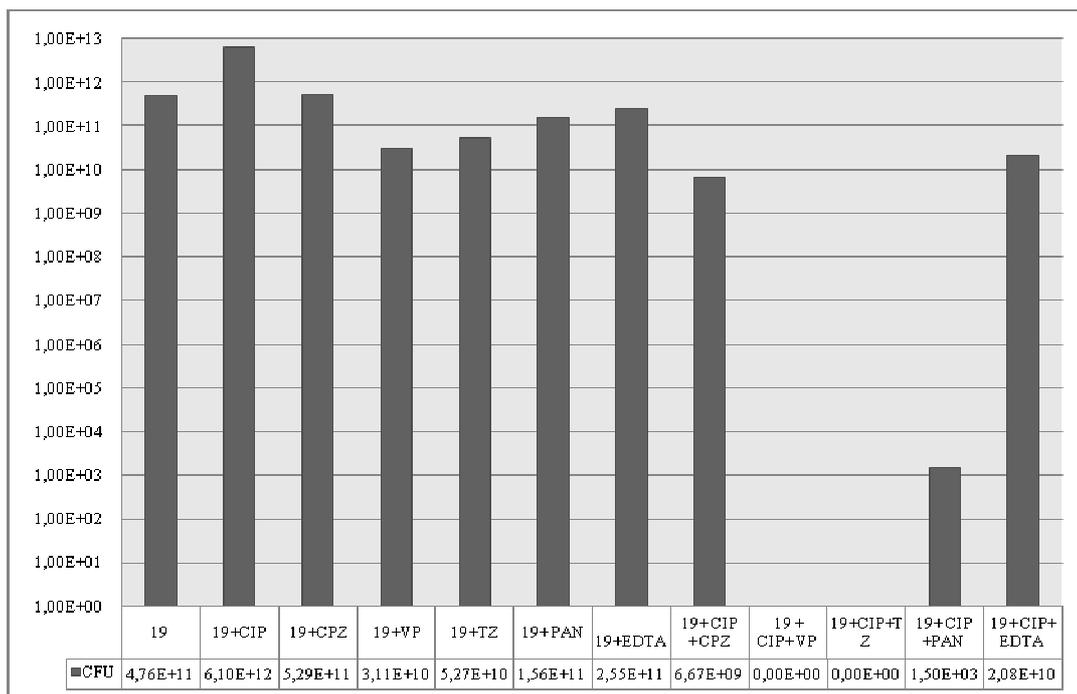
***E. coli* 19**

Figura IV. 7 - Contagem das UFCs para a estirpe MDR *E. coli* 19, na presença do disco de antibiótico (CIP) e EPIs. Os dados representados correspondem à média de três ensaios independentes. **Legenda:** CIP-ciprofloxacina; VP-Verapamil; TZ-Tioridazina; CPZ-Clorpromazina; PAN- *L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide*; EDTA- ácido etileno diamino tetracético.

No caso da *E. coli* 19 (4.76E+11), foi possível observar a reversão da resistência à ciprofloxacina com a adição da TZ e do VP (0.00E+00), e redução com o PAN (1.50E+03).

Com estes resultados é possível inferir que os EPIs que demonstraram maior efeito foram a TZ e o VP, e que nenhuma das estirpes testadas apresentou reversão ou redução da resistência na presença de CPZ ou CCCP, não se encontrando o CCCP representado graficamente, embora este último também tenha sido testado.

Este método apresenta apenas a desvantagem de se observar o efeito do erro de pipetagem inerente à sua execução, o que é possível verificar na contagem das UFCs nos controlos da estirpe com o antibiótico comparativamente com os restantes EPIs,

tendo-se considerado que até um log inferior na escala logarítmica, não é considerado efeito inibitório de crescimento da estirpe.

Através deste método de execução simples é possível verificar que as estirpes clínicas MDR seleccionadas confirmam o ensaio anterior, ou seja, apresentam sobre-expressão das BEs, isto porque os antibióticos testados são substratos de BEs para *E. coli*, e os EPIs testados são inibidores dessas mesmas bombas.

4. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) das estirpes clínicas para os antibióticos na presença dos EPIs

Após a selecção dos EPIs com resultados nas estirpes clínicas no ensaio anterior, foi possível obter resultados para as quatro estirpes clínicas *E. coli* MDR no que diz respeito à reversão ou redução da resistência.

Para estas quatro estirpes foram então determinadas as CMIs e CMBs para os antibióticos testados e respectivos EPIs que tiveram efeito na redução/reversão da resistência (Tabelas IV.5; IV.6 e IV.7).

<i>E. coli</i>	TMP		AMP		GEN		CIP	
	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)
AG100	0.62	1.25	7.8	7.8	1	2	0.03	0.03

Tabela IV.4 -CMIs e CMBs da estirpe controlo (AG100) para os antibióticos. **Legenda:** > superior; TMP- Trimetoprim; AMP- Ampicilina; GEN-Gentamicina; CIP-Ciprofloxacina.

Na Tabela IV.4, estão documentados os valores das CMIs e CMBs para a estirpe controlo AG100 para os quatro antibióticos em estudo.

De acordo com as normas do CLSI (CLSI, 2006), os *breakpoints* equivalentes à CMI são para o TMP ≤ 8 mg/L; GEN ≤ 4 mg/L; CIP ≤ 1 mg/L. Logo a partir destes valores é possível verificar qual o efeito inibitório dos EPIs testados para estes antibióticos nas estirpes clínicas em estudo.

<i>E. coli</i>	TMP		TMP + EPI					
			TZ		VP		PAN	
	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)
5	>750	>750	2.925	>750	2.925	> 750	>750	> 750
13	>750	>750	2.925	750	ND	ND	ND	ND

Tabela IV. 5 - CMIs e CMBs para as estirpes clínicas *E. coli* 5 e 13 do Trimetoprim e na presença ou ausência dos EPIs. **Legenda:** > superior; TMP- Trimetoprim; EPI- inibidor de BEs; TZ- Tioridazina; VP-Verapamil; PAN- *L-Phe-L-Arg- β -naphthylamide*; ND- não determinado por não haver efeito de reversão ou redução da resistência no método de *screening* da actividade dos EPIs (sub-secção anterior).

Para a *E. coli* 5, observou-se uma redução na CMI do trimetoprim com o VP e TZ, embora para o PAN tal não ocorreu. Em meio líquido no método de *screening* foi possível observar reversão da resistência para a TZ e PAN nesta estirpe, embora não se tenha observado qualquer efeito com o VP. No entanto, também foi possível constatar, que os CMBs para este antibiótico na *E. coli* 5 demonstram crescimento de colónias na placa com a concentração inicial testada, não demonstrando efeito bactericida.

Para o trimetoprim na presença da TZ, a estirpe clínica *E. coli* 13, viu reduzida a CMI para um valor que tornava a estirpe susceptível, no entanto o CMB apresentou o valor da concentração inicial testada.

<i>E. coli</i>	GEN		GEN + EPI			
			EDTA		PAN	
	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)
13	64	64	4	4	>64	>64

Tabela IV. 6- CMIs e CMBs para a estirpe clínica *E. coli* 13 da gentamicina e na presença ou ausência dos EPIs. **Legenda:** > superior; GEN- Gentamicina; EPI- inibidor de BEs; EDTA- ácido etileno diamino tetracético; PAN- *L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide* (PAN).

Ainda para a *E. coli* 13, observou-se uma redução na CMI da gentamicina na presença do EDTA para um valor que torna a estirpe susceptível à acção do antibiótico. No entanto na presença do PAN, tal não ocorreu.

<i>E. coli</i>	CIP		CIP+ EPI							
			TZ		VP		PAN		CPZ	
	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/mL)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)
16	40	40	10	10	20	20	ND	ND	ND	ND
19	20	40	0.15	5	10	10	>40	> 40	5	40

Tabela IV. 7 - CMIs e CMBs para as estirpes clínicas *E. coli* 16 e 19 da ciprofloxacina (CIP) e na presença ou ausência dos EPIs. **Legenda:** > superior; CIP- Ciprofloxacina; EPI- inibidor de BEs; TZ- Tioridazina; VP-Verapamil; PAN- *L-Phe-L-Arg- β -naphthylamide*; CPZ- clorpromazina; ND- não determinado por não haver efeito de reversão ou redução da resistência no método de *screening* da actividade dos EPIs (sub-secção anterior).

No caso da *E. coli* 16, apenas foi observado ligeira redução na CMI para a CIP na presença do VP e TZ, esta redução não corresponde à reversão da resistência. No método de *screening* a TZ não demonstrou efeito de reversão/redução, ao se utilizar o método de determinação das CMIs, observa-se redução da mesma, embora a estirpe não passe a ser susceptível.

Finalmente para a estirpe clínica *E. coli* 19, observou-se redução no valor da CMI para a ciprofloxacina, na presença do VP, TZ e CPZ, EPIs com efeito de reversão em meio líquido, exceptuado a CPZ em que não foi possível observar redução ou reversão da resistência. Deve-se referir que apenas com a TZ a susceptibilidade da estirpe foi restaurada.

A aplicação do PAN na tentativa de restaurar a susceptibilidade das estirpes clínicas não foi bem sucedida.

Sendo a determinação da CMI em presença de EPIs a metodologia de referência aceite internacionalmente para a demonstração da actividade aumentada de BEs em

estirpes bacterianas (Pagès, 2007) esta veio a demonstrar a sua validade neste trabalho, tendo-se mostrado mais eficaz, concordante e reprodutível que a técnica anterior de detecção de efeito de reversão ou redução da resistência no método de *Screening* da actividade dos EPIs, que apesar de menos laboriosa e permitir testar maior número de compostos num mesmo ensaio e mais facilmente identificar EPIs activos para uma dada estirpe e um dado antibiótico, se revelou pouco rigorosa e com resultados discrepantes com a técnica de referência, a determinação da CMI em presença de EPIs. As discrepâncias mais óbvias foram observadas na actividade inibitória do PAN e presentemente não é possível encontrar explicação para tais discordâncias.

5.Método de *Screening* de BEs -EB - Agar Cartwheel Method / EPIs

Como já se fez referência no capítulo Materiais e Métodos, esta aplicação permite observar o efeito dos EPIs em que se obteve resultados de reversão/redução no método de *screening* para as estirpes clínicas inicialmente seleccionadas pelo Método de Screening de BEs, mas desta vez em meio sólido associando-se ao corante fluorescente, EtBr.

No caso da estirpe *E. coli* 5, o EPI que demonstrou um aumento significativo da fluorescência foi o VP, mais visível a partir de uma concentração de 1.0 µg/mL, enquanto no caso da TZ, observou um ligeiro aumento da fluorescência a partir de 1.5 µg/mL (Figura IV.8).

Também se deve realçar que quando as placas foram mantidas a 4°C, a fluorescência sofreu um aumento significativo, como é possível constatar na figura IV.9, o que nos indica que este processo é dependente de energia, e o funcionamento das BEs na

ausência desta é reduzido. O EPI TZ, demonstrou um ligeiro aumento da fluorescência aquando a 4°C, começando a demonstrar maior fluorescência a 1.0 µg/mL.

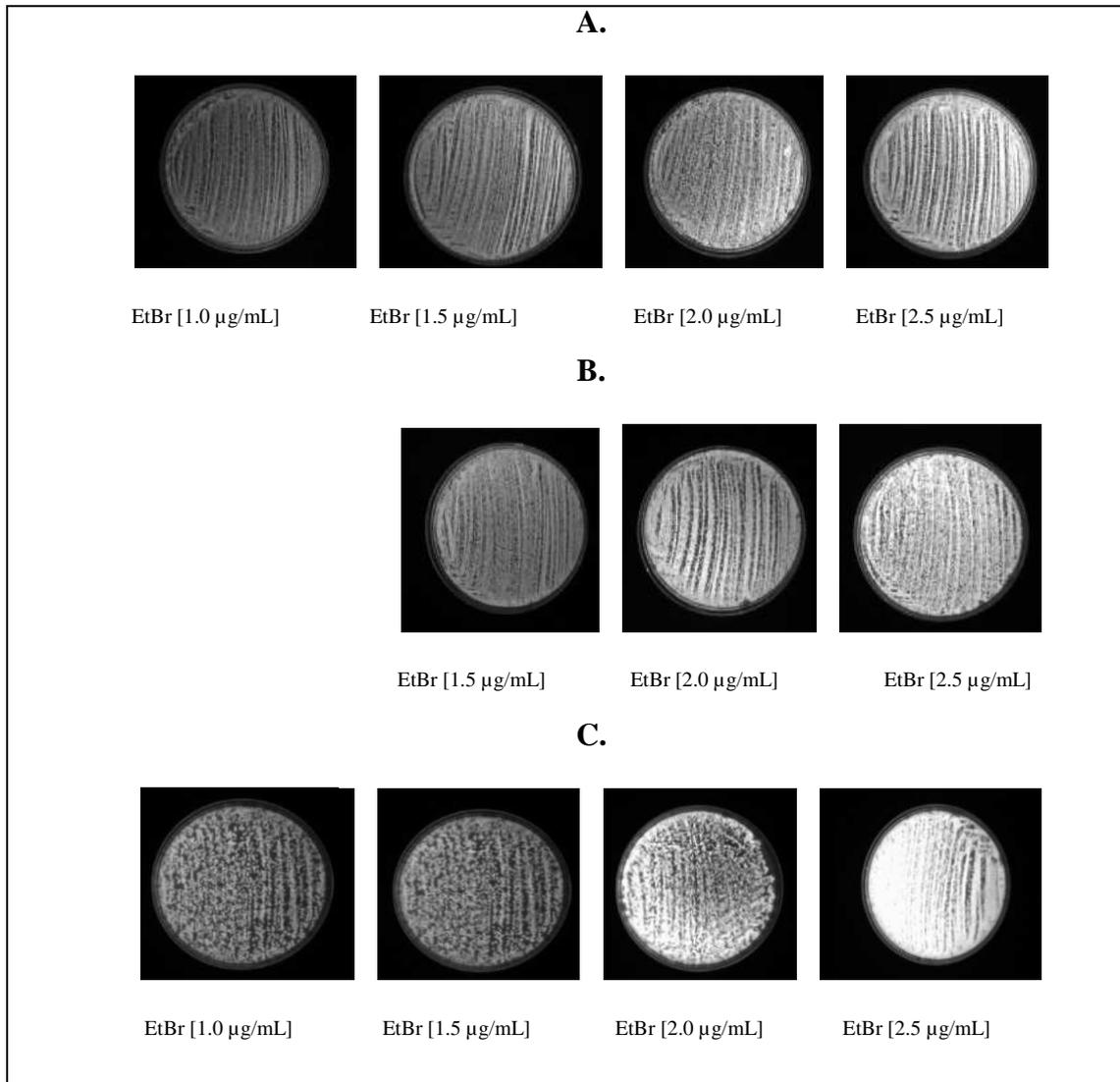


Figura IV. 8 - *E. coli* 5 em placas com EtBr e EPIs incubadas a 37°C. Imagem gravada Gel-doc XR (Bio-Rad Laboratories Inc.). **A.** *E. coli* 5 - placas EtBr; **B.** *E. coli* 5 -placas EtBr e TZ a ½ CMI; **C.** *E. coli* 5-placas EtBr e VP a ½ CMI. **Legenda:** EtBr- brometo de etídeo; []- concentração.

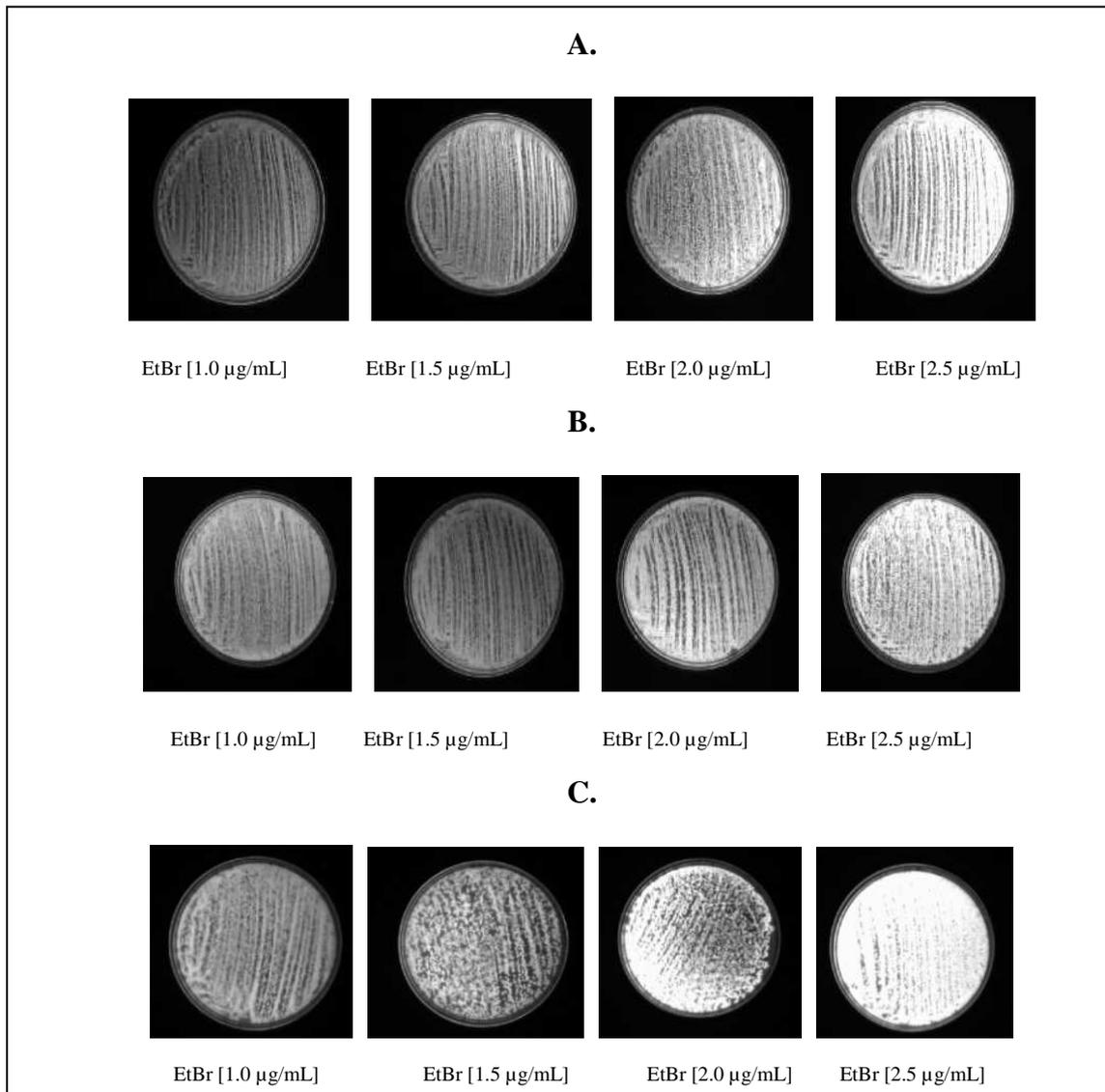


Figura IV. 9 - *E. coli* 5 em placas com EtBr e EPIs mantidas a 4°C. Imagem gravada Gel-doc XR (Bio-Rad Laboratories Inc.). **A.** *E. coli* 5-placas EtBr; **B.** *E. coli* 5-placas EtBr e TZ a ½ CMI. **C.** *E. coli* 5-placas EtBr e VP a ½ CMI. **Legenda:** EtBr- brometo de etídeo; []- concentração.

Para a estirpe MDR *E. coli* 13, foram testados os EPIs: EDTA, PAN e TZ. No entanto não foi possível detectar diferenças significativas em nenhum dos casos, não se apresentando aqui as imagens obtidas.

A estirpe clínica *E. coli* 16 quando inoculada em placas com EtBr e VP, incubadas a 37°C (Figura IV.10), o efeito demonstrado é também de maior fluorescência,

observando-se um aumento da fluorescência a uma concentração de 0.5 $\mu\text{g/mL}$, comparativamente à placa com EtBr e sem EPI. A fluorescência torna-se mais evidente nessa concentração, quando as placas são mantidas durante a noite a 4°C, ou seja ao eliminar a fonte de energia (Figura IV.11).

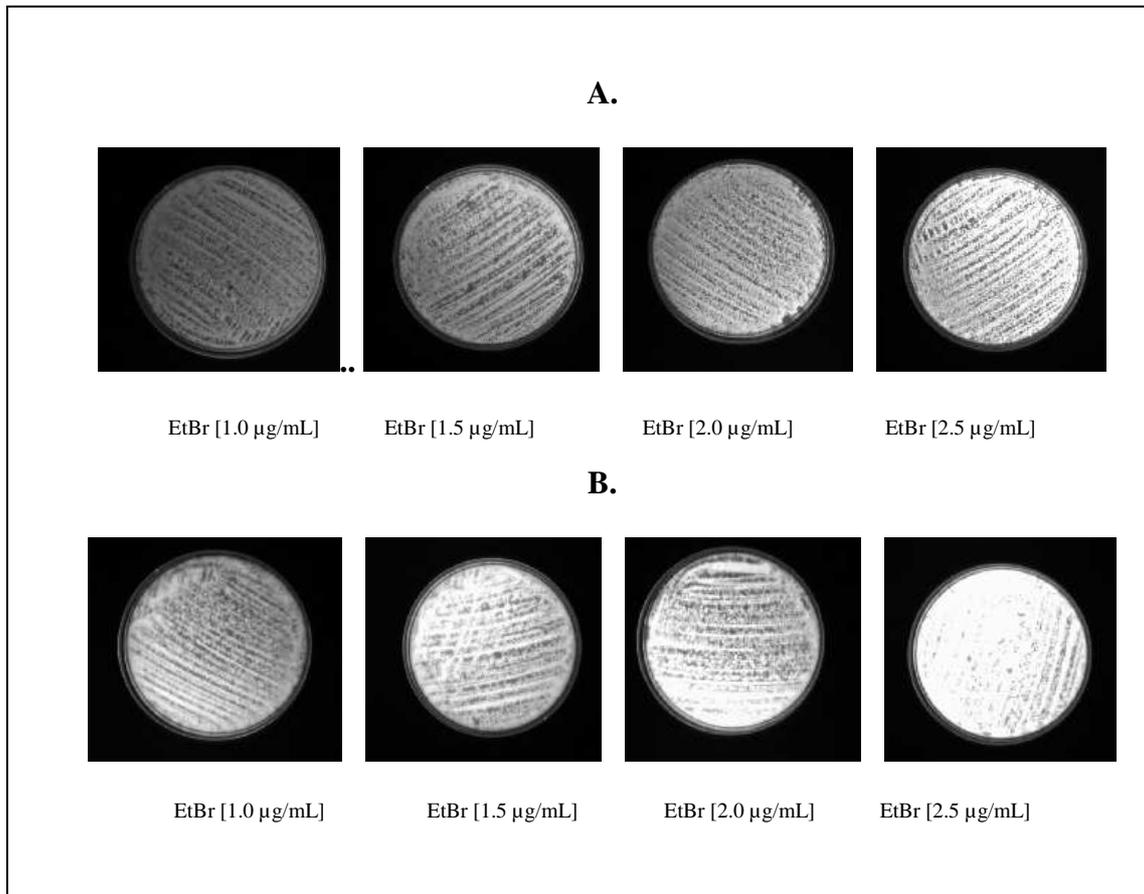


Figura IV. 10 - *E. coli* 16 em placas com EtBr e EPIs incubadas a 37°C. Imagem gravada Gel-doc XR (Bio-Rad Laboratories Inc.). **A.** *E. coli* 16-placas de EtBr; **B.** *E. coli* 16-placas de EtBr e VP a 1/2 CMI. **Legenda:** EtBr-brometo de etídeo; []-concentração.

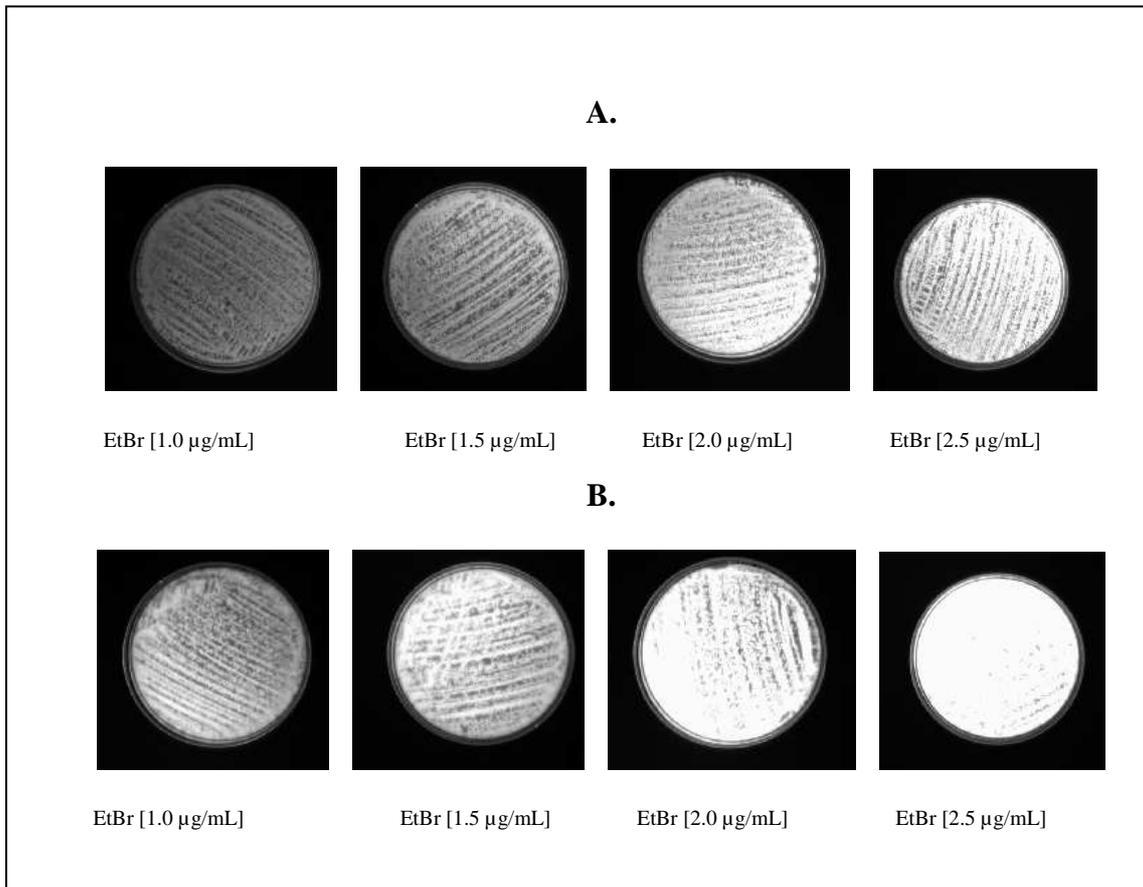


Figura IV. 11 - *E. coli* 16 em placas com EtBr e EPIs mantidas a 4°C. Imagem gravada Gel-doc XR (Bio-Rad Laboratories Inc.). **A.** *E. coli* 16-placas de EtBr; **B.** *E. coli* 16-placas de EtBr e VP a ½ CMI. **Legenda:** EtBr-brometo de etídeo; []-concentração.

Este método aplicado à estirpe *E. coli* 19, permitiu observar que após incubação a 37°C, as placas preparadas com EtBr e CPZ apresentavam uma fluorescência mais evidente que aquelas que só apresentavam EtBr a uma concentração de 1.0 µg/mL, nas mesmas concentrações, o que sugere que a CPZ têm afinidade para as BEs, conseguindo reduzir a sua expressão, como demonstrado na Figura IV.12.

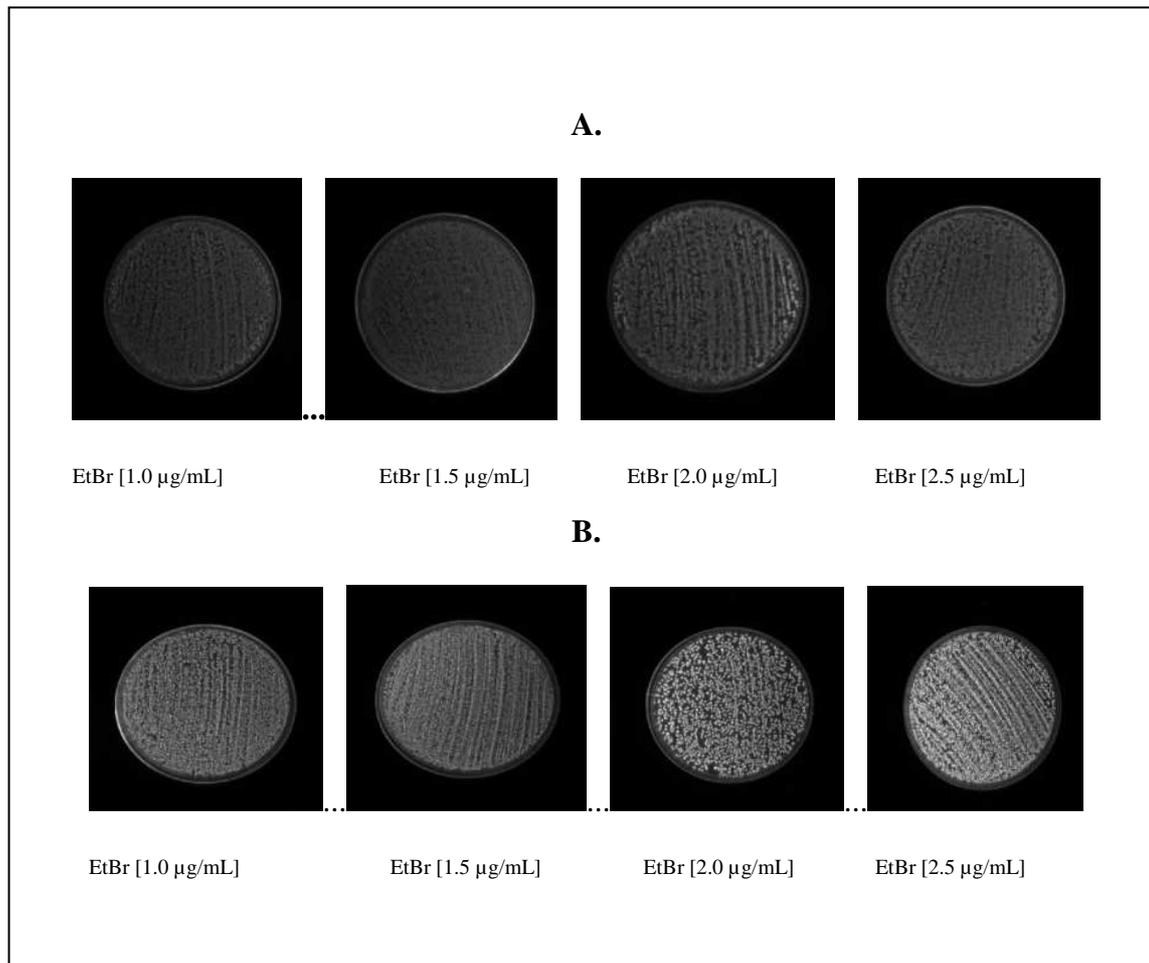


Figura IV.12 - *E. coli* 19 em placas com EtBr e EPIs incubadas a 37°C. Imagem gravada Gel-doc XR (Bio-Rad Laboratories Inc.). **A.** *E. coli* 19-placas EtBr; **B.** *E. coli* 19-placas EtBr e CPZ a ½ CMI. **Legenda:** EtBr-brometo de etídeo; []-concentração.

Em resumo, na tabela IV.6 apresenta-se as concentrações às quais o aumento da fluorescência nas placas preparadas com EtBr e EPI para cada estirpe clínica estudada foi visível comparativamente com as placas inoculadas apenas com EtBr.

Estirpe <i>E. coli</i> MDR		Concentração visível do aumento da fluorescência (µg/mL)	
		37°C	4°C
5	TZ	1.5	1.0
	VP	1.0	1.0
16	VP	1.0	1.0
19	CPZ	1.0	1.0

Tabela IV.8- Concentração visível do aumento da fluorescência em placas de EtBr e EPIs inoculadas com as estirpes clínicas, quer a 37°C como a 4°C. **Legenda:** TZ-Tioridazina; VP-Verapamil; CPZ-Clorpromazina.

6. Método de Kirby Bauer/Etest®

Dados os promissores resultados anteriores com o efeito dos EPIs em placas com EtBr decidiu-se avançar nesta fase do trabalho com o teste dos dois métodos clássicos de determinação de susceptibilidade em placa (o método de Kirby Bauer) e o de determinação da CMI em placa (o método de Etest®) agora adaptados para a observação do efeito dos EPIs em meio sólido, no sentido de complementar os resultados dos ensaios anteriores. Para o método de Kirby Bauer, o efeito não correspondeu ao verificado em meio líquido, ou seja o halo de inibição evidenciado não permitiu tornar as estirpes susceptíveis e verificou-se fraca correlação entre os resultados obtidos em meio líquido e os obtidos em meio sólido.

No entanto, quando testado o método de Etest®, verificou-se uma redução das CMI das estirpes clínicas de *E. coli* MDR e os três EPIs estudados. Na tabela IV.9 estão apresentados os resultados do Etest® para as estirpes clínicas MDR *E. coli*.

Foi possível observar uma redução na CMI para as estirpes *E. coli* 5 e *E. coli* 19, sobretudo na presença do VP, no entanto segundo os *breakpoints* do CLSI (CLSI,

2006), nenhuma das estirpes se tornou sensível na aplicação deste método de determinação da CMI em meio sólido. Para que as estirpes sejam consideradas sensíveis, a CMI para a ciprofloxacina tem que atingir o valor ≤ 1 mg/L e para o trimetoprim o valor terá que ser ≤ 8 mg/L (CLSI, 2006), o que nestes resultados em meio sólido, não foi possível constatar uma reversão de sensibilidade das estirpes clínicas.

Etest[®]				
Estirpe	Ciprofloxacina	CPZ	TZ	VP
<i>E. coli 16</i>	>32	ND	ND	> 32
<i>E. coli 19</i>	32	24	12	8
Estirpe	Trimetoprim	PAN	VP	TZ
<i>E. coli 5</i>	>32	>32	>32	12

Tabela IV. 9 - Resultados E test[®] para as estirpes clínicas para os quatro antibióticos em estudo e EPIs a ½ CMI. **Legenda:** > - superior; ND- não determinado; CPZ- clorpromazina; TZ- tioridazina; VP- verapamil; PAN- *L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide* (PAN).

Tal como no caso dos antibióticos, em que as concentrações em meio sólido equivalentes a uma CMI de 90% têm de ser aumentadas face às usadas em meio líquido e que foram objecto de anos de estudo para o desenvolvimento dos métodos de difusão em placa quer com discos impregnados para a técnica de Kirby-Bauer e a determinação dos halos de inibição quer no caso da determinação das CMIs em placa pela técnica de E-test[®], a utilização dos EPIs em meio sólido terá de vir a ser correlacionada com a actividade dos mesmos compostos em meio líquido para que se possam obter dados correlacionáveis (Mahmoud, 2007; Marquez, 2008). Contudo evidenciou-se que se poderá vir a desenvolver um teste em meio sólido para a determinação da actividade dos

EPIs na inibição da actividade das BEs correlacionável com a resistência aos antibióticos que carece agora de investimento futuro.

7. Fluorimetria em termociclador de tempo-real (Rotor-Gene 3000™)

-método semi-automático com a utilização de EtBr

Para cada uma das quatro estirpes clínicas com resultados observados nos ensaios anteriores, foram efectuados ensaios de acumulação e efluxo com os EPIs seleccionados no método de *screening* para cada estirpe, ou seja, de acordo com o efeito desse EPI na reversão/redução da resistência a determinado antibiótico.

O método semi-automático de fluorimetria em termociclador permite como já referido, observar em tempo real a capacidade de acumulação do EtBr, e ainda observar o efluxo das estirpes clínicas que será sobre-expresso comparativamente à estirpe controlo AG100.

Assim, este método pode ser utilizado com dois objectivos:

a) Determinar qual o EPI que permite obter melhor acumulação/retenção de EtBr no interior das células, isto é, determinar quais os EPIs mais eficientes na inibição da actividade de efluxo da estirpe

b) Determinar se há sinais de sobre-actividade de efluxo face ao efluxo de EtBr na estirpe padrão. Neste caso é aconselhável demonstrar o efluxo activo através de um ensaio de efluxo onde as células bacterianas são previamente carregadas com o EPI com maior eficácia na acumulação de EtBr na estirpe padrão (*E. coli* K12), o CPZ, e depois deste ser retirado do tampão de ensaio monitoriza-se o efluxo activo da estirpe em comparação com o efluxo da estirpe padrão na presença e na ausência de glucose (Viveiros *et al*, 2008).

Neste trabalho seguiram-se estas linhas orientadoras e optou-se por usar um EPI que fosse capaz de acumular EtBr de forma semelhante para todas as estirpes tendo-se optado pela CPZ, pois com este composto era possível visualizar o efluxo com mais clareza em todas as estirpes clínicas, podendo-se comparar com o efluxo da estirpe padrão.

Assim, nos ensaios de efluxo, foi utilizada a CPZ para efectuar o carregamento das células na concentração correspondente a $\frac{1}{2}$ da CMI, tendo-se preparado a diluição do composto no próprio dia. A AG100 foi testada para se poder estabelecer a comparação em termos de efluxo com as estirpes clínicas, assim sendo, foi demonstrada maior acumulação com o EPI CPZ, seguido do EPI TZ, nas condições óptimas de efluxo, 37°C e na presença de glucose (Figura IV.13).

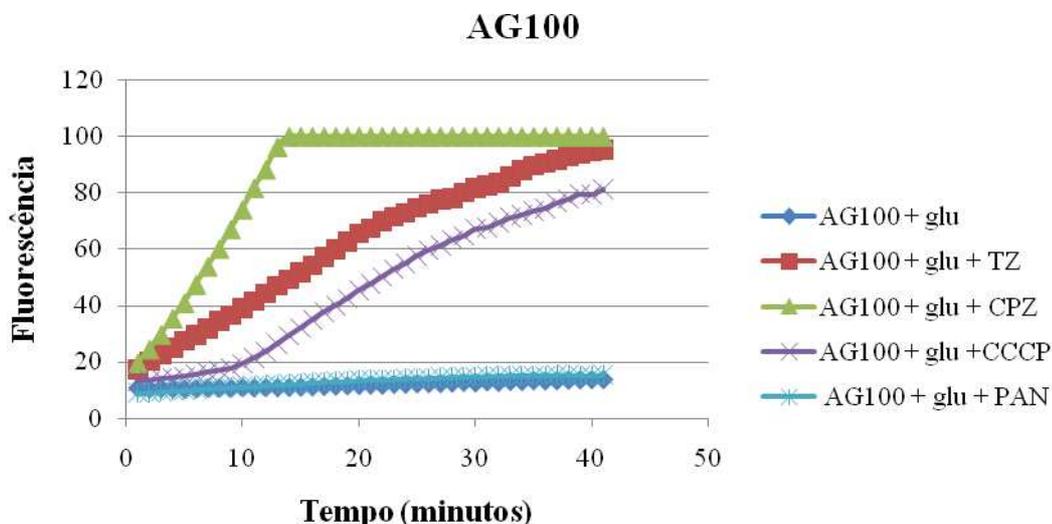


Figura IV. 13 - *E. coli* AG100 - ensaio de acumulação de EtBr, na presença de CPZ, TZ, CCCP, PAN. **Legenda:** glu-glucose; CPZ- Clorpromazina; TZ- Tioridazina; PAN- *L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide*; CCCP- *carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone*. Os dados apresentados correspondem à média de três ensaios independentes.

No ensaio de efluxo para a AG100 (Figura IV.14), foi possível verificar a presença de uma curva de efluxo activo de EtBr (AG100+glu) , com decréscimo na fluorescência

até cerca de 0.3 (fluorescência relativa), enquanto que na ausência de glucose não ocorre efluxo de EtBr (AG100). Igualmente se verifica ausência de efluxo na presença de CPZ com ou sem energização das células pela adição de glucose (AG100+glu+CPZ) e (AG100+CPZ), respectivamente. Para os restantes EPIs testados as curvas apresentadas não evidenciaram efluxo significativo quando se adicionava glucose uma vez que lhes é adicionado um EPI, que lhes bloqueia o efluxo.

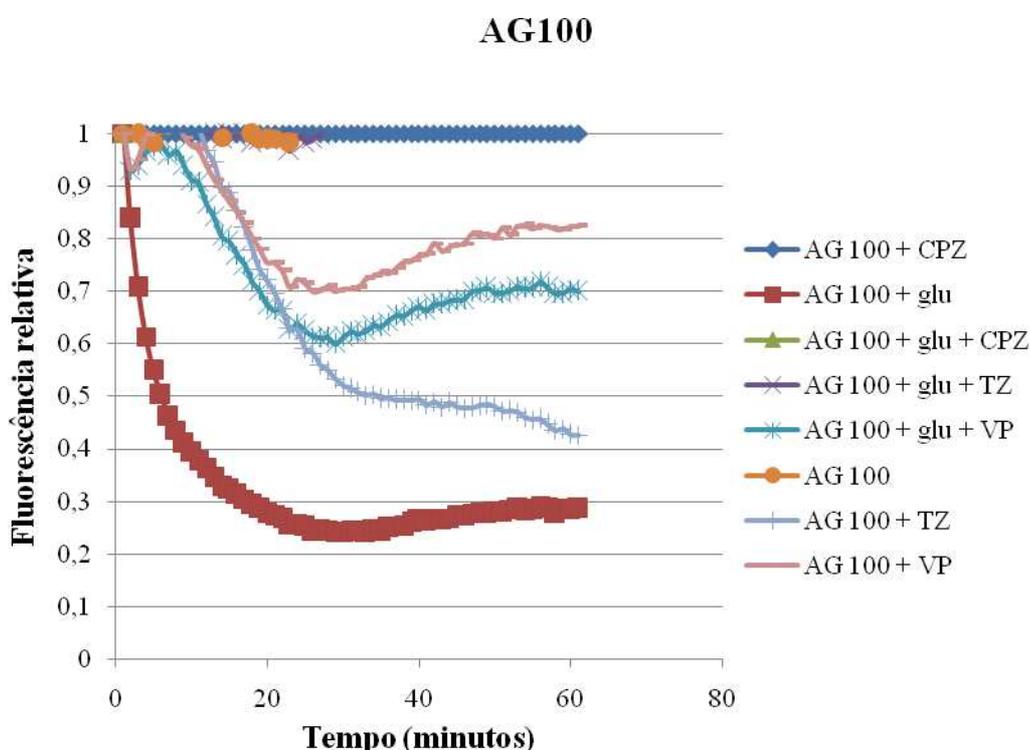


Figura IV.14 - *E. coli* AG100 - ensaio de efluxo (fluorescência relativa) a 37°C e na presença de 0.4% de glucose, carregada com 3 µg/mL de EtBr, na presença de CPZ, após normalização dos dados. **Legenda:** glu-glucose; CPZ- Clorpromazina; TZ- Tioridazina; VP- verapamil. Os dados apresentados correspondem à média de 3 ensaios independentes.

Os ensaios de efluxo permitem correlacionar o efluxo de EtBr com o efluxo dos antibióticos, visto que ambos são substratos dos mesmos sistemas de efluxo (Viveiros *et al*, 2008; Poole & Lomovskaya, 2006). Comparando a presença do EtBr no interior da célula, com a existência de antibiótico no interior da estirpe, ao qual esta é resistente por

sobre-expressão de BEs, admite-se que a extrusão do composto seria efectuada se não estivesse presente o EPI que de certa forma bloqueia o efluxo da estirpe, permitindo a eficácia do antibiótico.

Assim, pretende-se para cada estirpe clínica efectuar o ensaio de efluxo com os EPIs que demonstraram efeito de reversão para esta estirpe, na presença de fonte de energia (glucose), de forma a correlacionar o efeito de inibição das BEs com a reversão ou diminuição da sua resistência aos antibióticos.

Na estirpe clínica *E. coli* 5, observou-se que os inibidores que apresentavam maior acumulação de EtBr num determinado período temporal, foi a TZ (5+TZ+glu) e a CPZ (5+CPZ+glu), tendo sido os ensaios produzidos em duplicado, e na presença de glucose, o que permite verificar a sua influência no efluxo do EPI.

Na estirpe *E. coli* 5, pretendeu-se efectuar o ensaio com os EPIs que demonstraram efeito de reversão para esta estirpe, nomeadamente a TZ e o VP, para verificar qual a sua influência no efluxo na presença de fonte de energia (glucose).

Assim sendo, a presença destes EPIs permitiu evitar o efluxo na presença da glucose, logo pode-se afirmar que estes compostos têm a capacidade de impedir a extrusão de EtBr.

Em termos de fluorescência relativa, é possível verificar que apenas se observa o efluxo da estirpe com adição de glucose (5+glu), observando-se um decréscimo de fluorescência inferior a 0.2 na escala de fluorescência relativa. (Figura IV.15), o que nos indica que, como já referimos anteriormente, as BEs são dependentes de energia para iniciarem o seu papel de extrusão de compostos tóxicos. Nesta estirpe clínica todos os EPIs testados demonstraram capacidade de reter ou diminuir o efluxo activo de EtBr das células.

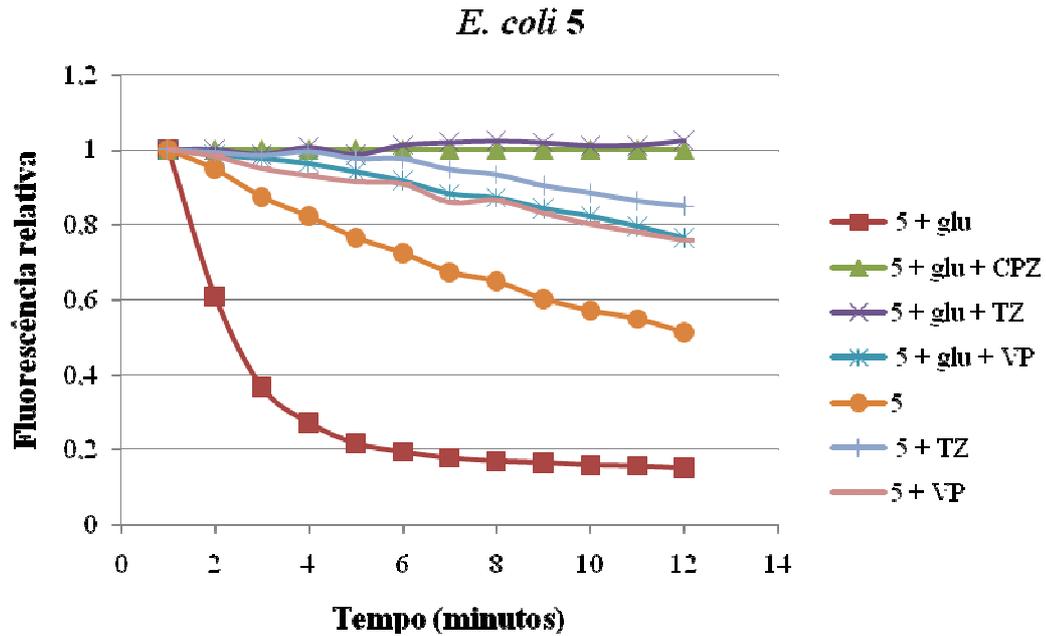


Figura IV. 15 - *E coli 5* - ensaio de efluxo (fluorescência relativa) a 37°C e na presença de 0.4% de glicose, carregada com 3 µg/mL de EtBr, na presença de CPZ, após normalização dos dados. **Legenda:** glu-glicose; CPZ-Clorpromazina; TZ-Tioridazina; VP-Verapamil. Os dados apresentados correspondem à média de 3 ensaios independentes.

Nos resultados obtidos no ensaio de efluxo para a *E. coli 13*, é possível verificar uma curva de efluxo da estirpe na presença da glicose (13+glu), (Figura IV.16), em que existe uma redução da fluorescência inferior a 0.1 na escala de fluorescência relativa, apresentando-se os restantes tubos de reacção no máximo de fluorescência, sem evidência de efluxo, evidenciando assim que os EPIs testados conseguem reter o efluxo de EtBr nesta estirpe clínica com igual eficiência e que a estirpe evidencia sinais de sobre-actividade de BEs.

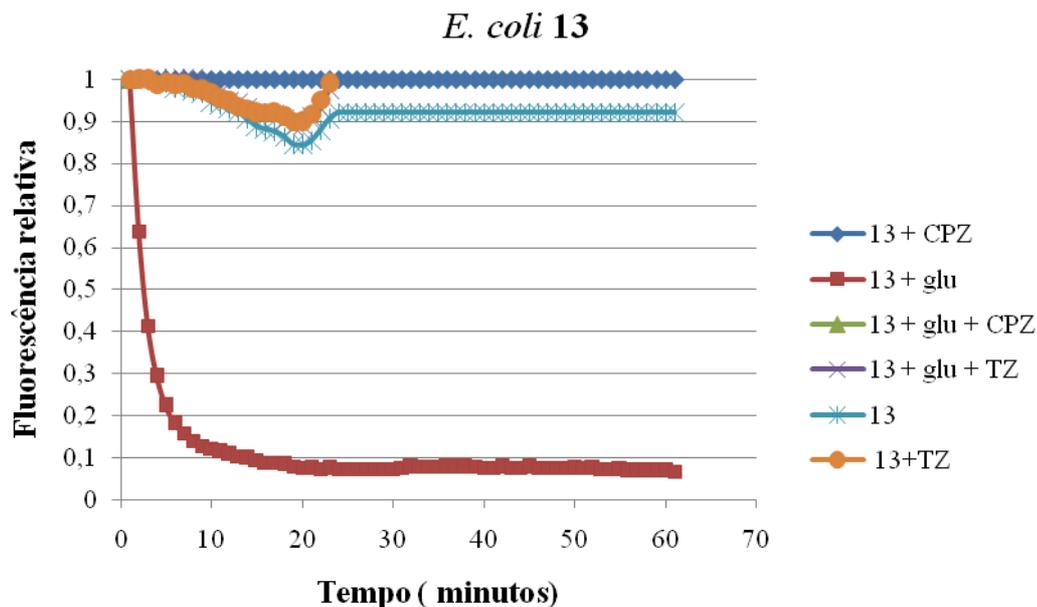


Figura IV. 16- *E. coli* 13-ensaio de efluxo (fluorescência relativa) a 37°C e na presença de 0.4% de glucose, carregada com 3 µg/mL de EtBr, na presença de CPZ, após normalização dos dados. **Legenda:** glu-glucose; CPZ-Clorpromazina; TZ-Tioridazina. Os dados apresentados correspondem à média de 3 ensaios independentes.

No ensaio de efluxo realizado para a estirpe 16 (Figura IV.17), verificou-se o efluxo da estirpe na presença da glucose (16+glu) com decréscimo de fluorescência relativa inferior a 0,1, sendo a mais significativa comparativamente com as restantes estirpes clínicas MDR de *E. coli*. Nesta estirpe verificou-se ainda o decréscimo de fluorescência relativa a 0,2, na presença de CPZ e glucose (16+glu+CPZ), o que evidencia capacidade de efluxo na presença deste EPI e de glucose. A partir deste facto podemos concluir que a CPZ não era o composto ideal para o carregamento das células bacterianas para a estirpe *E. coli* 16. Para os restantes compostos inibidores em que esta estirpe apresentou resultados de reversão/redução da resistência aos antibióticos, a fluorescência é máxima, mesma na presença da fonte de energia. Estes resultados levam-nos a colocar a hipótese que nesta estirpe existe sobre-expressão de uma ou mais bombas de efluxo diferentes

das sobre-expressas nas estirpes anteriores mas que igualmente efluxam EtBr sendo contudo insensíveis à acção inibitória do EPI CPZ.

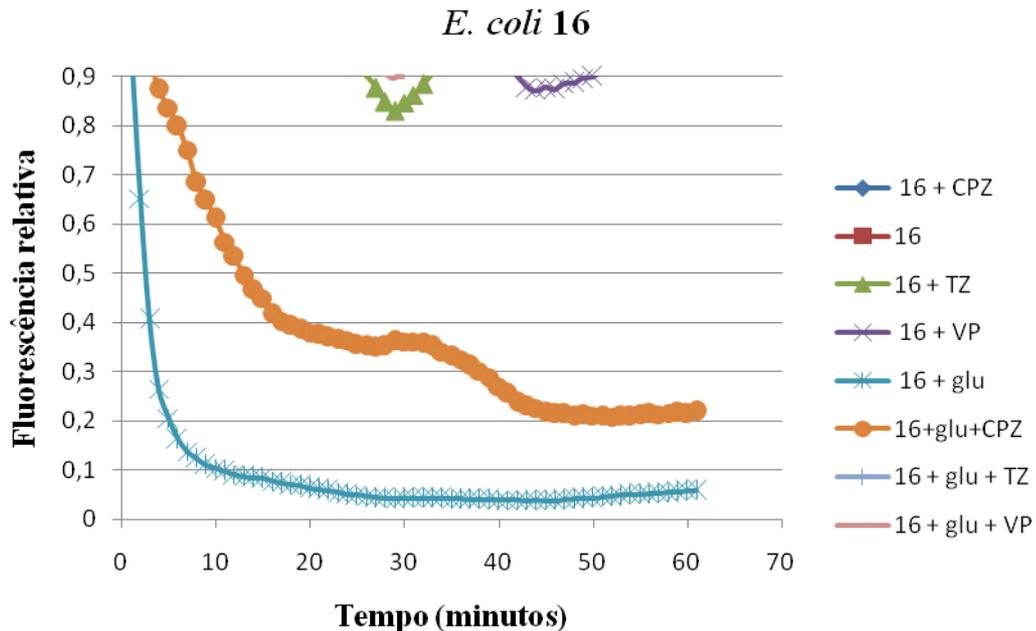


Figura IV. 17 - *E. coli* 16-ensaio de efluxo (fluorescência relativa) a 37°C e na presença de 0.4% de glucose, carregada com 3 µg/mL de EtBr, na presença de CPZ, após normalização dos dados. **Legenda:** glu-glucose; CPZ- Clorpromazina; TZ- Tioridazina; VP- Verapamil. Os dados apresentados correspondem à média de 3 ensaios independentes.

No ensaio de efluxo para a estirpe 19 (Figura IV.18), a curva correspondente ao efluxo (19+glu), atinge um valor inferior a 0.1 na escala de fluorescência relativa o que demonstra uma vez mais a actividade de efluxo. O efluxo é também bloqueado nos restantes ensaios, embora se constate que, com a CPZ na presença da glucose, não é suficiente eficaz para evitar o efluxo do corante fluorescente. Este resultado indicia que nesta estirpe a sobre-expressão de BEs poderá estar mais acentuada que nas estirpes anteriores. uma vez que em iguais condições foi possível reter o efluxo nas estirpes previamente testadas, e nesta estirpe tal não foi possível para a concentração de EPI utilizada.

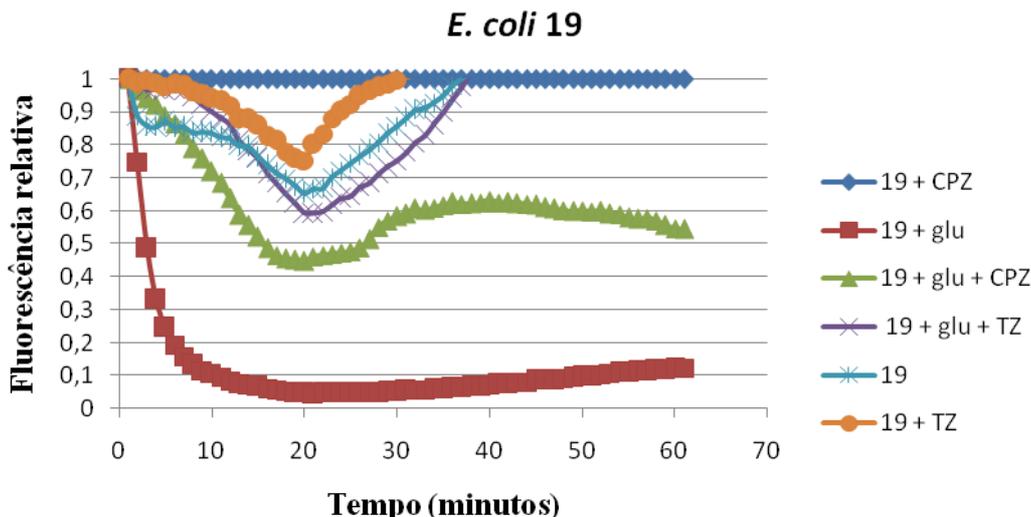


Figura IV. 18 - *E.coli* 19-ensaio de efluxo (fluorescência relativa) a 37°C e na presença de 0.4% de glucose (glu), carregada com 3 µg / mL de EtBr, na presença de CPZ, após normalização dos dados. **Legenda:** glu-glucose; CPZ-Clorpromazina; TZ-Tioridazina. Os dados apresentados correspondem à média de 3 ensaios independentes.

Concluindo, nos ensaios de acumulação em todas as estirpes testadas, é possível observar que os EPIS utilizados permitem a inibição das BEs durante um período aproximado de 45-60 minutos, com exceção do PAN que não apresenta nenhum efeito directo sobre o efluxo activo do EtBr. Após este período temporal, observou-se o retorno do efluxo pelas BEs devido à recuperação das condições fisiológicas bacterianas, em que é possível verificar nos gráficos de acumulação um decréscimo gradual da fluorescência.

Em relação aos gráficos de efluxo, demonstrou-se a presença de efluxo sobre-expresso em todas as estirpes clínicas, com redução da fluorescência relativa. No entanto, também é notório a dificuldade em obter apenas um EPI que tenha o mesmo efeito para todas as estirpes clínicas, mas a utilização do CPZ foi a única forma encontrada para estabelecer parâmetros de comparação entre as estirpes.

Com o intuito de comparar o grau de efluxo das estirpes clínicas entre si e com a estirpe controlo AG100, demonstra-se em forma de gráfico (Figura IV.19), a

comparação da fluorescência relativa normalizada às condições ideais de carregamento, que correspondem a cada estirpe carregada com CPZ, onde se verifica o máximo de fluorescência, enquanto cada estirpe na presença de glucose evidencia a curva de efluxo.

Neste gráfico observa-se o efluxo de cada estirpe na presença de glucose, e verifica-se que a AG100 apresenta menos efluxo que as restantes estirpes clínicas e entre elas a que menos efluxa é a *E. coli* 5.

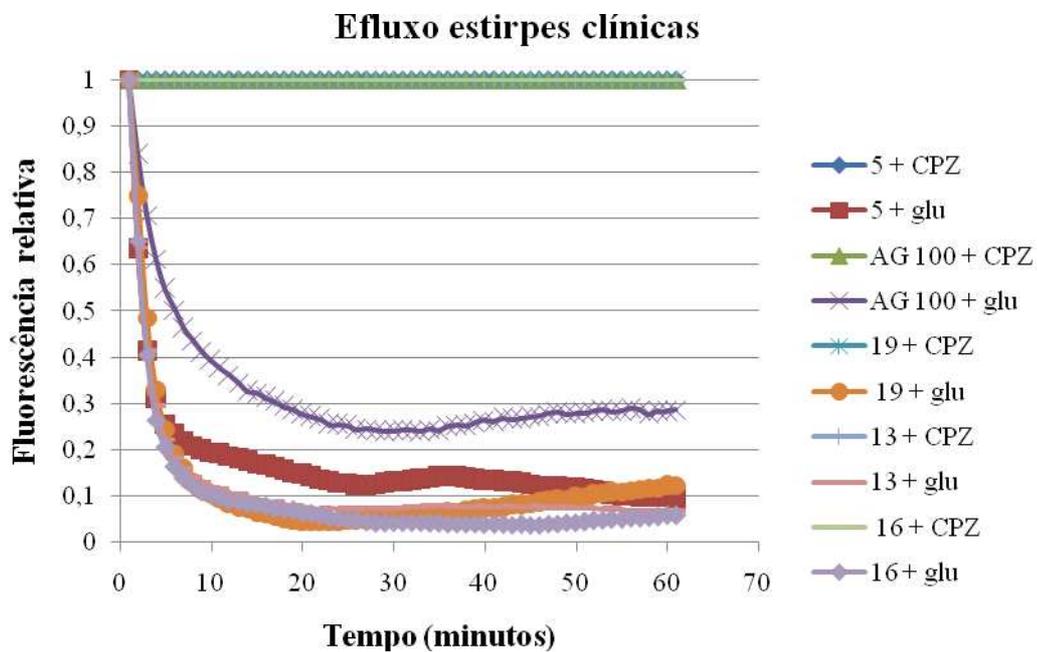


Figura IV. 19 - Efluxo das estirpes clínicas MDR de *E. coli* e estirpe controlo AG100 (fluorescência relativa), na presença de glucose. **Legenda:** glu-glucose; CPZ- Clorpromazina.

8. qRT-PCR (*quantitative reverse-transcriptase- polimerase chain reaction*)

Este método permite verificar a presença de alterações na expressão de genes das estirpes em estudo, relativamente a uma estirpe controlo e desta forma, poder verificar se os genes codificantes para as BEs, se encontram sobre-expressos relativamente à estirpe controlo AG100.

Devido a restrições financeiras e temporais foram seleccionadas duas estirpes das quatro estirpes clínicas testadas neste trabalho que haviam evidenciado resultados de reversão da resistência prévia aos antibióticos. A selecção das estirpes baseou-se nos conjunto dos resultados obtidos anteriormente, com especial relevância para os obtidos no método de fluorimetria em tempo real, em que se distinguiu quais as que apresentavam maior efluxo, com base na análise das curvas de efluxo e decréscimo de fluorescência.

Assim, as estirpes *E. coli* 16 e 19 foram seleccionadas porque possuíam estas características, e desta forma era de esperar que se encontrasse sobre-expressão dos genes codificantes para as BEs.

Desta forma, foi utilizada a estirpe controlo AG100, para se poder comparar os resultados das estirpes clínicas. As estirpes clínicas e controlo foram incubadas a 37°C, com agitação a 220 rpm tendo a estirpe controlo crescido em 3h, enquanto a *E. coli* 16 e 19 cresceram em 1h30 (aproximadamente), na presença de ciprofloxacina a ½ CMI, sendo utilizada uma concentração de solução *stock* de 800 µg/mL, retirando-se o volume correspondente a uma concentração de 20 e 10 µg/mL respectivamente para cada estirpe.

As estirpes clínicas foram inoculadas com antibiótico de forma a manter a pressão selectiva externa conduzindo assim à sobre-expressão de BEs, o que lhes permite extruir o antibiótico. É de salientar que estas atingiram a DO_{600nm} de 0.6 em cerca de 1h, o que corresponde a metade do tempo que demoram a crescer sem antibiótico.

Os ensaios foram determinados pelo *comparative threshold cycle (C_T) method* ($2^{-(\Delta\Delta C_t \text{ amostra} - \Delta\Delta C_t \text{ referência})}$), sendo que as amostras que apresentaram uma maior concentração de *template* conduzem a uma amplificação mais rápida, do que aquelas que apresentaram menos mRNA para determinado gene, conforme explicitado na secção Material e Métodos.

Foram realizados ensaios de qRT-PCR para duas estirpes, a *E. coli* 16 e 19, onde se quantificou a expressão dos genes que codificam para as BEs como, *acrA*, *acrF*, *emrB*, *yhiV*, *acrB*, *acrE*, porque a sobre-expressão destes genes torna-os responsáveis pela extrusão de antibióticos específicos a que estas estirpes são resistentes e ainda o regulador *marA*. A sobre-expressão destes genes conduz à resistência bacteriana a determinados compostos, em particular antibióticos, motivo pelo qual se testaram especificamente este conjunto de genes (Mahamoud *et al*, 2007; Pàges, 2007; Marquez, 2005).

Foram realizados dois ensaios, e nos casos em que os resultados apresentaram alguma divergência foi realizado um terceiro ensaio para aferir valores para alguns genes.

É de referir que em todos os ensaios se observou alguma amplificação no controlo negativo (C-), no entanto pela análise de *Melt*, verificou-se que esta amplificação se dá a uma temperatura diferente e inferior das restantes curvas, logo não condiciona a veracidade do ensaio, possivelmente sendo a amplificação de polímeros de *primers* não específicos.

Dos genes testados para a estirpe clínica *E. coli* 16 (Figura IV. 20), observou-se sobre-expressão dos todos os genes testados, com maior evidência o *acrB* (3.4 vezes sobre-expresso), *acrE* (8.9 vezes sobre-expresso) e *acrA* (2.4 vezes sobre-expresso), e ainda elevada sobre-expressão do regulador *marA* (9.0 vezes sobre-expresso). Os restantes genes apresentaram uma sobre-expressão inferior a 1 relativamente à estirpe controlo.

Estes resultados em termos numéricos apresentaram alguma divergência e por isso foram realizados em triplicado para reduzir o erro associado ao método.

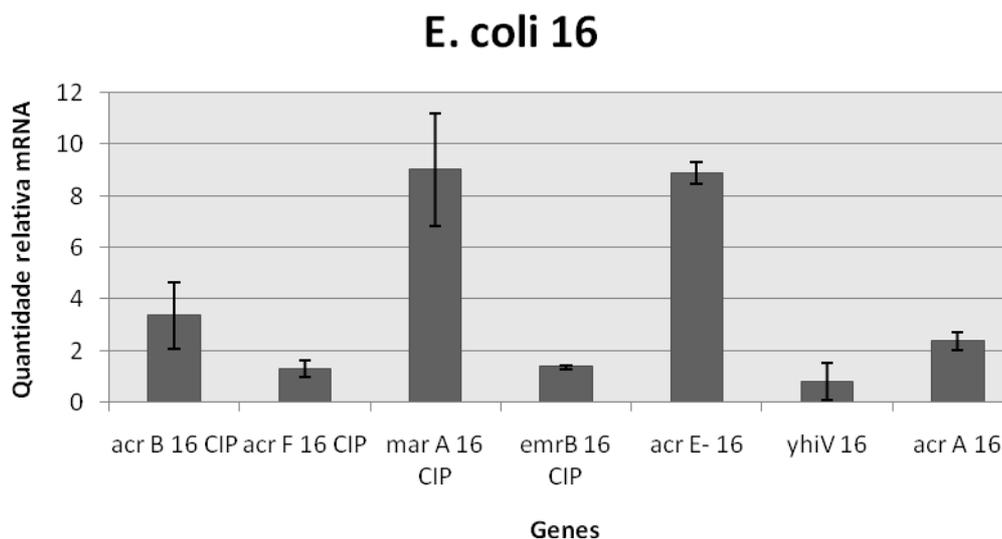


Figura IV. 20- *E. coli* 16 -média dos ensaios de qRT-PCR e respectivas barras de erro. Este gráfico representa a média dos ensaios de qRT PCR de três ensaios para a *E. coli* 16 inoculada em meio LB com ciprofloxacina (CIP) a ½ CMI.

No caso da *E. coli* 19, verificou-se que existe uma sobre-expressão de BEs, muito mais acentuada do que na estirpe *E. coli* 16 (Figura IV.21). A maioria dos genes estudados encontraram-se sobre-expressos com maior relevância nos genes: *acrB* (47.1 vezes sobre-expresso), *emrB* (26.0 vezes sobre-expresso) e *acrA* (19.1 vezes sobre-expresso). O regulador *marA* (36.8 vezes sobre-expresso) também exibe uma elevada

sobre-expressão. Dos genes testados o que menos expressão evidencia é o gene *acrE* (0.5 vezes sobre-expresso) apresentando um valor inferior a 1 em termos de quantidade de mRNA quando comparado com a estirpe controlo, *E. coli* K12-AG100.

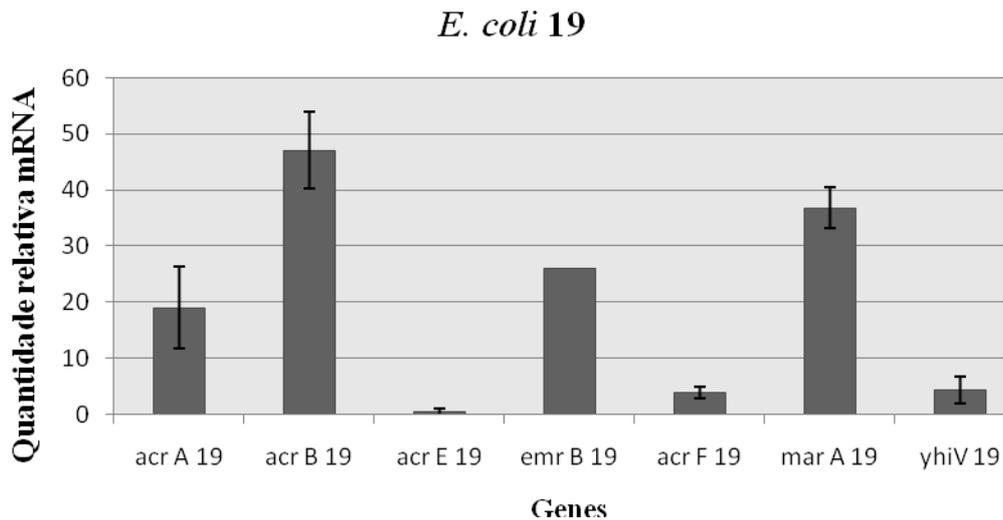


Figura IV. 21 - *E. coli* 19-média dos ensaios de RT- PCR e respectivas barras de erro. Este gráfico representa a média dos ensaios de qRT PCR de três ensaios para a *E. coli* 19 inoculada em meio LB com ciprofloxacina a ½ CMI.

Este resultado é significativamente diferente do obtido para a estirpe *E. coli* 16 e na Figura IV.22, encontram-se os resultados obtidos para as duas estirpes clínicas, demonstrando-se uma maior sobre-expressão dos genes codificantes para as BEs no caso da estirpe clínica *E. coli* 19, em particular do sistema AcrAB enquanto na estirpe *E. coli* 16 é o sistema AcrEF que se encontra mais sobre-expresso embora não atinja os níveis da sobre-expressão do sistema AcrAB da estirpe *E. coli* 19.

Assim, estes resultados estão em consonância com os anteriores, em particular como facto de apesar que ambas as estirpes possuem sinais evidentes de sobre-atividade de efluxo, possuíam também perfis de resistência aos antibióticos diferentes e respostas diferentes aos inibidores de BEs testados.

Estirpes clínicas

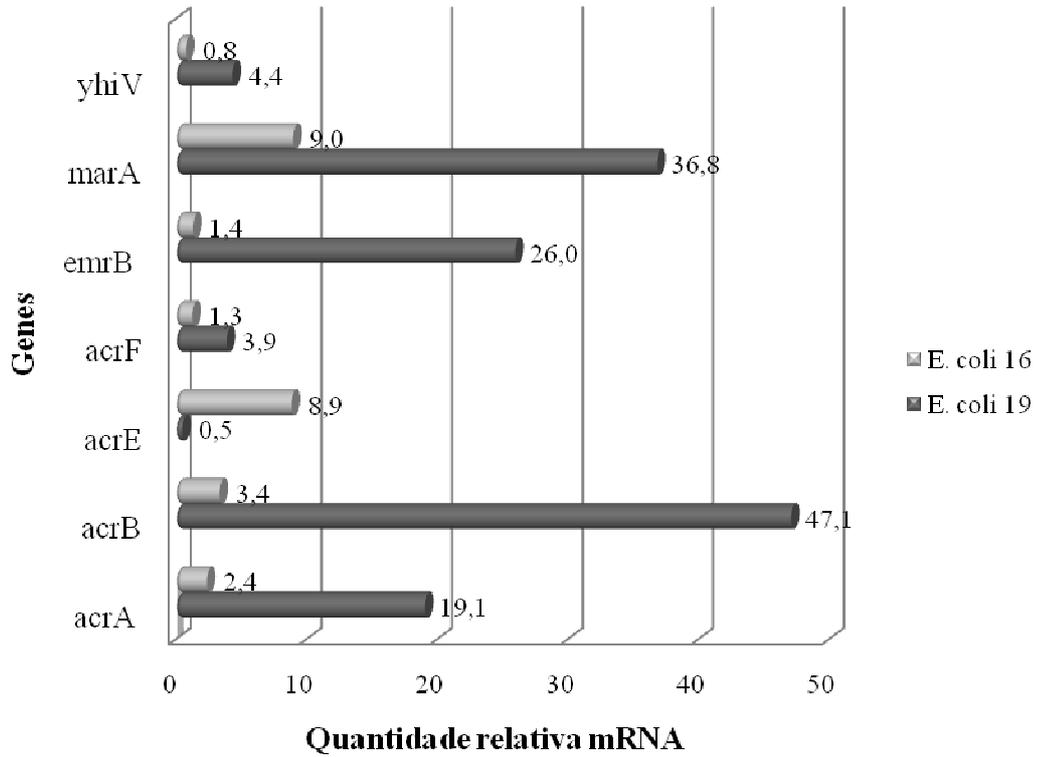


Figura IV. 22 - *E. coli* 16 e 19-Gráfico comparativo da média dos ensaios de qRT- PCR. Este gráfico representa a média dos ensaios de qRT PCR de três ensaios para a *E. coli* 16 e 19 inoculadas em meio LB com ciprofloxacina a $\frac{1}{2}$ CMI.

V. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Como discutido ao longo da tese, a resistência aos antibióticos em bactérias tem sido um problema de saúde humana que se tem vindo a agravar gradualmente desde o aparecimento dos primeiros antibióticos.

A proximidade física entre microrganismos pode ser benéfica, uma vez que a partir desta relação ocorre transferência de compostos essenciais como nutrientes, entre outros, mas no entanto, a partilha do mesmo habitat pode ser desvantajoso, quando os microrganismos têm que competir por estes compostos ou quando este habitat é negativamente influenciado por um dos microrganismos, como com a excreção de substâncias tóxicas para o exterior.

Assim, ao longo do tempo, as bactérias tiveram que desenvolver vários mecanismos de defesa, no sentido de permitir a co-existência entre várias espécies no mesmo habitat bem como para sobreviverem em ambientes adversos como sejam os ambientes onde se encontrem expostos a antimicrobianos. A introdução dos antimicrobianos no tratamento e prevenção de infecções humanas, com enorme benefício para a saúde, trouxe igualmente o exacerbar das formas de resistência bacteriana aos antimicrobianos.

O uso não controlado de antibióticos no tratamento de infecções humanas conduziu ao aparecimento de bactérias multirresistentes, tornando-se uma ameaça à saúde pública. Desde 1980, os infecciólogistas reconheceram as UCIs como o local no hospital onde os doentes apresentam um risco entre 5 a 10 vezes maior de adquirir infecções nosocomiais do que nos restantes locais do hospital. Os factores associados são: 1) os factores de risco intrínsecos relacionados com a necessidade de permanência na UCI, devido à presença de antecedentes pessoais e co-morbilidades (desnutrição,

idade avançada e imunossupressão); 2) material médico invasivo, como tubos endotraqueais para a ventilação mecânica, cateteres intravasculares, algaliação; 3) reservatórios (doentes colonizados ou infectados) que aumentam o risco de infecção cruzada nas UCIs (Weber, Raasch, Rutala, 1999).

As infecções nosocomiais causadas especialmente por microrganismos resistentes à AB, representam uma fonte importante de morbidade e mortalidade para o doente hospitalizado em UCI, entre os mais comuns encontram-se *Methicillin Resistant S. aureus* (MRSA), *Vancomycin Resistant Enterococcus* (VRE), *Candida spp.* resistente ao fluconazol e bacilos Gram-negativos (*Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *E. coli*). Uma forma de se tornar possível o controlo das infecções a microrganismos multirresistentes é o uso correcto de directrizes actualizadas de administração de AB, embora esta medida não tenha sido estudada no que diz respeito ao seu efeito na redução de infecções e redução do tempo de internamento (Weber, Raasch, Rutala, 1999).

Neste trabalho, pretendeu-se caracterizar biológica, fenotípica e genotípicamente os mecanismos de resistência intrínseca aos antibióticos por sobre-expressão de BEs em estirpes clínicas de *E. coli*, sujeitas a pressão antibiótica prolongada em ambiente hospitalar.

Igualmente pretendeu-se testar e desenvolver métodos simples, não dispendiosos e susceptíveis de serem executados em laboratórios de microbiologia clínica, para detectar e quantificar a componente de efluxo activo de antibióticos como parte integrante dos mecanismos de resistência presentes nas estirpes clínicas de *E. coli* MDR isoladas no laboratório de patologia clínica do Hospital dos SAMS.

Para o efeito foram testados os seguintes métodos:

- Método *EB-Agar Cartweel*;
- Método de *Screening* da actividade dos EPIs;

- Método de *Screening* de BEs-EB - *Agar Cartwheel Method* / EPIs;
- Concentração mínima inibitória (CMIs) para diversos antibióticos, aos quais os isolados *E. coli* são resistentes;
- Método de Etest® e Kirby-Bauer;
- Fluorimetria em termociclador de tempo-real (Rotor- Gene 3000™)-método semi - automático com a utilização de EtBr;
- Análise génica das estirpes clínicas por qRT-PCR.

Com recurso ao método *EB-Agar Cartwheel*, foi possível seleccionar as estirpes que fenotípicamente apresentavam características de multirresistência, isto é, aquelas que nas placas de agar suplementadas com EtBr fluoresciam em concentrações mais elevadas do fluoróforo, comparativamente à fluorescência padrão a concentrações mais baixas da estirpe *E. coli* controlo (*wild-type*).

Assim sendo, foram seleccionadas quatro estirpes com o fenótipo pretendido, uma vez que se tinha em vista a multirresistência por sobre-expressão de BEs, sendo elas: 5, 13, 16, 19.

De forma a confirmar a suspeita que a maior capacidade de expulsar EtBr em placa destas estirpes se devia à sobre-actividade de BEs, recorreu-se à utilização de inibidores de bombas de efluxo (EPIs), que permitiram anular/minimizar esta sobre-actividade e deste modo, confirmar se a multirresistência destas estirpes MDR de *E. coli* recebia o contributo da sobre-actividade das BEs.

Utilizou-se uma metodologia designada de método de *Screening* da actividade dos EPIs, que tal como o nome indica, visou testar diversos EPIs com o objectivo de avaliar a sua influência sobre as BEs das estirpes clínicas.

As quatro estirpes testadas apresentaram reversão/redução da resistência inicial à AB, com determinados compostos considerados EPIs.

O uso destes compostos está relacionado com estudos anteriores, onde se demonstrou que em estirpes laboratoriais de *E. coli*, se conseguia reverter a resistência com os mesmos.

Assim, as estirpes clínicas *E. coli* MDR 5, 13, 16, 19, reverteram a sua resistência, com o uso de um a dois dos EPIs testados. Os EPIs com efeito mais notório foram: TZ, VP, PAN e EDTA.

Contudo, o EDTA apenas demonstrou redução da resistência, enquanto com a TZ e o VP, se obtiveram melhores resultados, sendo que para a estirpe *E. coli* 5, a resistência ao TMP foi revertida com o uso de PAN e TZ; para a *E. coli* 13, a resistência ao TMP foi revertida com o uso de TZ e ainda para a GEN na mesma estirpe observou-se redução da resistência com EDTA. Para a *E. coli* 16, a resistência à CIP foi revertida com o uso de VP e para a *E. coli* 19, a resistência à CIP foi revertida com o uso de VP e TZ.

A partir deste método pode-se inferir, que existem BEs sobre-expressas e que são afectadas pela utilização dos EPIs tendo sido possível não só observar a presença/ausência de crescimento bacteriano, como quantificar o seu efeito na sobrevivência bacteriana através da contagem das UFCs.

Com a aplicação do método de *Screening* de BEs-EB-Agar *Cartwheel Method*/EPIs, retomou-se o mesmo princípio do *screening* inicial das estirpes na presença de EPIs, mas desta vez com o uso dos EPIs em placa de agar, aos quais a reversão da resistência aos antibióticos foi observada no método anterior, de forma a confirmar os resultados anteriores e testar se os EPIs eram igualmente activos e efectivos em meio sólido.

Assim, utilizou-se as quatro estirpes e os quatro EPIs seleccionados anteriormente, sendo possível observar uma concordância de resultados, em que se verificou uma maior fluorescência a uma concentração inferior de EtBr, para as mesmas estirpes

estudadas, efeito este obtido pela presença do EPI. No entanto, no caso da estirpe clínica *E. coli* 13, não foi possível verificar qualquer tipo de diferença quando adicionado o EPI na placa. Desta forma, através deste método é também possível identificar o efeito do EPI no controlo das BEs.

Com base nos resultados anteriores efectuou-se então a metodologia de referência para a determinação da actividade de efluxo na resistência aos antibióticos, a determinação das CMI's em meio líquido por micro ou macro-diluição na presença e ausência dos EPIs, para as estirpes com resultados significativos de reversão/redução anteriormente estudadas.

Assim, para a resistência ao TMP na *E. coli* 5, observou-se a redução na CMI de superior a 750 mg/L para 2.925 mg/L na presença do VP e da TZ, no entanto para o PAN não houve qualquer efeito na CMI.

Para a *E. coli* 13, observou-se redução da CMI para o TMP de superior a 750 mg/L para 2.925 mg/L com o uso de TZ.

No caso da *E. coli* 16, observou-se uma redução da CMI para a CIP de 40 mg/L para 10 mg/L, com o uso de TZ e para 20 mg/L com o uso de VP.

Para a *E. coli* 19, observou-se uma redução da CMI para a CIP de 20 mg/L para 0.15 mg/L com o uso de TZ, de 10 mg/L com o uso de VP e de 5 mg/L com o uso de CPZ, enquanto com a utilização do PAN não se observou qualquer tipo de efeito.

No que diz respeito à *E. coli* 13, observou-se redução da CMI na presença de GEN e EDTA de 64 mg/L para 4 mg/L, enquanto a presença do PAN não influenciou a CMI.

Assim, as estirpes: 5, 13, 16, 19, demonstraram alterações significativas da sua resistência aos antibióticos, com o uso de um a dois dos EPIs testados, acrescentando-se agora o efeito inibitório da fenotiazina CPZ, que no método anterior de *screening* dos EPIs havia evidenciado menor actividade inibitória.

A utilização deste método de referência permitiu verificar que não houve concordância absoluta com o método anterior de *Screening* da actividade dos EPIs utilizando o meio líquido e discos impregnados de antibiótico, mas este facto estará relacionado com as diferenças na execução dos métodos, uma vez que os volumes utilizados dos compostos neste método são muito inferiores aos utilizados nos restantes, podendo o erro de pipetagem ser o suficiente para ter um resultado divergente, bem como se utilizam concentrações de antibiótico impregnadas nos discos que são mais reduzidas do que as usadas na determinação da CMI em meio líquido, o que diminui grandemente a sensibilidade do método de *screening* para EPIs com efeitos menos pronunciados. No sentido de se confirmar os resultados anteriores e se averiguar se poderia também determinar as CMIs em meio sólido para os antibióticos CIP e TMP utilizou-se igualmente a técnica de referência para meio sólido, o E-test®, na presença e ausência de TZ, CPZ, VP, PAN, para as estirpes em estudo e os EPIs que anteriormente demonstraram actividade.

A determinação da sensibilidade aos antibióticos CIP e TMP em meio sólido, foi efectuada na presença de TZ, CPZ, VP, PAN, para as estirpes *E. coli* 16, *E. coli* 19 e TZ, VP para a *E. coli* 5.

Assim, para a *E. coli* 19, o halo de inibição aumentou, o que leva a que a CMI determinada por Etest® nesta estirpe para a CIP, tenha reduzido de 32 mg/L para 24 mg/L (CPZ), 12mg/L (TZ) e 8 mg/L (VP).

Para a *E. coli* 16, não se observou nenhuma alteração no halo de inibição e para a *E. coli* 5, houve redução da CMI do TMP de superior a 32 mg/L para 12 mg/L com a TZ.

Concluindo, o uso destes métodos permite para além de identificar a multirresistência devido a BEs sobre-expressas, observar a utilidade de EPIs na reversão da resistência aos antibióticos.

Estes métodos são de baixo custo e fácil execução, o que se torna importante para o seu uso na prática clínica, pela extrema necessidade de recorrer a baixos orçamentos, tanto no que diz respeito ao material como aos recursos humanos, e ainda a sua fácil execução, rapidez de resultados, podendo constituir uma arma poderosa na determinação do antibiótico a designar para o doente.

Contudo, não houve uma concordância entre os vários métodos utilizados e a metodologia de referência, a determinação das CMIs em meio líquido por micro ou macro-diluição na presença e ausência dos EPIs. Tal facto deve-se à necessidade de estandardização dos métodos que obriga a uma transposição de concentrações equivalentes de antibiótico e EPI em meio líquido e em meio sólido, para que idênticos efeitos inibitórios possam ser avaliados em ambas as situações.

Há que referir porém que todos os métodos revelaram potencial na detecção precoce e presuntiva de actividade de BEs, mas apenas com a determinação das CMIs em meio líquido por micro ou macro-diluição na presença e ausência dos EPIs foi possível detectar e quantificar a actividade inibitória dos EPIs. Com o uso desta técnica foi possível evidenciar que os EPIs mais activos para as estirpes em estudo foram o CPZ, o TZ e o VP que foram seguidamente usados para expor e confirmar experimentalmente a actividade de efluxo aumentada nestas estirpes através da utilização de fluorimetria em termociclador de tempo-real (Rotor Gene 3000TM) por um método semi-automático com a utilização de EtBr (Viveiros *et al*, 2008).

O uso deste método permitiu observar a actividade intrínseca das BEs de forma mais sensível, assim como permitiu observar o efeito dos EPIs testados em ensaios anteriores, no que diz respeito ao seu comportamento no efluxo das estirpes.

Foi assim possível, observar e confirmar que todas as quatro estirpes seleccionadas nos ensaios anteriores, apresentavam sobre-expressão de BEs, facto este evidenciado

pelo ensaio de efluxo que quando perante uma fonte de energia, a estirpe efluxou activamente o EtBr anteriormente acumulado na ausência desta. Assim, constata-se que o funcionamento das BEs em *E. coli*, está intimamente associado à disponibilidade de energia, neste caso proveniente da glucose, e a partir do uso da mesma em concentrações iguais, permite uma comparação das estirpes clínicas com a estirpe controlo no que diz respeito ao seu efluxo.

Também se observou diferenças importantes no que diz respeito ao efeito das duas fenotiazinas utilizadas, a CPZ e a TZ, o que permite dizer que a sua actividade não se pode correlacionar, uma vez que a TZ permite a inibição do efluxo em todas as estirpes, enquanto a CPZ não apresenta um efeito tão significativo. Em particular na *E. coli* 16 o efeito do EPI CPZ foi quase nulo embora esta estirpe apresente sinais evidentes de actividade de efluxo aumentada e a CPZ se tenha evidenciado como o EPI mais activo na inibição do efluxo de EtBr para a estirpe de *E. coli* padrão (Viveiros *et al*, 2008).

Esta metodologia permite uma fácil visualização e interpretação dos resultados tanto de acumulação como de efluxo, usando pequenas quantidades de compostos/reagentes e permitindo o uso de muitas estirpes em simultâneo, mas no entanto, tem a desvantagem de a aquisição do aparelho ser dispendiosa.

De entre as estirpes testadas pelo método anterior seleccionaram-se as duas estirpes que evidenciaram maior actividade de efluxo para virem a ser caracterizadas genotipicamente no respeitante à expressão dos seus principais sistemas de efluxo.

Observou-se assim sobre-expressão significativa do sistema *AcrEF*, no caso da *E. coli* 16, e dos sistemas *AcrAB* e *EmrB*, no caso da *E. coli* 19. Nesta estirpe é de salientar uma sobre-expressão muito elevada do sistema de efluxo *AcrAB*. Em ambas as estirpes ocorre uma concomitante sobre-expressão do regulador *marA*. Assim, as famílias dos genes sobre-expressas são a RND e MFS com particular relevo para a

família RND. De salientar que, tanto quanto nos é possível conhecer da literatura científica, foi pela primeira vez descrito neste trabalho uma estirpe clínica de *E.coli* multirresistente com actividade de efluxo aumentada devido à sobre-expressão do sistema AcrEF, um sistema de efluxo considerado menor e de reserva ao sistema principal de efluxo em *E. coli*, o sistema AcrAB.

Igualmente se poderá inferir destes resultados que o EPI TZ é um inibidor de ambos os sistemas de efluxo e que o CPZ tem preferência sobre o sistema AcrAB pois o sistema AcrEF aparenta ser imune à actividade deste EPI.

A sobre-expressão destas bombas permitiu correlacionar a resistência presente nas estirpes clínicas, o que conduz à certeza que a multirresistência por BEs é um dos mecanismos importantes na resistência a nível clínico.

Assim sendo, este trabalho permitiu verificar a importância da sobre-expressão dos sistemas de efluxo em estirpes clínicas, assim como as metodologias a serem colocadas em prática a nível clínico, o que permitirá no futuro, o uso de antibióticos que não sejam substratos das bombas sobre-expressas, e ainda o uso de EPIs para a reversão da resistência aos antibióticos.

Uma das razões porque este estudo foi importante, foi pelo facto de as estirpes seleccionadas provirem de isolados clínicos de infecções a *E. coli*, quer sistémico, de ponto de partida urinário ou infecção de ferida operatória. Esta bactéria comensal mostra uma grande capacidade de adaptação a condições extremas e apresenta por isto, um elevado aumento dos padrões de resistência ao longo dos tempos quer a nível hospitalar quer comunitário, em detrimento de outras bactérias mais patogénicas.

Isto leva a concluir, que estamos a lidar cada vez mais com doentes imunossuprimidos, sujeitos a IACS, tornando premente o uso de novas moléculas com

efeitos antimicrobianos, assim como a sua aplicação em estudos *in vivo*, uma vez que os resultados apresentados e disponíveis são *in vitro*.

V.I. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AB Biodisk, 2004. Etest technical manual: 5 *Enterobacteriaceae*. Ab Biodisk, Lda, Solna, Sweden. [http:// www.abiodisk.com/pdf/etm_html/05_etm.htm](http://www.abiodisk.com/pdf/etm_html/05_etm.htm).
2. AGERSO, Y.; GUARDABASSI, L., 2005. Identification of *Tet 39*, a novel class of tetracycline resistance determination in *Acinetobacter* spp. of environmental and clinical origin. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 55: 566-569.
3. ALEKSHUN, M.N.; LEVY, S.B., 1999. The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiology*, 7: 410-413.
4. ALEKSHUN, M.A.; LEVY, S.B., 2004. The *Escherichia coli mar* locus- antibiotic resistance and more. *ASM News*, 70: 451-456.
5. AMARAL, L.; KRISTIANSEN, J.E., 2001. Phenothiazines: potential management of Creutzfeldt - Jacob disease and its variants. *International Journal Antimicrobiology Agents*, 18: 411-417.
6. AMARAL, L.; KRISTIANSEN, J.E.; THOMSEN, V. F.; MARKOVICH, B., 2000. The effects of chlorpromazine on the outer cell wall of *Salmonella typhimurium* in ensuring resistance to the drug. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14: 225-229.
7. ANDERSEN, C.; KORONAKIS, E.; BOKMA, E.; ESWARAN, J.; HUMPHREYS, D.; HUGHES, C.; KORONAKIS, V., 2002. Transition to the open state of the TolC periplasmic tunnel entrance. *Proceedings of the National Academy Science. U.S.A.*, 99: 11103-11108.
8. ANDERSEN, C.; KORONAKIS, E.; HUGHES, C.; KORONAKIS, V., 2002. An aspartate ring at the TolC tunnel entrance determines ion selectivity and

- presents a target for blocking by large cations. *Molecular Microbiology*, 44: 1131-1139.
9. ANDERSSON, D., 2004. The ways in which bacteria resist antibiotics. The global threat of antibiotic resistance: Exploring Roads towards Concerted Action. A multidisciplinary meeting at the Dag Hammarskjold Foundation, Uppsala, Sweden, 1-6.
 10. BAMBEKE, F. V.; GLUPEZYNSKI, Y.; PLÉSIAT, P.; PECHÈRE, J. C.; TULKENS, P. M., 2003. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 1055-1065.
 11. BAMBEKE, F. V.; PAGÈS, J. M.; LEE, V. J., 2006. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvant in antibiotic treatment and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Recent Patents on Anti - Infectious Drug Discovery*, 1: 157-175.
 12. BARBOSA, T. M.; LEVY, S. B., 2000. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Antibiotic use and resistance development. Drug Resistance Updates*, 3: 303-311.
 13. BENTLEY, J.; HYATT, L. S.; AINLEY, K.; PARISH, J. H.; HERBERT, R. B.; WHITE, G. R., 1993. Cloning and sequence analysis of an *Escherichia coli* gene conferring bicyclomycin resistance. *Gene*, 127: 117-120.
 14. BLANC, V.; MESA, R.; SACO, M.; LAVILLA, S.; PRATS, G.; MIRÓ, E.; NAVARRO, F.; CORTÉS, P.; LLAGOSTERA, M., 2006. ESBL and plasmidic class C β -lactamase- producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Veterinary Microbiology*, 118:229-234.

15. BOHNERT, J. A.; KERN, W., 2005. Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* over expressing RND efflux pumps. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49:849-852.
16. BORGES-WALMSLEY, M. I.; McKEEGAN, K. S.; WALMSLEY, A. R., 2003. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochemical Journal*, 376: 313-338.
17. BRIÑAS, L.; MORENO, M. A.; TESHAGER, T.; SÁENZ, Y.; PORRERO, M. C.; DOMINGUEZ, L.; TORRES, C., 2005. Monitoring and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49 (3): 1262- 1264.
18. BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; 2005. Jawetz, Melnick e Adelberg: *Microbiologia Médica* (22ª Edição), McGraw-Hill, ISBN - 85-86804-37-1, 653 pp.
19. BRYAN, A.; SHAPIR, N.; SADOWSKY, M. J., 2004. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse human and animal sources. *Applied Environmental Microbiology*, 70 (4): 2503-2507.
20. BUTAYE, P.; CLOOECKAERT, A.; SCHWARZ, S., 2003. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal Antimicrobial Agents*, 22: 205-10.
21. CHANG, G., 2003. Structure of *MsbA* from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *Journal Molecular Biology*, 330: 419-430.

22. CHANG, G.; ROTH, C. B., 2001. Structure of *MsbA* from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* 293: 1793-1800.
23. CHOLLET, R.; CHEVALIER J.; BRYSKIER A.; PAGÈS J. M., 2004. The AcrAB-TolC pump is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (9): 3621-3624.
24. CHOPRA, I.; ROBERTS, M., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications. *Molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65 (2): 232-260.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth Informational Supplement M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, U.S.A.).
26. CLOETE, T. E., 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51: 277- 282.
27. COHEN, S. P.; McMURRY, L. M.; HOOPER, D. C.; WOLFSON, J. S.; LEVY, S. B., 1989. Cross resistance to fluoroquinolones in multiple antibiotic resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 33: 1318-1325.
28. COLLIGENON, P.; ANGULO, F. J., 2006. Fluoroquinolone-resistant *Escherichia-coli*: food for thought. *Journal Infectious Diseases*, 194: 8-10.
29. DAVIES, J.; WRIGHT, G. D., 1997. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiology*, 5 (6): 234-240.

30. DELIHAS, N.; FORST, S., 2001. *MicF*: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *Journal Molecular Biology*, 313: 1-12.
31. EDGAR, R.; BIBI, E., 1997. MdfA, an *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *Journal Bacteriology*, 179: 2274-2280.
32. ELKINS, C.; NIKAIDO, H., 2002. Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *Journal Bacteriology*, 184: 6490-6498.
33. FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K., 2005. Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*, 40: 1333-1341.
34. FLUIT, A. C.; VISSER, M. R.; SCHMIDZ, F. J., 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (4): 836-837.
35. FRALICK, J. A., 1996. Evidence that TolC is required for functioning of the *Mar/AcrAB* efflux pump of *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology*, 178: 5803-5803.
36. FURUKAWA, H.; TSAY, J- T.; JACKOWSKI, S.; TAKAMURA, Y.; ROCK, C. O., 1993. Thiolactomycin resistance in *Escherichia coli* is associated with the multidrug resistance efflux pump encoded by *emrAB*. *Journal Bacteriology*, 175: 3723-3729.
37. GUSTAFSSON, I.; SJÖLUND, M.; TORELL, E.; JOHANNESSON, M.; ENGSTRAND, L.; CARS, O.; ANDERSSON, D., 2003. Bacteria with increased mutation frequency and antibiotic resistance are enriched in the commensal flora

- of patients with high antibiotic usage. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 645-650.
38. HIGGINS, C. F., ABC transporters: physiology, structure and mechanism-an overview. *Research in Microbiology*, 152: 205-210. HOIBY, N.; JARLOV, J.; KEMP, M.; *et al*, 1997. Excretion of ciprofloxacin in sweat and multiresistant *Staphylococcus epidermidis*. *Lancet*, 349: 167-169.
39. HOOPER, D. C., 2005. Efflux pumps and nosocomial antibiotic resistance: A primer for Hospital epidemiologists. *Healthcare Epidemiology: Clinical Infectious Diseases*, 40: 1811-1817.
40. JELLEN-RITTER, A. S.; KERN, W. V., 2001. Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants selected with a fluoroquinolone. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45: 1467-14672.
41. JERNAES, M. W.; STEEN H. B., 1994. Staining of *Escherichia coli* for Flow Cytometry: Influx and Efflux of Ethidium Bromide. *Cytometry*, 17: 302-309.
42. JONES, M. E.; DRAGHI, D. C.; THORNSBERRY, C.; KARLOWSKY, J. A.; SAHM, D. F.; WENZEL, R. P., 2004. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit-a European and North American Surveillance study (2000-2002). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, BioMed. Central*, 14: 1-11.
43. KAATZ, G. W.; MOUDGAL, V. V.; SEO, S. M.; KRISTIENSEN, J. E., 2003. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 47: 719-726.
44. KANAMARU, K.; TATSUNO, I.; TOBE, T.; SASAKAWA, C., 2000. SidA, an *Escherichia coli* homologue of *quorum-sensing* regulators, controls the

- expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7. *Molecular Microbiology*, 38: 805-816.
45. KARAM, G. H.; HEFFNER, J. E., 2000. Emerging Issues in Antibiotic Resistance in Blood-borne Infections. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*, 162: 1610-1616.
46. KIM K S.; KIM E. J., 2005. The phenothiazine drugs inhibit potassium channels. *Drug Chemotherapy Toxicology*, 28: 303–313.
47. KLEIN, J. R.; HENRICH, B.; PLAPP, R., 1991. Molecular analysis and nucleotide sequence of the *envCD* operon of *Escherichia coli*. *Molecular & General Genetics*, 230: 230-240.
48. KOBAYASHI, N.; NISHINO, K.; YAMAGUCHI, A., 2001. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology*, 183: 5639-5642.
49. KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P., 2005. Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 1486-1513.
50. KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P., 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 1486-1513.
51. LAGE, H., 2003. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers, *International Journal Antimicrobial Agents*, 22: 188-199.
52. LANGTON, K. P.; HANDERSON, J. F.; HERBERT, R., 2005. Antibiotic resistance: multidrug efflux proteins, a common transport mechanism?. *Natural Product Reports*, 22: 439-451.

53. LAU, S. Y.; ZGURSKAYA, H. I., 2005. Cell Division in *Escherichia coli* Deficient in the Multidrug Efflux Transporter AcrEF-TolC. *Journal of Bacteriology*, 189(15): 7815-7825.
54. LI, X. Z., 2005. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *International Journal Antimicrobial Agents*, 25: 453-463.
55. LI, X. Z.; NIKAIDO, H., 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 64: 159-204.
56. LOMOVSKAYA, O.; LEWIS, K., 1992. Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance, *Proceedings of the National. Academy of Science*, 89: 8938-8942.
57. LOMOVSKAYA, O.; ZGURSKAYA, HELEN I.; TOTROV, M.; WATKINS W. J., 2007. Waltzing transporters and “the dance macabre” between humans and bacteria. *Nature Publishing Group*, 6: 56-64.
58. MA, C.; CHANG, G., 2004. Structure of the multidrug resistance efflux transporter EmrE from *Escherichia coli*, *Proceedings of the National Academy of Science*, 101: 2852-2857.
59. MA, D.; COOK, D.N.; ALBERTI, M.; PON, N. G.; NIKAIDO, H.; HEARST, J. E., 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology*, 175: 6299-6313.
60. MA, D.; COOK, D. N.; HEARST, J. E.; NIKAIDO, H., 1994. Efflux pumps and drug resistance in Gram negative bacteria. *Trends Microbiology*, 2: 489-493.
61. MAHAMOUD, A.; CHEVALIER, J.; ALIBERT-FRANCO, S.; KERN, W. V.; PAGÈS, J. M., 2007. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6): 1223-1229.

62. MALLEA, M.; MAHAMOUD, A.; CHEVALIER, J.; ALIBERT-FRANCO, S.; BROUANT, P.; BARBE, J.; PAGÈS, J. M., 2003. Alkylaminoquinolones inhibit the bacterial antibiotic efflux pump in multidrug resistant clinical isolates. *Biochemical Journal*, 376: 801-805.
63. MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R.; FOXMAN, B.; O'BRYAN, T. T.; FULLERTON, K. E.; RILEY, L.W., 2001. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *The New England Journal of Medicine*, 345(14):1007-1013.
64. MARQUEZ, B., 2005. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*, 87: 1137-1147.
65. MARTINS, M.; SANTOS, B.; MARTINS, A.; VIVEIROS, M.; COUTO, I.; CRUZ, A.; The management committee members of cost B16 of the european commission/European Science Foundation, PAGÈS, J. M.; MOLNAR, J.; FANNING, S.; AMARAL, L., 2006. An instrument free method for the demonstration of efflux pump activity of bacteria. *In Vivo*, 20: 657-664.
66. MARTINS, M.; DASTIDAR, S. G.; FANNING, S.; KRISTIENSEN, J. E.; MOLNAR, J.; PAGÈS, J. M.; SCHELZ, Z.; SPENGLER, G.; VIVEIROS, M.; AMARAL, L., 2008. Potential role of non-antibiotics (helper compounds) in the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections: mechanisms for their direct and indirect activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31: 198-208.
67. MARTINS, M.; SANTOS, B.; MARTINS, A.; VIVEIROS, M.; COUTO, I.; CRUZ, A.; PAGÈS, J. M.; FANNING, S.; AMARAL, L., 2006. An instrument free Method for the demonstration of Efflux Pump Activity of Bacteria. *In vivo*, 20: 3-10.

68. MAYNARD, C.; BEKAL, S.; SANSCHAGRIN, F.; *et al*, 2004. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extra-intestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *Journal Clinical Microbiology*, 42: 5444-5452.
69. MAZZARIOL, A.; TOKUE, Y.; KANEGAWA, T. M.; CORNAGLIA, G.; NIKAIDO, H., 2000. High-Level Fluoroquinolone-Resistant Clinical Isolates of *Escherichia coli* Overproduce Multidrug Efflux Protein AcrA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (12): 3441-3443.
70. MORIMYO, M.; HONGO, E.; HAMA-INABA, H.; MACHIDA, I., 1992. Cloning and characterization of the *mvrC* gene of *Escherichia coli* K-12 which confers resistance against methyl viologen toxicity. *Nucleic Acids Research*, 20: 3159-3165.
71. MORITA, Y.; KODAMA, K.; SHIOTA, S.; MINE, T.; KATAOKA, A.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T., 1998. NorM, a putative multidrug efflux protein of *Vibrio parahaemolyticus* and is homolog in *Escherichia coli*, *Antimicrobial Agents chemotherapy*, 42: 1778-1782.
72. NARODITSKAYA, V.; SCHLOSSER, M. J.; FANG, N. Y.; LEWIS, K., 1993. An *E. coli* gene *emrD* is involved in adaptation to low energy shock. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 196: 803-809.
73. NIKAIDO, H., 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current Opinion in Microbiology*, 1: 516-523.
74. NIKAIDO, H., 2001. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Cell & Developmental Biology*, 12: 215-223.

75. NIKAIDO, H., 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4): 593-656.
76. NIKAIDO, H.; ZGURSKAYA, H. I., 2001. AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *Journal Molecular Microbiology Biotechnology*, 3(2): 215-218.
77. NISHINO, K.; YAMAGUCHI, A., 2001. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183: 5803-12.
78. NISHINO, K.; YAMAGUCHI, A., 2002. EvgA of the two-component signal transduction system modulates production of the YhiUV multidrug transporter in *Escherichia coli*, *Journal Bacteriology*, 184: 2319-2323.
79. NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A., 2006 Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1 (3): 1561-1582.
80. OKUSU, H.; MA, D.; NIKAIDO, H., 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (*Mar*) mutants. *Journal Bacteriology*, 178: 306-308. *EMBO Reports*, 7 (7): 688-693.
81. PAIXÃO, L., 2007. Caracterização e modelação do transporte de brometo de etídeo em *Escherichia coli*. Tese de Mestrado em Engenharia Biológica. Universidade Técnica de Lisboa.
82. PAIXÃO, L., 2006. Estudo do efluxo de compostos através da parede de *Escherichia coli* por quantificação de substâncias fluorescentes. Tese de Licenciatura em Engenharia Biológica. Universidade Técnica de Lisboa.
83. PANKEY, G. A., 2005. Tigecycline. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 470-480.

84. PATERSON, D. L., 2006. Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. American Journal of Medicine, 119 (suppl.): S20-S28.
85. PAULSEN, I.T.; BROWN, M.; SKURRAY, R. A., 1996. Proton-Dependent Multidrug Efflux Systems. Microbiological Reviews, 60 (4): 575-608.
86. PAULSEN, I. T.; SKURRAY, R. A.; TAM, R.; SAIER, M. H.; TURNER, R. J.; WEINER, J. H.; GOLDBERG, E. B.; GRINIUS, L. L., 1996. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. Molecular Microbiology, 19: 1167-1175.
87. PETERSEN, P. J.; JACOBUS, N. V.; WEISS, W. J. ; SUM, P. E.; TESTA, R. T., 1999. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of a novel glycylicycline, the 9-*t*-butylglycylamido derivative of minocycline (GAR-936). Antimicrobial Agents Chemotherapy, 43:738-744.
88. PIDDOCK, L. J. V., 2006. Multidrug-resistance efflux pumps-not just for resistance. Nature Reviews Microbiology, 4: 629-635.
89. PIDDOCK, L. J. V., 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clinical Microbiology Reviews, 19 (2): 382-402.
90. KOHLER, T.; PECHE'RE, J.C.; PLÉSIAT, P., 1999. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. CMLS, Cell and Molecular Life Sciences, 56: 771-778.
91. PLISHKER G. A., 1984. Phenothiazine inhibition of calmodulin stimulates calcium-dependent potassium efflux in human red blood cells. Cell Calcium, 5: 177-185.
92. POOLE, K., 2000. Efflux-mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Negative Bacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44 (9): 2233-2241.

93. POOLE, K., 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 12-26.
94. POOLE, K., 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 20-51.
95. POOLE, K., 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Internal Medicine*, 1-15.
96. POOLE, K.; LOMOVSKAYA, O., 2006. Can efflux inhibitors really counter resistance?. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 3 (2): 145-152.
97. PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A., 1999. *Microbiology*. 4th ed., MacGraw Hill, E.UA..
98. PUTMAN, M.; VEEN, H. W.; KONINGS, W. N., 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 672-693.
99. QIAGEN. 2001. RNeasy® Mini Handbook. Qiagen, Hilden, Alemanha.
100. QIAGEN, 2003b. Quantitect™ SYBR® Green PCR Handbook. QIAGEN, Hilden, Alemanha.
101. QIAGEN, 2005. RNAprotect® Bacteria Reagent Handbook. QIAGEN, Hilden, Alemanha.
102. RAAD, I.; CHATZINIKOLAOU, G.; CHAIBAN, G.; HANNA, H.; HACHEN, R.; DVORAK, T.; COOK, G.; COSTERTON, W., 2003. *In vitro* and *ex vivo* activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 47: 3580-3585.
103. RAAD, I.; HANNA, H.; DVORAK, T.; CHAIBAN, G.; HACHEM, R., 2007. Optimal Antimicrobial Catheter Lock Solution, using different combinations of

- Minocycline, EDTA, and 25-percent ethanol, rapidly eradicates organisms embedded in Biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, (1): 78-83.
104. RAHMATI, S.; YANG, S.; DAVIDSON, A. L.; ZECHIEDRICH, E. L., 2002. Control of the AcrAB multidrug efflux pump by *quorum-sensing* regulator SdiA. *Molecular Microbiology*, 43: 677-685.
105. RETSEMA, J.; FU, W., 2001. Macrolides: structures and microbial targets. *International Journal Antimicrobial Agents*, 18: S3-S10.
106. REYES, C. L.; CHANG, G., 2005. Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP-vanadate and lipopolysaccharide. *Science*, 308: 1028-1031.
107. ROBERTS, M. C., 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Letters*, 19: 1-24.
108. ROBERTS, M. C., 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 245:195-203.
109. ROSENBERG, E. Y.; MA, D.; NIKAIDO, H., 2000. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *Journal Bacteriology*, 182: 1754-1756.
110. SAIER, M. H.; BEATTY, J. T.; GOFFEAU, A.; HARLEY, K. T.; HEJINE, W. H.; HUANG, S. C.; JACK, D. L.; JAHN, P. S.; LEW, K.; LIU, J.; *et al*, 1999. The major facilitator superfamily. *Journal Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1: 257-279.
111. SAIER, M. H., 2000. Families of transmembrane sugar transport proteins. *Molecular Microbiology*, 35: 699-710.
112. SAMAHA-KFOURY, J.; ARAJ, G. F., 2003. Recent developments in β -lactamases and extended spectrum β -lactamases. *British Medical Journal*, 327: 1209-1213.

113. SANCHEZ, S.; STEVENSON, M. A. M.; HUDSON, C.; MAIER, M.; BUFFINGTON, T.; DAM, Q.; MAURER, J. J., 2002. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* Isolates Associated with Nosocomial Infections in Dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (10): 3586-3595.
114. SILVER, L. L., 2007. Multi-targeting by monotherapeutic antibacterials. *Nature reviews*, 6: 41-55.
115. SKOLD, O., 2000. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, 3: 155-160.
116. STRANGE, K., 2004. Cellular volume homeostasis. *Advances in Physiology Education*, 28: 155-159.
117. SUN, H.; LIU, X.; XIONG, Q.; *et al*, 2006. Chronic inhibition of cardiac Kir2.1 and potassium channels by celastrol with dual effects on both ion conductivity and protein trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 5877-84.
118. TENOVER, F. C., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Medicine*, 119 (6A): S3-S10.
119. THANASSI, D. G.; CHENG, L.W.; NIKAIDO, H., 1997. Active Efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology*, 179: 2512-2518.
120. TSENG, T. T.; GRATWICK, K. S.; KOLLMAN, J.; PARK, D.; NIES, D. H.; GOFFEAU, A.; SAIER, M. H., 2003. The RND permease family: An ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1: 107-125.
121. VIVEIROS, M.; JESUS, A.; BRITO, M.; LEANDRO, C.; MARTINS, M.; ORDWAY, D.; MOLNAR, A. M.; MOLNAR, J.; AMARAL, L., 2005. Inducement and reversal of Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* K-12

- and Expression of Proton gradient-Dependent Multidrug Efflux Pump Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (8): 3578-3582.
122. VIVEIROS, M.; DUPONT, M.; RODRIGUES, L.; COUTO, I.; DAVIN-REGLI, A.; MARTINS, M.; PAGÈS, J. M.; AMARAL, L., 2007. Antibiotic Stress, Genetic Response and Altered Permeability of *E. coli*. <http://www.plosone.org>, issue 4: 1-9.
123. VIVEIROS, M.; JESUS, A.; BRITO, M.; LEANDRO, C.; MARTINS, M.; ORDWAY, D.; MOLNAR, A.M.; MOLNAR,J.; AMARAL,L., 2005. Inducement and Reversal of Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* K-12 and Expression of Proton Gradient-Dependent Multidrug Efflux Pump Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (8): 3578-3582.
124. VIVEIROS, M.; MARTINS, A.; PAIXÃO, L.; RODRIGUES, L.; MARTINS, M.; COUTO, I.; FAHNRICH, E.; KERN, W. V.; AMARAL, L., 2008. Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31: 458-462.
125. WAKSMAN, S. A., TISHLER, M., 1942. The Chemical Nature of Actinomycin, an Anti-microbial Substance produced by *Actinomyces Antibioticus*. *Journal of Biological Chemistry*, 142: 519-528.
126. WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V., 2001. Absence of mutations in *marAB* or *soxRS* in *acrB*-overexpressing fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45: 1550-1552.
127. WEBBER, M. A.; TALUKDER, A.; PIDDOCK, L. J. V., 2005. Contribution of mutation at amino acid 45 of AcrR to *acrB* expression and ciprofloxacin

- resistance in clinical and veterinary *Escherichia coli* isolates. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49: 4390-4392.
128. WHITE, D. G.; GOLDMAN, J. D.; DEMPSE, B.; LEVY, S. B., 1997. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology*, 1179: 6122-6126.
129. WRIGHT, GERARD D., 2003. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7: 563-569.
130. YANG, S.; CLAYTON, S. R.; ZECHIEDRICH, E. L., 2003. Relative contributions of the *AcrAB*, *mdfA* and *NorE* efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 545-56.
131. YIN, C. C.; ALDEMA-RAMOS, M. L.; BORGES-WALMSLEY, M. I.; TAYLOR, R. W.; WALMSLEY, A. R.; LEVY, S. B.; BULLOUGH, P. A., 2000. The quaternary molecular architecture of *TetA*, a secondary tetracycline transporter from *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, 38: 482-492.
132. YU, E. W.; AIRES, J. R.; NIKAIDO, H., 2003. *AcrB* multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *Journal Bacteriology*, 185: 5657-5664.
133. ZGURSKAYA, H. I.; LAU, S. Y., 2005. Cell division Defects in *Escherichia coli* Deficient in the Multidrug Efflux Transporter *AcrEF-TolC*. *Journal of Bacteriology*, 187 (22): 7815-7825.
134. ZLOH, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S., 2003. Inhibitors of multidrug resistance (MDR) have affinity for MDR substrates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14: 881-885.