

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Mecanismos de resistência aos antibióticos em bactérias de Gram negativo com suscetibilidade diminuída aos carbapenemes: caracterização laboratorial

Constança Bertolucci Simões

DISSERTAÇÃO
MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Mecanismos de resistência aos antibióticos em bactérias de Gram negativo com suscetibilidade diminuída aos carbapenemes: caracterização laboratorial

Constança Bertolucci Simões

Orientada por:

Professora Doutora Manuela Caniça

Professora Doutora Deodália Dias

DISSERTAÇÃO

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2013

Agradecimentos

Doutora Manuela Caniça,

Muito obrigada por tudo, por ter aceite orientar este trabalho e por me receber. Muito obrigado pela disponibilidade, pela ajuda fundamental, e por tudo o que me ensinou.

Doutora Deodália Dias,

Muito obrigada pelos conselhos sábios e por me ter orientado durante os dois anos de mestrado.

Doutora Eugénia Ferreira,

Muito obrigada também por me receber, por me ensinar tudo o que sabe, pela ajuda sempre que precisei, pelos momentos alegres que proporciona.

Doutora Vera Manageiro e Daniela Jones-Dias,

Um grande obrigado às duas, foram imprescindíveis e insubstituíveis na realização e conclusão deste trabalho.

Stephanie Barbosa e Joana Almeida,

Muito obrigada por serem as minhas companheiras neste percurso laboratorial. Por me ajudarem em tudo o que precisei.

Aos meus pais,

Um enorme obrigado por me acompanharem em todos os meus projetos.

Família,

Um Obrigado sincero.

Constança, Sara e Inês,

Constança, 15 ótimos anos, obrigada por estares em todos os momentos, principalmente nos importantes. Sara e Inês, como se vos conhecesse desde sempre, obrigada.

GASNovenses, GASNova, companheiros de Missão,
Obrigada por me ajudarem a perceber tanta coisa.

São Tomé,
Um grande obrigado pela inspiração final, Sabuá.

Aos meus amigos,
Obrigada por me alegrarem.

Fábio,
Só porque gosto de ti.
Obrigada por me dares música sempre que preciso.

À Doutora Manuela Caniça e ao Instituto Nacional da Saúde Dr. Ricardo Jorge,
Pela possibilidade de realizar o meu trabalho e por todas as condições oferecidas,
sem as quais, não teria sido possível a concretização deste mestrado.

Sumário

Os carbapenemes são antibióticos β -lactâmicos utilizados como último recurso no tratamento de infecções causadas por bactérias de Gram negativo. Considerando a emergência da resistência a estes antibióticos, importa esclarecer os mecanismos que estão na origem desta diminuição de suscetibilidade.

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar, laboratorialmente, os mecanismos responsáveis pela resistência aos carbapenemes em isolados clínicos de Gram negativo, a sua multirresistência, e as vias implicadas na possível disseminação dessa resistência.

Dos 426 isolados estudados, foram identificados 22 (5%) com suscetibilidade diminuída ao ertapeneme, os quais foram retidos para a restante investigação. Assim, com os testes de suscetibilidade aos antibióticos realizados, verificou-se que 4% dos isolados apresentavam multirresistência aos antibióticos, tendo ainda permitido prever mecanismos de resistência responsáveis pelos fenótipos encontrados, e orientar os estudos bioquímicos e moleculares. Estas duas últimas abordagens metodológicas identificaram e caracterizaram a expressão de carbapenemases (3 KPC-3 e 1 GES-5) e/ou a expressão de β -lactamases de espectro alargado (ESBL) ou AmpC (MIR-tipo). Em 21 isolados foi identificada a alteração aminoácida das principais porinas (por inserção, deleção e/ou substituição): OmpK35, OmpK36, OmpK37 (*Klebsiella pneumoniae*), OmpC, OmpF (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter cancerogenus*), Omp35 e Omp36 (*Enterobacter aerogenes*). A ESBL predominante foi a β -lactamase CTX-M-15 (n=11) em co-expressão com OXA-1 e TEM-1, bem como a enzima Aac(6')-Ib-cr (n=8) e OqxAB (n=5); um isolado co-expressava a ESBL SHV-12 e GES-5. Foram identificadas outras β -lactamases, como SHV-1, SHV-11 e SHV-32. Se *E. coli* pertencia à sequência tipo ST131, estirpe pandémica, já *K. pneumoniae* apresentou diversidade genética, destacando-se 2 isolados com ST147, disseminado em vários países, e o novo ST1138.

Globalmente, este estudo dá um contributo muito importante para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na resistência aos carbapenemes (cuja disseminação clonal e horizontal é preocupante), nomeadamente em isolados com multirresistência, realçando-se a resistência plasmídica às fluoroquinolonas.

Palavras-chave: Gram negativo; Carbapenemases; ESBL; porinas.

Abstract

Carbapenems are a group of β -lactam antibiotics that constitute one of the last resorts in the treatment of infections caused by Gram negative bacteria. Considering the emerging rates of resistance to these antibiotics, the investigation of its mechanisms constitutes an important assignment.

Thus, this study aimed to characterize the carbapenem resistance mechanisms harbored by Gram negative isolates, the co-resistance to structurally unrelated antibiotics (such as fluoroquinolones), and the features contributing to the potential resistance dissemination.

Among the 426 isolated studied, 22 (5%) revealed to be non-susceptible to ertapenem and were consequently retained to further investigations. The antibiotic susceptibility evaluation enabled the prediction of the respective resistance mechanisms and guided the remaining biochemical and molecular studies; it also revealed that 4% of the isolates were multidrug resistant.

The last two methodological approaches identified and characterized the expression of carbapenemases (3 KPC-3 and 1 GES-5), extended-spectrum β -lactamases (ESBL) or AmpC (MIR-type). In 21/ 22 isolates, amino acid substitutions were identified (through insertions, deletions or mutations) in the main porins: OmpK35, OmpK36, OmpK37 (*Klebsiella pneumoniae*), OmpC, OmpF (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter cancerogenus*), Omp35 and Omp36 (*Enterobacter aerogenes*).

Overall, the main ESBL detected was the CTX-M-15 (n=11), together with OXA-1 and TEM-1, as well as the acetyltransferase Aac(6')-Ib-cr (n=8) and efflux pump OqxAB (n=5); one of the isolates harbored ESBL SHV-12 and GES-5. Globally, other important β -lactamases, such as SHV-1, SHV-11 e SHV-32, were detected. Moreover, in what regards genetic diversity, *E. coli* isolates belonged mainly to the pandemic ST131, while *K. pneumoniae* showed increased ST variety with a focus on internationally disseminated ST147 and the novel ST1138.

Globally, this study provides meaningful insights towards the understanding of emergent carbapenem resistance (which is spreading clonally and horizontally), as well as plasmid mediated fluoroquinolone resistance mechanisms, particularly in a worrying multidrug resistant scenario.

Keywords: Gram negative; Carbapenemases; ESBL, porins

Índice

Agradecimentos.....	i
Sumário.....	iii
Abstract.....	iv
Índice.....	v
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Principais classes de antibióticos e mecanismos de ação.....	2
1.1.1. Antibióticos β -lactâmicos.....	2
1.1.2. Fluoroquinolonas.....	3
1.1.3. Aminoglicosídeos.....	4
1.1.4. Colistina.....	4
1.1.5. Sulfonamidas.....	4
1.1.6. Fosfomicina.....	5
1.1.7. Nitrofuranos.....	5
1.1.8. Tigeciclina.....	5
1.2. Resistência aos antibióticos.....	5
1.2.1. Resistência intrínseca e adquirida.....	5
1.2.2. Mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos.....	7
1.2.3. Mecanismos de resistência às fluoroquinolonas.....	15
1.3. Multirresistência.....	16
1.4. Infecções adquiridas no hospital e na comunidade.....	17
1.5. Epidemiologia da resistência aos antibióticos.....	18
1.6. Objetivos do estudo.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1. Isolados bacterianos.....	23
2.2. Avaliação fenotípica da suscetibilidade aos antibióticos.....	25
2.2.1. Pesquisa da suscetibilidade aos carbapenemes.....	25
2.2.2. Teste de suscetibilidade aos antibióticos.....	25
2.2.3. Teste de Sinergia com Ertapeneme.....	26
2.2.4. Teste de Suscetibilidade ao Cloranfenicol.....	28
2.3. Caracterização Bioquímica.....	28
2.3.1. Focagem Isoelétrica: β -lactamases.....	28

2.3.2.	SDS-PAGE – OMPs	30
2.4.	Caracterização molecular de mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos	32
2.4.1.	Extração de DNA	32
2.4.2.	Polymerase Chain Reaction (PCR)	32
2.4.3.	Purificação dos produtos PCR	37
2.4.4.	Sequenciação nucleotídica de genes de resistência	37
2.5.	Deteção e identificação de plasmídeos	38
2.5.1.	Conjugação	38
2.5.2.	Determinação da localização cromossômica ou plasmídica de genes <i>bla</i> : restrição com a enzima I-CeuI	39
2.5.3.	Pesquisa do grupo de incompatibilidade por PCR Based Replicon Type (PBRT) 40	
2.6.	Determinação da clonalidade e diversidade genética	42
2.6.1.	Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)	42
2.6.2.	MLST	42
3.	Resultados	44
3.1.	Análise da suscetibilidade aos antibióticos	44
3.1.1.	Suscetibilidade aos carbapenemes	44
3.1.2.	Perfil de suscetibilidade aos antibióticos e multirresistência	44
3.1.3.	Confirmação fenotípica de mecanismos de resistência aos carbapenemes	47
3.2.	Caracterização de β -lactamases	48
3.2.1.	Ponto isoelétrico	48
3.2.2.	Perfil genotípico: genes <i>bla</i>	49
3.3.	Porinas	51
3.3.1.	Perfil de OMPs por SDS-PAGE	51
3.3.2.	Perfil Genotípico: genes <i>omp</i>	53
3.3.3.	Identificação dos genes <i>omp</i> por sequenciação nucleotídica	53
3.4.	Mecanismos de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos	63
3.4.1.	Suscetibilidade ao cloranfenicol e às quinolonas	63
3.4.2.	Isolados PMQR positivos	63
3.5.	Suporte genético de genes de resistência	65
3.5.1.	Transferência plasmídica de genes de resistência	65
3.4.1.	Localização plasmídica/cromossômica dos genes de resistência	65
3.4.2.	Caracterização de plasmídeos	67
3.5.	Ambiente genético do gene <i>bla</i> _{KPC}	67

3.6. Determinação da clonalidade e diversidade genómica	67
4. Discussão	69
5. Conclusão.....	80
6. Bibliografia.....	81
7. Anexos	90
Anexo I	90
Anexo II	91
Anexo III	92
Anexo IV	93
Anexo V	93
Anexo VI.....	94

Índice de Figuras

Fig. 1. Estrutura das principais classes de antibióticos β -lactâmicos..	3
Fig. 2. Ilustração do modelo tridimensional de uma porina baseada na estrutura da porina OmpK36 de <i>K. pneumoniae</i>	13
Fig. 3. Esquema representativo da distribuição de carbapenemases na Europa em 2013.	20
Fig. 4. Tabela representativa da prevalência de CPE em 39 países da Europa durante 2010, 2012 e 2013.....	21
Fig. 5. Distribuição de 426 isolados, de acordo com a sua origem.	24
Fig. 6. Distribuição dos discos no teste de sinergia com ertapeneme.....	27
Fig. 7. Esquema de interpretação da leitura do teste de sinergia com ertapeneme.	27
Fig. 8. Isolados (n=22) com suscetibilidade diminuída ao ertapeneme por espécie bacteriana e por hospital.....	44
Fig. 9. A, Perfil de suscetibilidade de 22 isolados aos antibióticos β -lactâmicos obtido no TSA. B, Perfil de suscetibilidade de 22 isolados às quinolonas, aminoglicosídeos e a antibióticos de 5 outras classes, obtido no TSA.	46
Fig. 10. Imagem do TSA de uma estirpe produtora de β -lactamase KPC.....	47
Fig. 11. Teste do ertapeneme (isolado Kp6).....	48
Fig. 12. Perfis de OMPs dos isolados.....	52
Fig. 13. Alinhamento das sequências dos genes <i>aac(6')-Ib-cr</i> e <i>aac(6')-Ib</i>	64
Fig. 14. Esquema representativo do alinhamento da sequência nucleotídica dos genes <i>oqxA</i> e <i>oqxB</i>	64
Fig. 15. Representação do PFGE.....	68
Fig. 16. Ilustração da filogenia do ST1138.....	68

Índice de Tabelas

Tabela 1. Distribuição de 426 isolados bacterianos, por hospital.....	23
Tabela 2. Origem de 426 isolados bacterianos: produto biológico.	24
Tabela 3. Antibióticos (disco e respetiva carga) utilizados no TSA	26
Tabela 4. Descrição dos reagentes utilizados na preparação do gel de migração.....	29
Tabela 5. Descrição dos reagentes utilizados na preparação do gel de revelação.	30
Tabela 6. Caraterísticas dos <i>primers</i> utilizados na amplificação por PCR <i>multiplex</i> e PCR simples de genes <i>bla</i> _{ESBL} , e na sequenciação.	33
Tabela 7. Caraterísticas dos <i>primers</i> utilizados na amplificação por PCR <i>multiplex</i> dos genes <i>ampC</i> plasmídicos (PMA β), para o PCR simples <i>bla</i> _{ACT} e na sequenciação.	33
Tabela 8. Caraterísticas dos <i>primers</i> utilizados na amplificação por PCR <i>multiplex</i> , e na sequenciação dos genes que conferem resistência às quinolonas (PMQR).	34
Tabela 9. Caraterísticas dos <i>primers</i> utilizados na amplificação por PCR dos genes <i>bla</i> _{CTX-M} e na sequenciação	35
Tabela 10. Caraterísticas dos <i>primers</i> utilizados na amplificação por PCR dos genes que codificam carbapenemases de classe A, classe B e classe D.....	35
Tabela 11. Caraterísticas dos <i>primers</i> utilizados na amplificação por PCR e na sequenciação dos genes que codificam as porinas OmpK35/OmpF/Omp35; OmpK36/OmpC/Omp36 e OmpK37.....	36
Tabela 12. Características dos <i>primers</i> usados na amplificação por PCR dos genes que caracterizam 18 grupos de incompatibilidade.	41
Tabela 13. <i>Primers</i> usados na amplificação por PCR e sequenciação dos genes incluídos no MLST de <i>K. pneumoniae</i>	42
Tabela 14. <i>Primers</i> usados na amplificação por PCR e sequenciação dos genes incluídos no MLST de <i>E. coli</i>	43
Tabela 15. Determinação do ponto isoeletrico de 22 isolados bacterianos com suscetibilidade diminuída ao ertapeneme.	49
Tabela 16. Genótipo correspondente às β -lactamases de 22 isolados com suscetibilidade diminuída ao ertapeneme	51
Tabela 17. Genótipo correspondente aos genes que codificam as porinas OmpK35, OmpF, Omp35, OmpK36, OmpC, Omp36 e Ompk37.	53

Tabela 18. Alterações identificadas na sequência aminoacídica da porina OmpK35 de isolados de <i>K. pneumoniae</i>	54
Tabela 19. Interpretação das alterações ao nível dos genes que codificam OMPs e respetivas substituições aminoacídicas.	55
Tabela 20. Alterações e deleções identificadas na sequência aminoacídica da porina OmpK37 de isolados de <i>K. pneumoniae</i>	56
Tabela 21. Alterações, inserções e deleções identificadas na sequência aminoacídica da porina OmpK36 de isolados de <i>K. pneumoniae</i>	57
Tabela 22. Alterações, inserções e deleções identificadas na sequência aminoacídica da porina OmpC de isolados de <i>E. coli</i>	60
Tabela 23. Alterações, inserções e deleções identificadas na sequência aminoacídica da porina OmpF de isolados de <i>E. coli</i>	60
Tabela 24. Inserções identificadas na sequência aminoacídica da porina Omp36 de isolados de isolados de <i>E. aerogenes</i>	60
Tabela 25. Perfil de suscetibilidade aos antibióticos, em 22 isolados, e respetivos mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos (produção de β -lactamases e alteração de porinas) e quinolonas (determinantes PMQR).	61
Tabela 26. Perfil de suscetibilidade aos 32 antibióticos estudados dos isolados clínicos e seus transconjugantes.	66
Tabela 27. Caracterização dos isolados clínicos e seus transconjugantes.	67

1. INTRODUÇÃO

Em 1929, Alexander Fleming descobriu a penicilina e em 1939, Florey e os seus colegas, na universidade de Oxford, isolaram novamente este composto. Em 1944, Waksman isolou a estreptomicina e, subsequentemente, descobriu agentes como o cloranfenicol, tetraciclinas e eritromicina em amostras provenientes do solo. Nos anos 60, o melhoramento das técnicas de fermentação, e os avanços científicos permitiram a síntese de novos compostos através da modificação molecular de outros já existentes, resultando num enorme progresso no desenvolvimento de novos agentes antibacterianos (Neu and Gootz, 1996).

As bactérias vivem em simbiose com o homem e têm capacidade para desenvolver diversos mecanismos que as capacitam para sobreviver sob condições que lhes são adversas. A maioria dos agentes antibacterianos, descobertos na chamada era dourada dos antibióticos (entre 1945-1960), são produtos naturais extraídos de microrganismos. Estes são metabolitos secundários, produzidos pelas bactérias para travar o crescimento de microrganismos competidores ou, podem ser, também, moléculas sinalizadoras com outras funções, mas que, em concentrações elevadas, têm um efeito antibiótico. Assim, estes organismos têm estratégias de resistência aos antibióticos, inativando-os ou protegendo-se contra os efeitos tóxicos dos mesmos (Choffnes et al, 2010).

O desenvolvimento de antibióticos sintéticos, tais como as fluoroquinolonas, fez pensar que seriam menos suscetíveis de causar resistência, dado que as bactérias não estão expostas a estes compostos, e, portanto, não poderiam desenvolver mecanismos de resistência. No entanto, ao longo do tempo, as bactérias desenvolveram sistemas de efluxo para as proteger de diversas moléculas tóxicas naturais; normalmente, são também estes mecanismos que as protegem da ação de moléculas sintéticas. Assim, os determinantes de resistência estão presentes em praticamente todas as bactérias e providenciam uma proteção contínua contra agentes tóxicos, mesmo quando não houve uma exposição prévia (National Research Council , 2006).

Os genes de resistência não se encontram apenas no genoma bacteriano, mas também em elementos genéticos móveis tais como plasmídeos, transposões e integrões, o que permite uma rápida transferência horizontal de organismo para organismo, mesmo entre espécies diferentes (National Research Council, 2006).

A frequência de seleção desses eventos e da aquisição de elementos genéticos aumenta com a exposição aos antibióticos. Não é então surpreendente que, locais onde os antibióticos são utilizados de maneira excessiva, como por exemplo, hospitais, lares de idosos ou explorações de produção animal, sejam fontes de bactérias que possuem estes elementos genéticos móveis. A transmissão horizontal constante, entre bactérias, pode promover a acumulação de vários genes de resistência, originando o aparecimento de bactérias multirresistentes, sendo algumas causadoras de doenças cujos antibióticos disponíveis atualmente já não são ativos. (National Research Council, 2006).

1.1. Principais classes de antibióticos e mecanismos de ação

1.1.1. Antibióticos β -lactâmicos

A maioria dos antibióticos β -lactâmicos é caracterizada pela presença de um anel β -lactâmico de 4 átomos unido a um anel, secundário, de tiazolidina de 5 átomos, através de um átomo de azoto e um átomo de carbono adjacente (Figura 1). Na classe das cefalosporinas este anel secundário é um anel de 6 átomos, dihidrotiazina (Figura 1) (Nicolau, 2008). É com base neste anel, associado ao anel β -lactâmico, que se distinguem as diferentes subclasses, como as penicilinas, os penemes, monobactames, carbapenemes, cefamicinas, cefalosporinas (inclui a cefotaxima, CTX) e os inibidores das β -lactamases (Liras and Martin, 2006). Estes antibióticos atuam inibindo a ação das enzimas envolvidas na síntese da parede bacteriana. A integridade da parede é essencial para manter a célula, sendo esta constituída por unidades alternadas de ácido N-acetilmurâmico (NAM) e ácido N-acetilglucosamina (NAG). Um pentapéptido é ligado a cada unidade NAM e o *cross-linking* entre dois pentapetidos de cadeias lineares (NAM-NAG) vizinhas (pontes interpeptídicas), através da ligação D-alanil-D-alanina, é catalizado pelas proteínas de ligação à penicilina (PLP) que atuam como transpeptidases. Este *cross-linking* confere resistência à parede celular. O anel β -lactâmico é similar à unidade D-alanil-D-alanina do pentapéptido NAM levando a que as PLP, erroneamente, utilizem este anel na síntese da parede, resultando na acilação das PLP tornando-as incapazes de catalisar as reações seguintes.

Dos antibióticos β -lactâmicos, os carbapenemes possuem uma maior atividade contra bactérias de Gram negativo e Gram positivo e, por esta razão, são utilizados como antibióticos de última linha no tratamento de infeções causadas por bactérias com resistência aos antibióticos. Estes compostos caracterizam-se pela substituição de um átomo de enxofre por um átomo de carbono na posição 1 e pela presença de uma

ligação insaturada entre os átomos de carbono 2 e 3 no anel secundário (Figura 1). Ainda, a sua configuração trans na ligação C5-C6 aumenta a atividade antibacteriana. Através das cadeias laterais, unidas à estrutura bicíclica podem-se distinguir os diferentes carbapenemes (Nicolau, 2008) A tienamicina foi o primeiro composto, isolado de *Streptomyces cattleya*, identificado como carbapeneme. Devido à sua instabilidade química houve a necessidade de pesquisar outros derivados, e em 1985 descobriu-se o imipeneme, um derivado da tienamicina, mais estável e com atividade antibacteriana na presença de β -lactamases. A procura de compostos mais potentes e estáveis levou à descoberta do meropeneme, ertapeneme e doripeneme.

Tal como os outros antibióticos β -lactâmicos, os carbapenemes atuam mediante a ligação às PLP, diferindo das outras classes pela sua capacidade de ligação a múltiplas PLPs (Papp-Wallace et al, 2011).

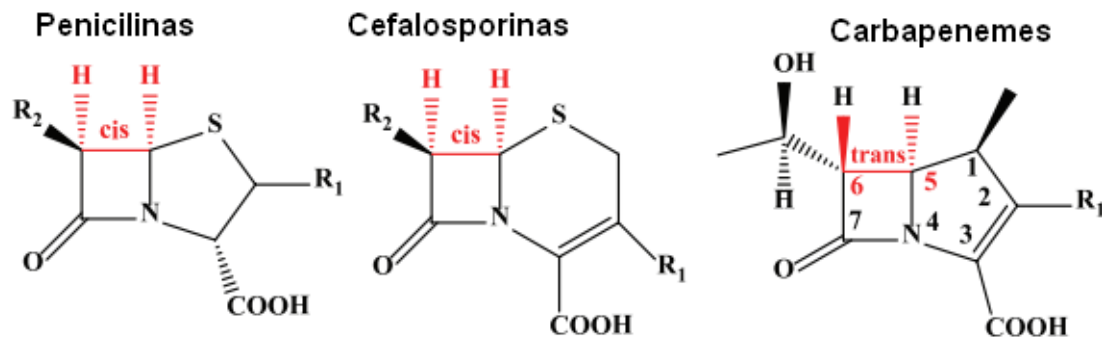


Fig. 1. Estrutura das principais classes de antibióticos β -lactâmicos. Adaptada de Papp-Wallace et al, 2011.

1.1.2. Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas representam uma classe de antibióticos de largo espectro, em grande expansão, que atuam em várias espécies de bactérias de Gram negativo. O seu modo de ação baseia-se na inibição de duas enzimas envolvidas na síntese do DNA bacteriano, especificamente a DNA girase e a topoisomerase IV; a DNA girase catalisa o superenrolamento negativo do DNA, e a topoisomerase IV é responsável pela decatenação dos replicões. Ao interagirem com o complexo DNA-enzima, alteram a conformação destas, resultando na inibição da atividade normal da enzima (Ruiz, 2003).

1.1.3. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos têm ação bactericida. O primeiro agente foi isolado a partir de uma bactéria pertencente ao género *Streptomyces*, dando o nome ao antibiótico estreptomicina, em 1943. O seu modo de ação baseia-se na ligação à subunidade ribossomal 30S, interferindo com a tradução proteica.

Para atingir este alvo, as moléculas aminoglicosídicas têm que passar pela membrana bacteriana, através de um processo de interação electrostática entre as moléculas de antibiótico com carga positiva e os lipopolisacáridos da membrana exterior com carga negativa, seguido de duas fases dependentes de energia, através das quais os aminoglicosídeos atingem o seu alvo (Becker and Cooper, 2013).

1.1.4. Colistina

A colistina é um agente bactericida, que atua em bactérias de Gram negativo, interagindo com o lípido A dos lipopolisacáridos (LPS), causando a desorganização da membrana externa da bactéria. Foi um dos primeiros antibióticos a ser utilizado no tratamento de infeções causadas por bactérias de Gram negativo, mas deixou de ser usado devido aos seus efeitos nefrotóxicos e neurotóxicos. No entanto, nos últimos anos, depois de reavaliada a sua toxicidade, tem sido usado no tratamento de bactérias multirresistentes (Nation and Li, 2009).

1.1.5. Sulfonamidas

O mecanismo de ação das sulfonamidas baseia-se na inibição da enzima dihidropteroato sintetase, envolvida no metabolismo do ácido fólico (necessário para a síntese de DNA e RNA). Desde 1935 que esta classe de antibióticos é muito utilizada, tanto na medicina humana, como veterinária, o que contribuiu para o rápido aparecimento de mecanismos de resistência a este composto. Tal levou à utilização da combinação das sulfonamidas com o trimetoprim, agente com ação antimicrobiana semelhante às sulfonamidas, inibindo também passos essenciais na síntese do ácido fólico. Esta combinação tem sido largamente usada na prevenção e tratamento de várias infeções, em especial infeções do trato urinário e respiratórias (Vouloumanou et al, 2011; Mosquito et al, 2011).

1.1.6. Fosfomicina

A fosfomicina é um agente antibacteriano, natural, conhecido há mais de 40 anos, e atua a nível da parede bacteriana inibindo o primeiro passo na síntese do peptidoglicano, pois ao ligar-se à enzima UDP-N-acetilglucosamina enolpiruvil transferase (MurA), inibe a formação do ácido N-acetilmurâmico, um precursor do peptidoglicano. É um antibiótico de largo espectro, que atua em bactérias de Gram positivo e Gram negativo (*Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa*, exceto *Acinetobacter baumannii*). Recentemente, tem-se utilizado no tratamento de infecções urinárias e sistêmicas causadas por organismos multirresistentes, especialmente *Enterobacteriaceae*, no entanto, é importante ter em conta a potencial emergência de resistência durante o tratamento e a seleção de mutantes resistentes (Karageorgopoulos et al, 2012)

1.1.7. Nitrofuranos

Os nitrofuranos são um grupo de compostos cuja principal característica é a presença de um radical NO₂ na posição 5 do anel furano, sendo os principais representantes a furazolidona, nitrofurazona, furalzadona, nitrofurantoína e nitursol (Garau, 2008).

1.1.8. Tigeciclina

A tigeciclina, um derivado da minociclina, é o primeiro antibiótico da classe das gliciliclinas, apresentando um espectro de ação alargado, sendo eficaz em bactérias de Gram positivo e Gram negativo, nomeadamente estirpes resistentes a outras classes de antibióticos. O seu modo de ação baseia-se na ligação reversível à subunidade 30 S dos ribossomas bacterianos, impedindo a síntese de aminoácidos (Sun et al, 2013).

1.2. Resistência aos antibióticos

1.2.1. Resistência intrínseca e adquirida

A resistência bacteriana pode surgir por mecanismos intrínsecos ou adquiridos. Os mecanismos intrínsecos surgem naturalmente na bactéria e, no geral, essa resistência ocorre em todas ou quase todas as estirpes da mesma espécie (Tenover, 2006).

Os mecanismos adquiridos são mais preocupantes, visto que uma população, inicialmente suscetível, se torna resistente a um determinado antibiótico, podendo, sob pressão seletiva do mesmo, proliferar e expandir-se. As populações suscetíveis

podem tornar-se resistentes através de alterações ao nível do DNA, nomeadamente adquirindo informação genética de outras bactérias (Tenover, 2006).

A resistência aos antibióticos tem 4 causas: (1) alteração da proteína alvo onde o antibiótico se liga, modificando ou eliminando a zona de ligação; (2) produção de enzimas, que inativam o antibiótico; (3) alteração do canal proteico (porina), através do qual o antibiótico entrar na célula, ou (4) ativação de bombas de efluxo, que expulsam o antibiótico da célula para o exterior (Tenover, 2006).

A resistência das bactérias, através da aquisição de material genético de outras bactérias da mesma ou de espécies diferentes, pode fazer-se por três mecanismos: conjugação, transdução e transformação (Tenover, 2006). A existência de transposões e outros elementos genéticos móveis também pode facilitar a transferência do material genético para o genoma do hospedeiro ou para plasmídeos (Tenover, 2006).

A conjugação baseia-se na transferência de plasmídeos (que contêm genes de resistência aos antibióticos) para outra bactéria, através de uma estrutura proteica, os *pilus*, que unem os dois microrganismos.

Na transdução os genes de resistência são transferidos de uma bactéria para outra através de bacteriófagos.

A transformação ocorre quando há a lise de uma bactéria que contém genes de resistência, e as bactérias que estão no mesmo ambiente incorporam segmentos do DNA.

Os elementos genéticos móveis são essenciais para a aquisição de material genético de outras bactérias.

Os plasmídeos são das estruturas mais envolvidas neste processo. Correspondem a DNA extra-cromossómico, circular ou linear, de cadeia dupla, capazes de se replicarem autonomamente. Estes plasmídeos evoluem como parte integrante do genoma bacteriano, providenciando funções adicionais ao seu hospedeiro, podendo transportar genes que conferem um fenótipo vantajoso, tal como a resistência aos antibióticos (Carattoli, 2011).

As sequências de inserção (*Insertion Sequences – IS*) são os elementos genéticos mais pequenos, e mais abundantes, capazes de se moverem autonomamente no genoma bacteriano. Estes elementos codificam uma enzima denominada transposase responsável pela mobilidade através do reconhecimento de *inverted repeat sequences (IR)* e um processo de integração. Estes elementos causam mutações por inserção, rearranjo genómico e disseminam genes de resistência (Poirel et al, 2012).

Os transposões são outro elemento genético importante na disseminação de genes de resistência aos antibióticos. Estão organizados em duas classes, os transposões tipo Tn3 ou transposões de classe II, compostos por duas extremidades correspondentes a

inverted repeat sequences, uma transposase que reconhece as extremidades IR e corta o DNA alvo, e uma resolvase que atua como um regulador negativo da expressão de transposase e como uma recombinase mediando o processo; e os transposões de classe I, compostos por duas cópias de duas sequências de inserção. Estas duas cópias envolvem um fragmento de DNA externo e transportam-no. (Poirel et al, 2012).

Existe ainda outro elemento genético móbil importante, o integrão, uma unidade genética capaz de capturar, mobilizar e expressar genes contidos em elementos móveis denominados *gene cassettes*. São classificados em três grupos, mas os mais relevantes são os integrões de classe I, distribuídos largamente entre bactérias de Gram negativo e inclui os integrões de multirresistência, MDRI (Poirel et al, 2012).

1.2.2. Mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos

1.2.2.1. Produção de β -lactamases

A produção de β -lactamases é o mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos mais importante, em bactérias de Gram negativo. Já foram identificadas mais de 850 destas enzimas, que podem ser classificadas segundo: (1) a classificação de Ambler, que agrupa as β -lactamases em classes de A a D, com base na sequência de aminoácidos; e (2) a classificação de Bush-Jacoby-Medeiros, que inclui as enzimas nos grupos de 1 a 4, com base no perfil de substrato e inibidor (Drawz and Bonomo, 2010).

1.2.2.1.1. Classe A

1.2.2.1.1.1. β -Lactamases com sitio-ativo serina

As principais enzimas desta subclasse são as TEM e as SHV, codificadas pelos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} veiculados por plasmídeos (Drawz and Bonomo, 2010). Estas famílias de enzimas conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas e a antibióticos de largo espectro, sendo suscetíveis aos antibióticos inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico.

1.2.2.1.1.2. β -Lactamases de espectro alargado

O termo *Extended-Spectrum β -Lactamases* (ESBL) surgiu em 1983 para caracterizar β -lactamases mediadas por plasmídeos capazes de hidrolisar cefalosporinas de largo espectro, concretamente a enzima SHV-2. A sequenciação dos genes destas novas enzimas revelou que derivavam das β -lactamases TEM e SHV, por mutação. Mais

tarde, foi identificada, em *E. coli*, uma enzima ESBL que não derivava do gene *bla*_{SHV} ou *bla*_{TEM}, denominada CTX-M, pela sua alta capacidade de hidrolisar a cefotaxima. As ESBL caracterizam-se por hidrolisar as cefalosporinas e os monobactames, mas não as cefamicinas ou os carbapenemes; particularmente as TEM e SHV, são inibidas pelos antibióticos inibidores de β -lactamases disponíveis comercialmente, como o ácido clavulânico, o tazobactame ou sulbactame (Harada et al, 2008). São características das espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, apesar de já terem sido identificadas em várias outras espécies de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*. Estas espécies têm explorado duas estratégias de evolução das ESBL, a seleção de mutantes com β -lactamases TEM e SHV de espectro alargado mediadas por plasmídeos, e a captura de novos genes que codificam β -lactamases de espectro alargado do metagenoma ambiental, concretamente as β -lactamases CTX-M (D'Andrea et al, 2013). A maioria das ESBL é do tipo SHV (SHV-5 e SHV-12) ou TEM (TEM-4, TEM-24, TEM-52), evoluindo das β -lactamases TEM e SHV de espectro reduzido, por aquisição de mutações (substituições aminoacídicas), e do tipo CTX-M, provenientes de *Kluyvera spp* (Mendonça et al, 2007).

As ESBL podem ser codificadas por genes localizados em plasmídeos, os quais podem veicular concomitantemente, genes de resistência para outras classes de antibióticos, como os aminoglicosídeos, as fluoroquinolonas, entre outras, conferindo um fenótipo de multirresistência (Pitout et al, 2005).

As enzimas do tipo SHV foram as primeiras ESBL identificadas e o seu nome significa *Sulfidril variável*. Estas novas β -lactamases diferenciam-se das SHV não-ESBL sobretudo num aminoácido, tendo uma substituição de glicina por serina na posição 238 (Paterson and Bonomo, 2005).

Segundo a base de dados Lahey (<http://www.lahey.org/Studies/>, pesquisado em 11-10-13), existem 182 variantes de SHV, das quais aproximadamente 50 são ESBL, entre elas, SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 e SHV-12.

As ESBL tipo TEM derivam das β -lactamases TEM-1 e TEM-2 e diferem destas sobretudo em 2 aminoácidos, por substituição (Paterson and Bonomo, 2005). Existem 215 variantes de enzimas TEM (<http://www.lahey.org/Studies/>, pesquisado em 11-10-13), e a maior parte foi identificada como ESBL, das quais TEM-3, TEM-4, TEM-12, TEM-24, TEM-53).

As β -lactamases do tipo CTX-M dividem-se em 6 grupos filogenéticos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 e CTX-M-45, podendo diferir entre si em 10 %

dos aminoácidos. São codificadas pelo gene *bla*_{CTX-M}, que, na maioria dos casos, está associado às sequências de inserção (IS, *insertion sequences*) *ISEcp1* ou *ISCR1* e a sua rápida expansão deve-se à disseminação facilitada destes elementos, por exemplo, através de outros elementos genéticos móveis, principalmente plasmídeos (D'Andrea et al, 2013).

CTX-M têm uma atividade preferencial para a cefotaxima, mas hidrolisam a maior parte das cefalosporinas, conferindo suscetibilidade aos inibidores de β -lactamases. No geral, conferem suscetibilidade aos carbapenemes, mas uma alteração na permeabilidade da membrana pode resultar numa diminuição da suscetibilidade ou resistência aos carbapenemes (D'Andrea et al, 2013).

1.2.2.1.1.3. Carbapenemases de classe A

Estas carbapenemases foram descobertas nos anos 80 com a introdução do antibiótico imipeneme. Hidrolisam os carbapenemes, cefalosporinas, penicilinas, entre outros, e dividem-se em cinco famílias principais: NMC-A, IMI, GES, SME e KPC. São enzimas de sítio ativo serina.

As carbapenemases KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) foram detetadas inicialmente nos E.U.A. e disseminaram-se rapidamente em todo o mundo, estando presentes, principalmente, em *K. pneumoniae*, mas também noutras bactérias de Gram negativo. Um estudo de epidemiologia molecular revelou que poucos clones foram responsáveis pela disseminação desta carbapenemase, tendo sido o *Sequence type* (ST) 258 identificado em 70 % dos casos (Arnold et al, 2011).

As KPC são codificadas pelo gene *bla*_{KPC}, o qual tem sido disseminado por um plasmídeo com o transposição Tn4401. Até à data existem 13 tipos desta β -lactamase, KPC1-13 a qual tem adquirido uma importância cada vez maior na comunidade científica e médica (Drawz and Bonomo, 2010; Walsh, 2010), conferindo resistência às cefamicinas e aos carbapenemes e suscetibilidade aos antibióticos inibidores de β -lactamases (Jacoby and Munoz-Price, 2005).

As carbapenemases pertencentes à família GES (Guiana Extended-Spectrum) são β -lactamases adquiridas, encontradas em *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* e *Acinetobacter baumannii*, codificadas pelo gene *bla*_{GES}, tendo sido este identificado em integrões classe I, associados a plasmídeos. Há várias subfamílias descritas desta enzima, estando seis (GES-2, GES-4, GES-5, GES-6,

GES-11 e GES14) associadas à hidrólise dos carbapenemes, devido a substituições dos aminoácidos no sítio ativo (Patel and Bonomo, 2013).

1.2.2.1.2. Classe B

1.2.2.1.2.1. Metallo- β -lactamases (MBL)

Estas enzimas são carbapenemases de classe B, por inativarem os carbapenemes, mas são dependentes do Zn^{2+} (sítio ativo), contrariamente às carbapenemases de classe A. Exibem ainda resistência às penicilinas, cefalosporinas e aos inibidores de β -lactamases. O gene *bla*_{MBL} está localizado em cromossomas, plasmídeos e/ou integrões (Drawz and Bonomo, 2010).

A maioria das MBL, mais prevalentes e preocupantes em termos de saúde pública, pertencem às famílias VIM, IMP e NDM-1. As NDM-1, por exemplo, foram identificadas em *E. coli* como fonte de infeção adquirida na comunidade (Nordmann et al, 2011b).

A primeira metallo- β -lactamase adquirida identificada foi uma IMP (*Imipinem resistant*) em 1991, em *Serratia marcescens*, no Japão. Desde então, estas enzimas mediadas por plasmídeos expandiram-se pelo mundo, Japão, Europa, Brasil e outros países da Ásia, em várias espécies de bactérias de Gram negativo. Existem 42 variantes desta família, sendo reportada, maioritariamente, em *P. aeruginosa* na Ásia (Patel and Bonomo, 2013).

New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM) é uma β -lactamase de largo espectro capaz de inativar todos os antibióticos β -lactâmicos, exceto o aztreoname, e tem sido identificada, principalmente, em *K. pneumoniae* e *E. coli*, mas também em outras *Enterobacteriaceae*. Esta enzima é codificada pelo gene *bla*_{NDM}, associado a plasmídeos que transportam outros genes, conferindo resistência a todos os aminoglicosídeos, macrólidos e sulfametoxazole, conferindo multirresistência (Nordmann et al, 2011b).

As β -lactamases *Verona Integrated-encoded metallo- β -lactamase* (VIM), foram reportadas em 1997, em Itália, numa *P. aeruginosa* e, desde então, tem sido identificada um pouco por todo o mundo. Conhecem-se mais de 20 tipos de VIM, no entanto, cada variante tem uma distribuição geográfica definida. Distinguem-se das outras metallo- β -lactamases por terem uma grande afinidade para os carbapenemes, podendo a sua atividade ser modificada por mutações pontuais (Cornaglia et al, 2011).

1.2.2.1.3. Classe C

1.2.2.1.3.1. Cefalosporinases

As β -lactamases AmpC ou cefalosporinases hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e também, por vezes, cefamicinas, cefalosporinas de largo espectro, monobactames, e caracterizam-se por serem resistentes à combinação de antibióticos β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases, à exceção de piperacilina-tazobactame. Na presença de substituições, inserções ou deleções aminoacídicas em seis regiões específicas das AmpC o espectro de hidrólise pode aumentar - AmpC de espectro alargado (ESAC) - (Seral et al, 2012).

Na maioria das *Enterobacteriaceae* as AmpC são enzimas cromossômicas com níveis de expressão pouco elevados, invertendo-se esta situação na presença de um indutor (por ex. ácido clavulânico ou amoxicilina) (Bush, 2010). Este mecanismo é regulado pelo operão *amp* que requiere a presença do indutor e de 5 genes: *ampC*, *ampR*, *ampD*, *ampG* e *ampE*. A espécie *E. coli* é uma exceção, já que este gene está regulado por fenómenos dependentes de mecanismos de atenuação e não de indução (Seral et al, 2012).

De grande importância são as enzimas AmpC mediadas por plasmídeos, cujos genes derivam de genes cromossômicos de *Enterobacteriaceae* e *Aeromonas spp.*, integrados em elementos genéticos móveis, originando as AmpC mediadas por plasmídeos (*Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases- PMA β*) (Seral et al, 2012).

Devido a pequenas diferenças nas sequências de aminoácidos, há seis famílias de PMA β : i) CIT (derivadas de *bla*_{AmpC} de *Citrobacter freundii*) inclui os grupos CMY e LAT; ii) DHA (derivadas de *bla*_{AmpC} de *Morganella morganii*); ACC (derivada de *bla*_{AmpC} de *Hafnia alvei*); FOX (derivada de *bla*_{AmpC} de *Aeromonas media*); MOX (derivadas de AmpC cromossômica de *Aeromonas caviae*), EBC (derivadas de *bla*_{AmpC} de *E. cloacae* e/ou *Enterobacter asburiae*) inclui ACT e MIR (Seral et al, 2012).

1.2.2.1.4. Classe D

1.2.2.1.4.1. Oxacillinases

As oxacillinases ou β -lactamases da família OXA, pertencem à classe D, com sítio ativo serina, e dividem-se em três grupos: (1) OXA de largo espectro, resistentes a antibióticos de largo espectro e, ainda, cloxacilina, metilicina e oxacilina; (2) OXA do tipo ESBL, conferem resistência a antibióticos de espectro alargado; e (3) OXA,

carbapenemases de classe D que conferem resistência às cefamicinas, carbapenemes e antibióticos de espectro alargado. Esta última classe inclui as famílias OXA-23, OXA-24 e OXA-58 (Jacoby and Munoz-Price, 2005).

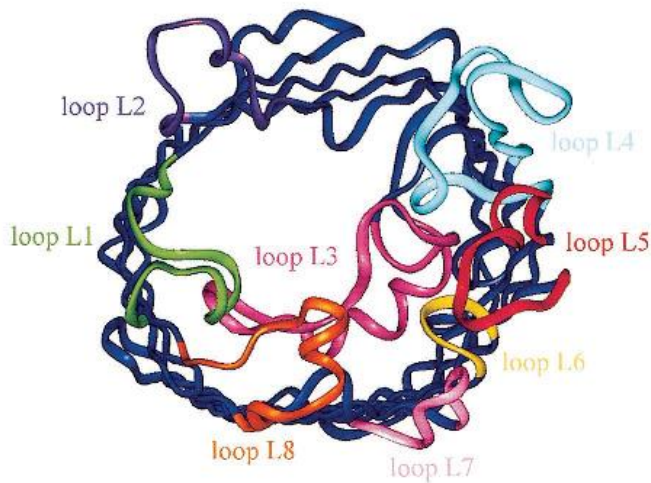
Na família das carbapenemases de classe D encontra-se, também, a OXA-48, inicialmente identificada na Turquia, mas, atualmente, disseminada internacionalmente, principalmente em *K. pneumoniae*. O ST395 de *K. pneumoniae* tem sido responsável pela dispersão desta carbapenemase, mas tem sido também encontrada noutros clones e noutros géneros. A OXA-48 está localizada no transposão Tn1999, relacionado com plasmídeos de tamanho molecular 62kb, e é codificada pelo gene *bla*_{OXA-48} (Dimou et al, 2012).

1.2.2.2. Porinas

A membrana exterior das bactérias de Gram negativo tem um papel crucial na relação da bactéria com o ambiente envolvente, atuando como uma barreira seletiva graças à bicamada lipídica hidrofóbica e às proteínas de membrana (*outer membrane proteins* – OMPs) (Delcour, 2009). Estas proteínas, denominadas porinas, dividem-se em três classes: porinas não específicas, como a OmpE e PhoE (*E. coli*), Omp36 (*E. aerogenes*) e OmpK36 (*K. pneumoniae*); porinas seletivas, implicadas na difusão de açúcares e metais, como a LamB ou FhuA; e as proteínas formadoras de canais, tais como a OmpA e a TolC (Pagès, 2008).

A maioria das porinas estudadas têm 16 ou 18 cadeias, e a sua estrutura baseia-se num canal formado pelo aparelhamento da primeira com a última cadeia β . Todas estas cadeias estão ligadas por oito ou nove loops, normalmente na zona superficial e sete ou oito *turns* na zona periplasmática. Em todas as porinas, a zona de constricção é formada por um longo loop (L3), o qual não está exposto na superfície da célula, encontrando-se no interior do canal e contribuindo para a permeabilidade do poro (Galdiero et al, 2003). No geral, os loops L1, L2 e L4 são importantes nas interações monómero-monómero, o loop L3, como já foi referido, é interno, os loops L5, L6 e L7 são superficiais e o loop L8 encontra-se no interior, contribuindo para a abertura do canal no lado exterior (Galdiero et al, 2003) (Figura 2). Estes loops superficiais são responsáveis pela maioria da atividade biológica da proteína, sendo que o loop L7 da porina OmpK36 (*K. pneumoniae*) está envolvido na interação com o C1q (Galdiero et al, 2003).

A



B

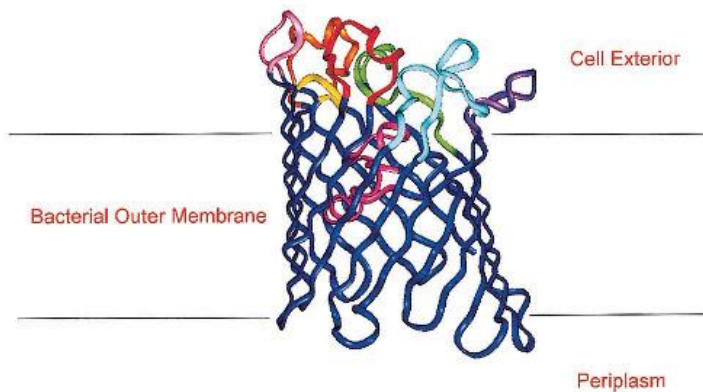


Fig. 2. Ilustração do modelo tridimensional de uma porina baseada na estrutura da porina OmpK36 de *K. pneumoniae*. A: vista geral da porina. Os loops estão legendados de L1 a L8. B: vista horizontal da porina, onde se pode verificar a localização interna do loop L3.

Para atingir o seu alvo, é necessário que as moléculas do antibiótico penetrem na célula atravessando esta membrana. Moléculas de pequeno tamanho, como os antibióticos β -lactâmicos e fluoroquinolonas passam através das porinas e as moléculas de maior tamanho passam pela membrana por permeabilidade (Delcour, 2009). Assim, uma mutação nestas proteínas pode resultar numa diminuição da entrada dos antibióticos (β -lactâmicos e fluoroquinolonas) para o interior celular e alterar a suscetibilidade da bactéria aos antibióticos (Delcour, 2009).

Estas mutações ocorrem por dois mecanismos principais: i) a alteração do perfil da membrana, incluindo a perda das porinas ou a substituição das principais por outras; este é o exemplo de isolados de *K. pneumoniae* que não expressam a porina OmpK35

e OmpK36, verificando-se a expressão da porina OmpK37, originando um aumento da concentração mínima inibitória de alguns antibióticos; ii) alteração das funções das porinas por mutações reduzindo a permeabilidade.

Na zona de constrição, loop L3, há uma distribuição particular das cargas devido aos aminoácidos: uma zona de cargas negativas (aminoácidos Asp e Glu) opõe-se a uma zona de cargas positivas (aminoácidos Arg e Lys), induzindo um campo electrostático. A conservação desta região é um elemento chave para o funcionamento das porinas, de maneira que a substituição de um aminoácido, por exemplo, Asp113 ou Asp121 por Ala, levam a uma modificação importante nas propriedades do canal, alterando a entrada de moléculas para o interior, incluindo as moléculas de antibiótico, resultando numa diminuição da suscetibilidade aos antibióticos (Pagès, 2008).

Muitos estudos têm sido feitos sobre as principais porinas de *E. coli*, OmpC e OmpF, e sobre as principais porinas de *K. pneumoniae*, OmpK35 e OmpK36. A maior parte das estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL expressam só a porina OmpK36, enquanto que as estirpes que não produzem ESBL expressam as porinas OmpK35 e OmpK36 (Tsai et al, 2011).

A ausência da porina OmpK35 pode ser um dos fatores que conduz ao aumento da resistência em estirpes produtoras de ESBL. No entanto, vários estudos mostram que a ausência de porinas, sem expressão de outro mecanismo de resistência (enzimas), não altera significativamente a suscetibilidade aos antibióticos (Tsai et al, 2011).

1.2.2.3. Bombas de efluxo

As bombas de efluxo encontram-se em todas as bactérias, sendo essenciais para manter as concentrações das soluções intracelulares, excreção de produtos metabólicos tóxicos, ou transporte de aminoácidos e nucleótidos. Para além destas funções, as bombas de efluxo têm um papel importante na resistência aos antibióticos. O seu mecanismo de ação baseia-se na redução da acumulação do antibiótico dentro da célula, expulsando-o para fora. Durante este processo, a bactéria adapta-se ao antibiótico e pode tornar-se resistente através de mutações ou alteração dos alvos do antibiótico (Kumar and Varela, 2012).

As bombas de efluxo dividem-se em 5 categorias: MFS (*Major Facilitator Superfamily*), ATP (*Adenosine TriPhosphate*), ABC (*ATP-binding cassette*), RND (*Resistance Nodulation Division*) e SMR (*Small Multidrug Resistance*) (Kumar and Varela, 2012; Blair, and Piddock, 2009).

Apesar das bombas de efluxo serem aqui referidos como um mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, saliente-se que também são um mecanismo muito importante na multirresistência, dado que conferem resistência a quase todas as classes de antibióticos, embora com níveis de expressão reduzidos.

A bomba OqxAB, pertencente à família RND, é codificada pelos genes *oqxA* e *oqxB*, veiculados por plasmídeos, os quais são, aparentemente, cromossômicos na espécie *K. pneumoniae*, atuando como um reservatório deste mecanismo de resistência (Bin Kim et al, 2009). Além de conferir resistência às quinolonas, diminui a suscetibilidade também ao cloranfenicol, trimetoprim e tetraciclina (Yuan et al, 2012).

1.2.2.4. Proteínas de Ligação à Penicilina (PLP)

As Proteínas de Ligação à Penicilina (PLP) são enzimas localizadas na parede celular bacteriana que cumprem uma função muito importante na fase final da síntese do peptidoglicano. Estão divididas em PLP de alto peso molecular (HMW-PBP), e subdivididas, por sua vez, nas classes A e B, sendo essenciais para a sobrevivência da célula e atuando como alvo dos antibióticos β -lactâmicos. As PLP de baixo peso molecular (LMW-PBP) estão divididas em 4 subfamílias. As alterações na configuração das PLP, normalmente de classe B, resultam numa baixa afinidade dos antibióticos β -lactâmicos para estas proteínas, levando ao aparecimento de resistência a esta classe de antibiótico. Em bactérias de Gram negativo, este mecanismo de resistência tem pouca importância quando comparado com a produção de β -lactamases (Egan and Vollmer, 2013; Spratt, 2012).

1.2.3. Mecanismos de resistência às fluoroquinolonas

O principal mecanismo de resistência às quinolonas envolve a acumulação de mutações em genes que codificam enzimas alvo do antibiótico, a DNA girase e a DNA topoisomerase IV. Estas mutações são cromossômicas.

No entanto, recentemente, foram descritos determinantes plasmídicos de resistência às fluoroquinolonas, os quais podem, portanto, ser transferidos horizontalmente através de elementos móveis, mais concretamente plasmídeos, correspondendo à Resistência às Quinolonas Mediada por Plasmídeos (PMQR, *Plasmid-Mediated Quinolone Resistance*).

A PMQR assenta em três mecanismos diferentes: o primeiro, envolve genes mutados, os genes *qnr*, que codificam proteínas com fenótipos de resistência às quinolonas e fluoroquinolonas, incluindo diferentes variantes, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS*; o

segundo mecanismo, *aac(6)-Ib-cr*, envolve uma mutação na enzima acetiltransferase que hidrolisa aminoglicosídeos, capaz, no entanto, de reduzir a atividade da ciprofloxacina; e o terceiro mecanismo baseia-se na expulsão das quinolonas através de duas bombas de efluxo, QepA e OqxAB, mediadas também por plasmídeos (Rodríguez-Martínez et al, 2011).

1.3. Multirresistência

Nos últimos anos, a resistência aos antimicrobianos tem aumentado drasticamente em todo o mundo, e é hoje considerado um dos maiores desafios da medicina (Theuretzbacher, 2013).

Com o desenvolvimento da sociedade e tecnologia surgiram vários fatores (viagens internacionais, trocas comerciais de alimentos, migração) que favorecem a emergência e disseminação de genes de resistência. O uso abusivo de antimicrobianos em unidades de saúde, a utilização destas substâncias em explorações de produção animal e a acumulação de antimicrobianos no meio ambiente contribuíram, também, para um aumento da pressão seletiva da resistência (Theuretzbacher, 2013).

Através da troca de material genético, veiculando genes de resistência, algumas bactérias tornaram-se resistentes a várias classes de antibióticos, fenómeno denominado multirresistência, ou seja, resistência a 3 ou mais classes de antibióticos estruturalmente diferentes (O'Fallon et al, 2009).

No geral, a multirresistência ocorre por acumulação de múltiplas mutações conferindo resistências a diferentes classes de antibióticos, mas também pode ocorrer como consequência de uma só mutação com impacto na permeabilidade da membrana e/ou em bombas de efluxo específicas, associadas à resistência a vários antibióticos (Poole, 2003).

Há organismos patogénicos multirresistentes normalmente disseminados em unidades de saúde. A espécie *Staphylococcus aureus* é, provavelmente, a melhor documentada, devido às estirpes *Meticillin-resistant S. aureus* (MRSA). As taxas de MRSA variam entre 1% no Norte da Europa, 50 % no Mediterrâneo e 80% em alguns países asiáticos (Theuretzbacher, 2013).

As bactérias do género *Enterococcus*, principalmente *Enterococcus faecium*, são organismos multirresistentes com uma rápida disseminação e difíceis de combater devido à alta taxa de resistência às principais classes de antibióticos (Theuretzbacher, 2013).

Dentro da família das *Enterobacteriaceae*, *E. coli* e *K. pneumoniae* são as espécies mais problemáticas devido à grande capacidade que têm para desenvolver resistências e à alta incidência de estirpes multirresistentes. (Theuretzbacher, 2013).

O uso intensivo das fluoroquinolonas em muitos países da Europa resultou numa perda de eficácia desta classe de antibióticos, facto que, aliado ao aparecimento de estirpes produtoras de ESBL, diminuiu as opções de tratamento, aumentando a utilização dos carbapenemes. Consequentemente, devido à pressão seletiva houve um incremento das estirpes resistentes a esta classe de antibióticos. Este processo levou à emergência de estirpes multirresistentes e até pan-resistentes (resistência a todas as classes de antibióticos) (Theuretzbacher, 2013).

O marcador molecular típico de estirpes multirresistentes é a produção de carbapenemases, caracterizada pela capacidade dos genes que codificam estas enzimas se disseminarem intra- e inter-espécies, através de plasmídeos, sendo *K. pneumoniae* a principal espécie na disseminação destas enzimas (KPC, IMP, VIM, NDM e OXA-48) (Theuretzbacher, 2013).

1.4. Infecções adquiridas no hospital e na comunidade

O aumento da incidência de bactérias multirresistentes começa a ser uma preocupação nas unidades de saúde. As infeções associadas a estas bactérias resultam em dificuldades no tratamento, taxas de morbilidade e mortalidade mais elevadas e custos mais acentuados.

A população idosa e os residentes nos serviços de saúde continuados são considerados como população de risco para estas infeções. As instalações de cuidados continuados, proporcionam mais oportunidades de contacto entre residentes, através de espaços comuns e atividades comuns, sendo um risco para a transmissão de bactérias com genes de resistência e para a troca de material genético entre bactérias (O'Fallon et al, 2009). Infeções adquiridas na comunidade causadas por *E. coli* produtoras de ESBL começaram a ser reportadas com maior frequência a partir de 1998, nomeadamente na Irlanda. (Pitout et al, 2005). Estudos posteriores demonstraram que a hospitalização prévia era um risco significativo, indicando que estas infeções têm origem, provavelmente, no hospital (Pitout et al, 2005).

Esta teoria é suportada pelo facto de os hospitais serem locais ideais para a emergência de organismos multirresistentes, devido ao uso de antibióticos de largo espectro e, por vezes, às deficientes medidas de controlo de infeção. Os centros de cuidados continuados parecem funcionar como reservatórios, visto que há transferência, constante, para ai, de doentes infetados em meio hospitalar (Perez et al, 2007).

Com a grande expansão de bactérias produtoras de ESBL, concretamente CTX-M, na comunidade, a prévia hospitalização, a idade e a exposição às cefalosporinas e quinolonas são fatores de risco importantes (Perez et al, 2007).

Outros estudos indicam *K. pneumoniae* como um importante risco de infeções adquiridas na comunidade e não só nos hospitais (Kang et al, 2006).

Tendo em conta esta situação é de grande importância controlar e caracterizar as infeções adquiridas na comunidade e em ambiente hospitalar, de forma a desenvolver melhores programas de controlo e de contenção das infeções e evitar transferências de genes de resistência entre diversos ambientes.

1.5. Epidemiologia da resistência aos antibióticos

Como foi acima referido é de extrema importância controlar e caracterizar os microrganismos resistentes aos antibióticos, principalmente os produtores de ESBL e carbapenemases, devido à ameaça da multirresistência a que estão associados. Estudos a nível europeu e mundial são essenciais para perceber a dimensão da disseminação destas estirpes, detetar surtos e estudar a evolução das mesmas.

Com este intuito foram criados vários programas internacionais de vigilância; entre eles, o EARS-Net (coordenado e financiado pelo *European Centre for Disease Prevention and Control*), o qual corresponde a um sistema de redes de vigilância nacionais que fornecem dados sobre a resistência aos antibióticos na Europa (<http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>). O EuSCAPE (*European Survey on Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*), é também um programa Europeu, através do qual se efetuou um questionário em 39 países europeus, contando com a colaboração de especialistas de cada país, com o objetivo de obter uma estimativa atual da prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases (CPE *Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae*). Os resultados obtidos, ilustrados na Figura 3 (Glasner et al, 2013) confirmam que as CPE continuam a alastrar pela Europa. Apesar da maioria dos países só ter reportado casos únicos num hospital, a situação epidemiológica

agravou-se nos últimos três anos. Dos 31 países que participaram na vigilância desta resistência em três períodos diferentes (2010, 2012 e 2013) (Figura 4) (Glasner et al, 2013), 17 apresentaram uma maior prevalência de CPE em 2013 do que em 2010, como por exemplo, no caso de Malta, que, de nível 1 (caso esporádico num hospital), passou para nível 5 (situação endêmica). A entrada de refugiados originários da Líbia em 2011 pode ter contribuído para a importante disseminação de estirpes produtoras de OXA-48 (Borg, comunicação oral, Abril 2013 em Glasner et al, 2013).

No entanto, confirma-se que as carbapenemases KPC continuam a ser as mais prevalentes na Europa, estando as enzimas OXA-48 a ganhar importância, sendo, inclusivamente, as mais prevalentes em França, Bélgica e Malta.

A metalo- β -lactamase NDM, causadora de grande preocupação desde o seu aparecimento na Índia, continua a ser pouco relevante na Europa, em comparação com outras carbapenemases, à exceção do Reino Unido, país com maior frequência desta enzima (Coque et al, 2008a).

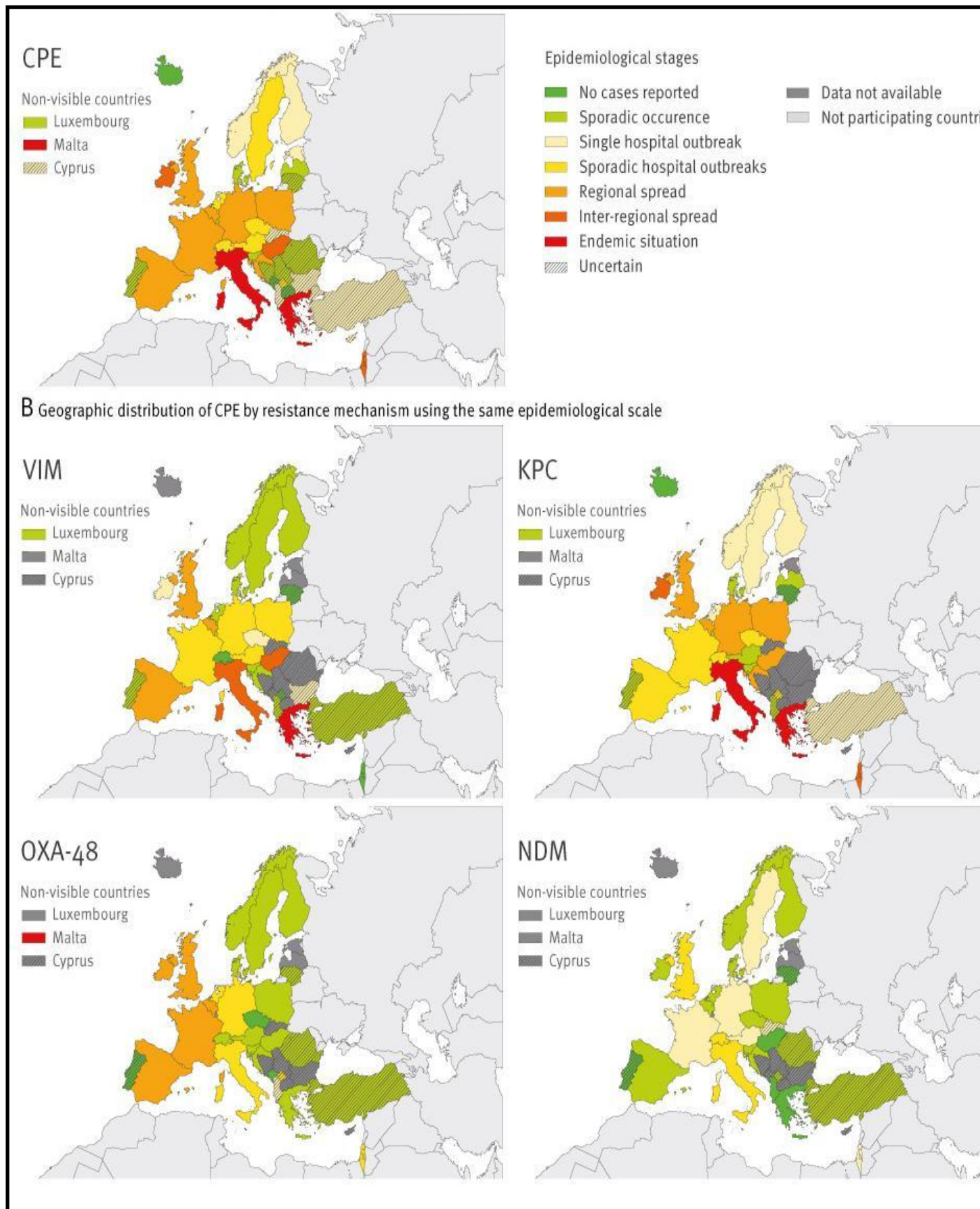


Fig. 3. Esquema representativo da distribuição de carbapenemases na Europa em 2013 (www.eurosurveillance.org).

CPE: *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*.

Em alguns países, o gráfico pode não representar a verdadeira extensão da disseminação das CPE. Para Portugal, a notificação e submissão de isolados tornou-se obrigatória a partir de 21 de Fevereiro de 2013.

Country	Epidemiological stage for spread of CPE			Direction of change (2010 compared to 2013) ^d
	Grundmann et al., 2010 ^a	Canton et al., 2012 ^b	2013 ^c	
Albania	NA	NA	2a	NA
Austria	0	1	2b	↑
Belgium	2b	3	3	↑
Bosnia and Herzegovina	1	1	1	→
Bulgaria	0	NA	2a	↑
Croatia	1	1	3	↑
Cyprus	2a	NA	2a	→
Czech Republic	1	1	2b	↑
Denmark	1	1	1	→
Estonia	0	NA	2a	↑
Finland	1	1	2a	↑
France	3	4	3	– ^e
Germany	3	3	3	→
Greece	5	5	5	→
Hungary	3	2a	4	↑
Iceland	0	0	0	→
Ireland	1	1	4	↑
Israel	5	5	4	↓
Italy	4	5	5	↑
Kosovo ^f	NA	1	3	NA
Latvia	1	NA	1	→
Lithuania	1	NA	1	→
Luxembourg	NA	1	1	NA
Malta	1	NA	5	↑
Montenegro	NA	1	0	– ^g
Netherlands	2a	2b	2b	↑
Norway	2a	2a	2a	→
Poland	4	4	3	– ^e
Portugal	1	1	1	→
Romania	1	1	1	→
Serbia	NA	1	1	NA
Slovakia	NA	NA	2b	NA
Slovenia	0	1	1	↑
Spain	2b	2b	3	↑
Sweden	2a	2a	2b	↑
Switzerland	1	1	2b	↑
The Former Yugoslav Republic of Macedonia	NA	NA	0	NA
Turkey	NA	4	2a	– ^g
United Kingdom	2b	3	3	↑

Fig. 4. Tabela representativa da prevalência de CPE em 39 países da Europa durante 2010, 2012 e 2013. 0: Não há casos reportados; 1: Ocorrência esporádica; 2a: Único surto num hospital; 2b: Surto esporádicos em diferentes hospitais; 3: Surto regionais; 4: Surto inter-regionais; 5: Situação endêmica; NA: *Not available*. (www.eurosurveillance.org).

1.6. Objetivos do estudo

A emergência de várias bactérias com resistência aos antibióticos leva à necessidade de uma correta caracterização laboratorial da suscetibilidade aos antibióticos e dos mecanismos responsáveis pela resistência.

Esta caracterização é essencial para um correto tratamento da infecção, bem como para a implementação de programas de controlo de infeção, nos hospitais e unidades de cuidados continuados, quer ainda para a utilização de resultados laboratoriais em programas de vigilância (Stuart and Leverstein-Van Hall, 2010).

Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar os mecanismos de resistência aos carbapenemes em bactérias de Gram negativo isoladas em diferentes ambientes (comunidade e hospital), bem como a co-resistência e sua possível disseminação através de plasmídeos.

Este estudo, que utilizou métodos fenotípicos, bioquímicos e moleculares, seria de uma maior importância, considerando que os carbapenemes são, muitas vezes, o último recurso no tratamento de infeções causadas por aquelas bactérias e não estão, ainda, suficientemente esclarecidos os mecanismos responsáveis pela diminuição da suscetibilidade àquela categoria de antibióticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolados bacterianos

Neste trabalho foram estudados 426 isolados de bactérias de Gram negativo, provenientes da coleção do *Laboratório Nacional de Referência de Resistência aos Antimicrobianos* (URRA) do *Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge* (INSA), selecionados de entre as espécies bacterianas isoladas no primeiro semestre de 2012. Estes isolados foram previamente recolhidos em 17 laboratórios hospitalares (Tabela 1), onde foram isolados de diferentes produtos biológicos (Tabela 2); e eram provenientes de locais como a comunidade e o meio hospitalar, sendo, no entanto, desconhecida parte desta informação (Figura 5). Aqueles hospitais integram o *Programa Nacional de Vigilância da Resistência aos Antibióticos em Portugal* (*Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal*, ARSIP), nomeadamente com o envio de isolados para a URRA (INSA).

Tabela 1. Distribuição de 426 isolados bacterianos, por hospital.

Hospitais	Número de isolados
A	32
B	33
C	11
D	35
E	28
F	17
G	89
H	63
I	1
J	11
L	1
M	25
N	44
O	17
P	14
Q	3
R	1

Os isolados bacterianos estudados pertenciam às seguintes espécies: *Acinetobacter baumannii* (n=2), *Citrobacter freundii*, (n=1), *Enterobacter aerogenes* (Ea, n=4), *Enterobacter cancerogenus* (Ecan, n=1), *Enterobacter cloacae* (Eclo, n=2), *E. coli* (Ec, n=153), *Klebsiella oxytoca* (n=2), *K. pneumoniae* (Kp, n=249), *Morganella morganii* (n=3), *Proteus mirabilis* (n=4), *Proteus vulgaris*, (n=2), *Pseudomonas aeruginosa* (n=2), *Pseudomonas putida* (n=1).

Tabela 2. Origem de 426 isolados bacterianos: produto biológico.

Produto biológico	Número de isolados
Aspirado brônquico	4
Bílis	1
Biópsia	1
Catéter	11
Expeturação	12
Exsudado	4
Exsudado Faríngeo	1
Exsudado Ferida	1
Exsudado Umbilical	1
Fezes	4
Hemocultura	45
Líquido Abdominal	1
Líquido Ascítico	1
Líquido Pericárdico	1
Líquido Pleural	2
PEG	1
Pús	24
Secreções brônquicas	12
Urina	283

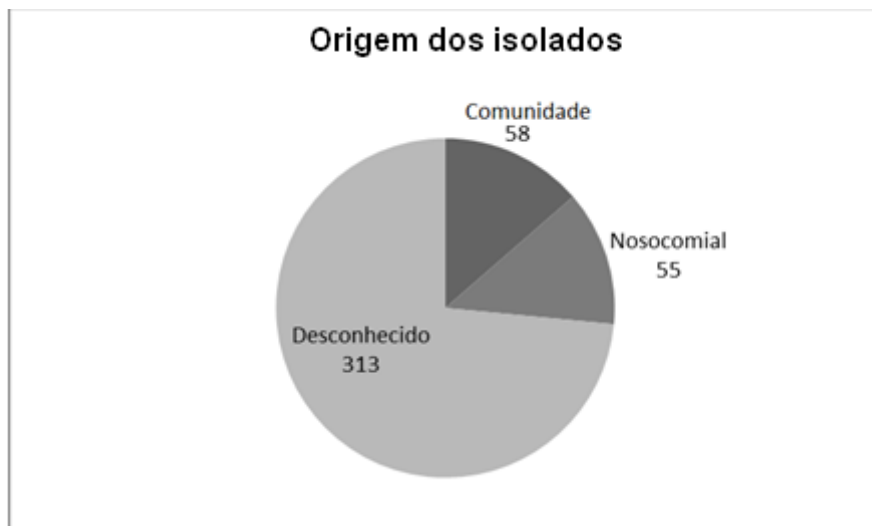


Fig. 5. Distribuição de 426 isolados, de acordo com a sua origem.

2.2. Avaliação fenotípica da suscetibilidade aos antibióticos

2.2.1. Pesquisa da suscetibilidade aos carbapenemes

Nos isolados em estudo, realizou-se uma pesquisa inicial da suscetibilidade diminuída aos carbapenemes, utilizando o antibiótico ertapeneme. Para tal, os 426 isolados, armazenados em meio de TSB com glicerol a -80°C , foram semeados em placas com meio de gelose simples (INSA), nos quais foi colocado um disco de ertapeneme ($10\mu\text{g}$). Após incubação a $37^{\circ}\text{C}/18\text{h}$, foi possível avaliar a pureza das culturas e a suscetibilidade ao ertapeneme. Para o estudo foram retidos todos os isolados não suscetíveis ao ertapeneme

2.2.2. Teste de suscetibilidade aos antibióticos

A suscetibilidade aos antibióticos dos isolados selecionados para o estudo (com suscetibilidade diminuída ao ertapeneme) foi analisada através do Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos (TSA). A partir das culturas em meio de gelose simples, repicaram-se 1 a 2 colônias isoladas e ressuspenderam-se em 2 ml de soro fisiológico estéril, para preparar uma suspensão bacteriana com uma turvação de aproximadamente 0,5 na escala de MacFarland. De seguida, diluiu-se a 1:100, em soro fisiológico, num volume total de 10ml e semearam-se duas placas quadradas ($120\text{mm} \times 120\text{mm}$), com meio de *Mueller-Hinton* agar (INSA), utilizando a técnica de sementeira por inundação.

Para cada isolado foram aplicados 32 discos de antibiótico (*Biorad*) de acordo com a Tabela 3. Realizaram-se ainda ensaios com inibidores: foi colocado um disco de imipeneme ($10\mu\text{g}$) com $5\mu\text{L}$ de uma solução 0,5M de EDTA (pesquisa de metalo- β -lactamases), um disco branco com $3,5\mu\text{L}$ de uma solução 0,5M de ácido borónico (pesquisa de carbapenemases de classe A) e um disco branco com $4,2\mu\text{L}$ de uma solução 0,25M de cloxacilina (pesquisa de β -lactamases de classe C). Após incubação das placas a 37°C , durante 18h, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição para cada um dos antibióticos e analisada a presença de sinergia e/ou antagonismo com os inibidores. Os resultados obtidos foram interpretados de acordo com as normas do *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (Bonnet et al, 2012) (Tabela 3).

A leitura interpretativa do TSA permitiu prever alguns mecanismos de resistência, responsáveis pelos fenótipos encontrados, orientando quer a sua confirmação, por testes fenotípicos mais específicos, quer o estudo bioquímico e molecular.

Tabela 3. Antibióticos (disco e respetiva carga) utilizados no TSA e critérios de interpretação (diâmetros críticos) segundo o *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (Bonnet et al, 2012)

Classe de antibiótico	Antibiótico	Sigla	Diâmetros críticos SFM (mm)	Carga do disco (µg)
Penicilinas	Amoxicilina	AMX	S: ≥ 21; R: <16	25
	Piperacilina	PIP	S: ≥ 20; R: <16	75
	Ticarcilina	TIC	S: ≥ 24; R: <22	75
Cefemes (parentais)	Cefalotina	CF	S: ≥ 18; R: <12	30
	Cefuroxima	CXM	S: ≥ 25; R: <22	30
	Cefoxitina	FOX	S: ≥ 22; R: <15	30
	Cefotaxima	CTX	S: ≥ 26; R: <23	30
	Ceftriaxona	CRO	S: ≥ 26; R: <23	30
	Ceftazidima	CAZ	S: ≥ 26; R: <19	30
	Cefepima	FEP	S: ≥ 24; R: <17	30
Cefemes (orais)	Cefpodoxima	CPD	S: ≥ 24; R: <21	10
	Cefixima	CFM	S: ≥ 25; R: <22	10
Monobactâmicos	Aztreoname	ATM	S: ≥ 27; R: <21	30
Carbapenemes	Ertapeneme	ERT	S: ≥ 28; R: <26	10
	Imipineme	IMP	S: ≥ 24; R: <17	10
	Meropeneme	MER	S: ≥ 22; R: <15	10
Associação de β-lactâmicos / inibidores de β-lactamases	Amoxicilina + Ácido clavulânico	AMC	S: ≥ 21; R: <16	20+10
	Piperacilina + tazobactame	TZP	S: ≥ 21; R: <17	75+10
	Cefotaxima + ácido Clavulânico	CCTX	-	30+10
	Ceftazidima + ácido clavulânico	CCAZ	-	30+10
Aminoglicosídeos	Amicacina	NA	S: ≥ 17; R: <15	30
	Gentamicina	GEN	S: ≥ 18; R: <16	15
	Kanamicina	KAN	S: ≥ 17; R: <15	30
Quinolonas	Ácido nalidíxico	NA	S: ≥ 20; R: <15	30
	Ciprofloxacina	CIP	S: ≥ 25; R: <22	5
	Norfloxacina	NOR	S: ≥ 25; R: <22	5
	Pefloxacina	PEF	S: ≥ 22; R: <16	5
Inibidores do metabolismo do ácido fólico	Trimetoprim + Sulfametoxazol	SXT	S: ≥ 16; R: <10	1,25+ 23,75
Lipopéptidos	Colistina	CS	S: ≥ 15; R: <15	50
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	FT	S: ≥ 15; R: <15	300
Gliciliclinas	Tigeciclina	TGC	S: ≥ 21; R: <19	15
Fosfomicinas	Fosfomicina	FOS	S: ≥ 14; R: <14	50

2.2.3. Teste de Sinergia com Ertapeneme

Com o intuito de confirmar fenotipicamente a produção de carbapenemases pelos isolados em estudo, realizou-se o Teste do Ertapeneme. Para tal, a partir de 1-2 colónias de uma cultura pura do isolado em estudo, preparou-se uma suspensão bacteriana com uma turvação 0,5 MacFarland, em soro fisiológico estéril, e inoculou-se uma placa com meio de *Mueller-Hinton (INSA)*, utilizando a técnica de

espalhamento com zaragatoa. Seguidamente, foram colocados, quatro discos (*Biorad*), à distância de 30 mm, como indica a Figura 6: ertapeneme (10 µg), ertapeneme + 5 µl de uma solução 0,5M de EDTA, ertapeneme + 7 µl de uma solução 0,5M de ácido borónico, e ertapeneme + 6 µL de uma solução 0,25M de cloxacilina; 1 disco branco, impregnado com 5 µl de EDTA a 0,5M, foi colocado no centro da placa, para garantir que este inibidor, sozinho, não tinha atividade sobre o isolado. Todos os discos foram impregnados 30 minutos antes.

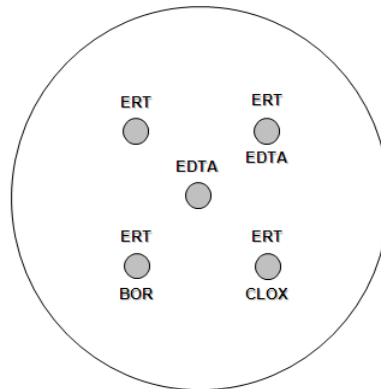


Fig. 6. Distribuição dos discos no teste de sinergia com ertapeneme.

Após incubação a 37°C, durante 18 horas, realizou-se a interpretação do teste, procedendo-se à medição dos halos e verificando as sinergias através da diferença entre o diâmetro do halo do disco de ertapeneme e o diâmetro dos restantes discos, seguindo o esquema representado na Figura 7.

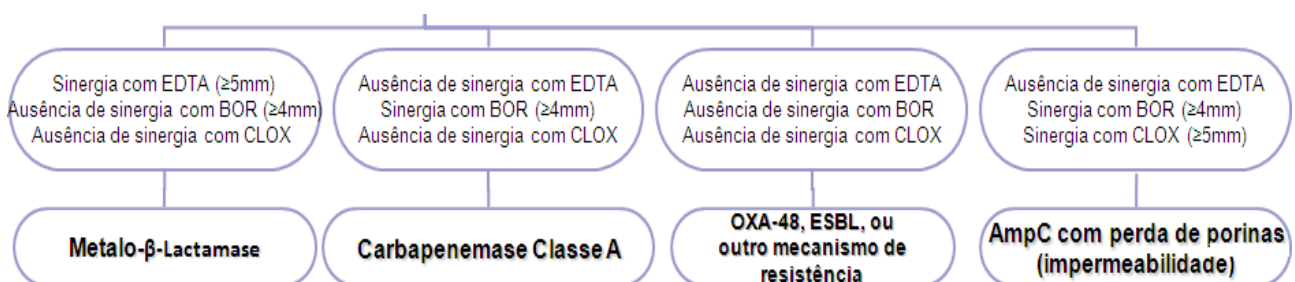


Fig. 7. Esquema de interpretação da leitura do teste de sinergia com ertapeneme.

2.2.4. Teste de Suscetibilidade ao Cloranfenicol

Este teste foi realizado apenas para os isolados que possuíam genes que codificavam a bomba de efluxo OqxAB. Para tal, preparou-se uma suspensão bacteriana com turvação de aproximadamente 0,5 *MacFarland*, em 2,5 ml de soro fisiológico. De seguida diluiu-se a 1:100, num volume total de 5ml e semeou-se em meio de *Mueller-Hinton* agar (INSA), pela técnica de inundação.

Para cada isolado, foi aplicado um disco de cloranfenicol (30µg, *Biorad*) e após incubação das placas a 37°C, durante 18h, foram medidos os diâmetros dos halos. Os resultados obtidos foram interpretados de acordo com o *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (2012): S≥ 23, R <19.

2.3. Caracterização Bioquímica

2.3.1. Focagem Isoelétrica: β-lactamases

Para uma melhor compreensão sobre as β-lactamases produzidas pelos isolados retidos para o estudo, realizou-se a técnica de Focagem Isoelétrica, que, baseando-se nos diferentes pontos isoelétricos das enzimas, nos permitiu separá-las e orientar a pesquisa molecular.

Esta técnica foi realizada em cinco fases: Extração de β-lactamases, Teste do Nitrocefim, preparação do Gel de Migração, Migração e preparação do Gel de Revelação.

2.3.1.1. Extração de β-lactamases

A partir de uma cultura pura em meio de gelose simples (INSA), inoculou-se uma colónia isolada em 15 ml de *Brain Heart Infusion* (INSA), para a extração de β-lactamases, e incubou-se a 37°C, durante 18 horas, com agitação. Os 15 ml foram centrifugados a 10000 rpm, a 4°C, durante 15 minutos. O *pellet* foi então ressuspenso em 1 ml de água destilada estéril, seguindo-se a sonicação das células durante 1 minuto e 30 segundos utilizando o sonicador *UP 200S, Dr. Hielscher, GmbH*. A cultura sonicada foi centrifugada (4°C/30min /16000rpm) e o extrato enzimático (no sobrenadante) foi conservado a -20°C.

2.3.1.2. Teste do Nitrocefim

O *Nitrocefim* (*Oxoid*) é um substrato cromogénico de cefalosporina, e permite analisar a atividade das β-lactamases através da hidrólise do substrato pela enzima. Para a

realização do teste adicionou-se uma gota de 5 µl de *Nitrocefin* a cerca de 50 µl do extrato enzimático de cada isolado. A degradação do substrato altera a sua cor amarela inicial para vermelho.

2.3.1.3. Gel de Migração

Para a preparação do gel de migração utilizaram-se os reagentes enumerados na Tabela 4.

Tabela 4. Descrição dos reagentes utilizados na preparação do gel de migração.

Reagentes	Volume (ml)
ReadySol IEF 40% (<i>Pharmacia Biotech</i>)	3,75
Ampholine® (pH 3.0-9.0) (<i>Amersham Pharmacia Biotech AB</i>)	2
Água destilada	24
Persulfato de amónia 10% (<i>Merck</i>)	0,85
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina) (<i>Merck</i>)	0,50

O gel foi colocado numa película GelBond®PAG Film (*Amersham Pharmacia Biotech AB*) assente numa placa de vidro, previamente tratada com *Repel-Silane* (*Pharmacia*). A polimerização foi efetuada pela exposição das placas à luz, durante cerca de 25 minutos; após esse tempo, o gel foi colocado na plataforma de migração (*Multiphor II*, *Amersham Pharmacia Biotech*).

2.3.1.4. Migração

Para a migração das amostras, colocaram-se, à superfície do gel (ânodo), bandas de papel (*Amersham Biosciences AB*), uma por cada amostra, que serviram de suporte para a adição de 10 µl de amostra. Foram também colocadas três bandas adicionais para a adição de 5 µl dos seguintes extratos de β-lactamases de referência, cujos pls são conhecidos: pl 8,9 (*E. coli* 5753, CTX-M-15), pl 5,2 (*E. coli* Guer, IRT-2), pl 5,4 (*E. coli* R111, TEM-1) e pl 7,6 (*K. pneumoniae* 6884, SHV-107). Por último, aplicaram-se no gel duas tiras de papel de filtro (*Amersham Pharmacia Biotech AB*), uma embebida em H₃PO₄ 1M (no ânodo) e outra em NaOH 1M (no cátodo), as quais asseguravam o contacto entre o gel e os eléctrodos. A migração teve a duração de 1 hora, com uma voltagem de 1500V, intensidade de 30mA e potência de 30W.

2.3.1.5. Gel de Revelação

Para a revelação do teste foi efetuada a preparação de um gel, utilizando os reagentes descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Descrição dos reagentes utilizados na preparação do gel de revelação.

Reagentes	Quantidade
Agar (Difco)	1,094 g
Amido (Difco)	0,365 g
Tampão Fosfato 0,1 M pH6	70 ml
Solução de Iodo	3 ml
Penicilina G	10 mg

O gel de revelação foi introduzido entre duas placas de vidro e, após solidificação, foi colocado sobre o gel de migração.

2.3.1.6. Leitura e interpretação

A leitura e interpretação dos resultados foram efetuadas através da comparação dos pl das amostras em estudo com as bandas de β -lactamases de referência, referidas em 2.3.1.4.

2.3.2. SDS-PAGE – OMPs

O método molecular SDS-PAGE permitiu identificar as proteínas OMP através do seu tamanho (kDa). O reagente dodecil-sulfato de sódio (SDS) tem a propriedade de desnaturar as proteínas, atingindo a estrutura primária, e de lhes conferir uma carga negativa. De seguida as proteínas foram colocadas num gel de poliacrilamida e, através de um campo elétrico, migraram (para o polo positivo), consoante o tamanho molecular, permitindo a separação das mesmas.

2.3.2.1. Extração de OMPs

Os isolados foram semeados em 4 ml de meio LB (*Luria Broth*) (INSA) e incubados a 37 °C /18 horas, com agitação. Foram transferidos 1,5 ml, de cada cultura, para um *ependorf* e centrifugou-se a 13000 rpm, durante 4 minutos. Após eliminação do sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* com 1 ml de água estéril e centrifugou-se com as condições referidas anteriormente. Este passo foi repetido duas vezes e, no fim, ressuspendeu-se o *pellet* com 1 ml de água gelada e estéril. As amostras foram sonicadas durante 30 segundos e, após uma pausa de 30 segundos, efetuou-se outra

sonicação de 30 segundos com o aparelho *UP 200S, Dr. Hielscher, GmbH*. Os produtos sonicados foram centrifugados a 5000 rpm durante 2 minutos, para eliminar células bacterianas intactas. Após remoção do sobrenadante para um novo *ependorf*, este foi novamente centrifugado, durante 60 minutos, a 15300 rpm. O *pellet*, contendo apenas o envelope celular, foi ressuscitado em 0,8 ml de uma solução a 2% de *Sodium Lauryl Sarcosinate* em tampão Tris-Mg e incubou-se à temperatura ambiente, durante 20 minutos. De seguida, as amostras foram centrifugadas durante 60 minutos, a 15300 rpm, e o *pellet* foi ressuscitado em 25 µl de água, e fervido em banho-maria, durante 5 minutos, seguindo-se uma centrifugação de 1 minuto. O sobrenadante, onde se encontravam as proteínas de membrana, foi guardado a -20°C.

2.3.2.2. Preparação do gel de SDS-Poliacrilamida

O gel de SDS-Poliacrilamida é composto por dois géis: o gel de resolução, constituído por 4 ml de acrilamida, 2,5 ml de tampão do gel (1,5 M em Tris pH 8,8 e SDS 0,4 %), 3,5 ml de água, 5 µl de TEMED e 50 µl de APS; e o gel de concentração formado por 550 µl de acrilamida, 1,050ml de tampão do gel (0,5 M em Tris pH 6,8 e SDS 0,4 %), 2,542 ml de água, 4 µl de TEMED e 21 µl de APS.

Depois de preparado o sistema (placas de vidro, espaçadores e pentes), colocou-se a solução de resolução e deixou-se polimerizar; de seguida, colocou-se a solução de concentração e deixou-se polimerizar. O gel foi colocado no aparelho de eletroforese (*Enduro Electrophoresis Systems, Labnet International, Inc*) e, de seguida, foi adicionado o tampão de eletroforese (3 % de Tris; 14,4 % de glicina e 1% de SDS).

2.3.2.3. Preparação e aplicação das amostras no gel

A 10 µl de amostra, adicionou-se o mesmo volume de *Loading Buffer SDS 2x*, desnaturou-se durante 5 minutos num banho-maria a 100°C, centrifugou-se para concentrar a amostra e aplicou-se no gel, juntamente com o marcador molecular. Iniciou-se a eletroforese, com as seguintes condições: 125 V para o gel de concentração, durante 30 minutos e 150 V para o gel de resolução, durante 90 minutos.

2.3.2.4. Revelação do gel

O gel foi corado com azul de *Coomassie* (2,5 g de azul de *Coomassie Brilliant R* em 454 ml de metanol, 96 ml de ácido acético glacial e 450 ml de água), durante 60 minutos, à temperatura ambiente, com agitação. De seguida, retirou-se esta solução e adicionou-se a solução descorante (600 ml de metanol, 200 ml de ácido acético e

1200 ml de água); após 12 horas nesta solução, retirou-se o gel e analisaram-se as bandas por comparação com o marcador de peso molecular e as estirpes de referência (*wild-type*).

2.4. Caracterização molecular de mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos

2.4.1. Extração de DNA

Os métodos fenotípicos e bioquímicos foram utilizados para orientar a pesquisa e identificação de β -lactamases por métodos moleculares, especificamente o método *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e a sequenciação nucleotídica.

Para a realização destes métodos foi necessário extrair o DNA dos isolados em estudo. Assim, colocou-se uma porção de cultura em 750 μ l de água bidestilada estéril, centrifugou-se durante 5 minutos, a 10000 rpm, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 500 μ l de água bidestilada estéril, efetuando uma nova centrifugação nas mesmas condições. O *pellet* foi novamente ressuspendido em 100 μ l de água bidestilada estéril e fervido durante 15 minutos, seguindo-se uma nova centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi, posteriormente, congelado a -20°C.

2.4.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Como foi acima referido, utilizou-se o PCR para pesquisar e confirmar a presença de genes que codificam β -lactamases, os genes *bla*. Neste trabalho foram pesquisados os genes, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1G}, *ampC*, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} e *bla*_{IMP}. Pesquisaram-se também os genes que codificam as porinas OmpK35, OmpK36, OmpK37, OmpC, OmpF, Omp35 e Omp36, bem como os genes plasmídicos responsáveis pela resistência às fluoroquinolonas (genes PMQR).

Para a pesquisa dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1G} e *ampC* utilizou-se o PCR *multiplex* ESB, cuja mistura pré-PCR foi preparada numa câmara de fluxo laminar (Holton), sendo composta por tampão (1x, *Quiagen*), dNTPs (0,5mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3mM, *Quiagen*), Q solution (1x, *Quiagen*), *primers* específicos (Tabela 6) e Taq polimerase (1,25 unidades, *Quiagen*). Os genes que codificam β -lactamases AmpC plasmídicas (PMA β) foram pesquisados utilizando também um PCR *multiplex* numa mistura semelhante à referida anteriormente, com os *primers* descritos na Tabela 7. De igual modo, procedeu-se à amplificação dos genes PMQR (Tabela 8).

Tabela 6. Características dos *primers* utilizados na amplificação por PCR *multiplex* e PCR simples de genes *bla*_{ESBL}, e na sequenciação.

Designação do Primer	Sequência	Temperatura de hibridação	Gene	Tamanho do fragmento
PCR Multiplex:				
P1	5'TACGATACGGGAGGGCTTAC-3'	61°C	<i>bla</i> _{TEM}	716bp
P2	5'TTCCTGTTTTGCTCACCCA-3'			
AmpCF	5'CCCCGTTATAGAGCAACAA-3'	61°C	<i>ampC</i>	634bp
AmpCR	5'TCAATGGTCGACTTCACACC-3'			
SHVF	5'TCAGCGAAAAACACCTTG-3'	61°C	<i>bla</i> _{SHV}	471bp
SHVR	5'TCCCGCAGATAAATCACCA-3'			
OXAF	5'TATCTACAGCAGCGCCAGTG-3'	61°C	<i>bla</i> _{OXA-1G}	199bp
OXAR	5'CGCATCAAATGCCATAAGTG-3'			
PCR Simples e sequenciação:				
FIN*	5'ATTCTTGAAGACGAAAGGGC-3'	56°C	<i>bla</i> _{TEM}	1091bp
DEB*	5'ATGAGTAAACTTGGTCTGAC-3'			
149P*	5'CGCTTCTTTACTCGCCTTTA-3'	56°C	<i>bla</i> _{SHV}	911bp
1059*	5'TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3'			
OXA-1-F*	5'ATGAAAAACACAATACATATC-3'	56°C	<i>bla</i> _{OXA-1G}	826bp
OXA-1-R	5'AATTTAGTGTGTTAGAATGG-3'			

(*) *Primers* utilizados no PCR e na sequenciação.

Tabela 7. Características dos *primers* utilizados na amplificação por PCR *multiplex* dos genes *ampC* plasmídicos (PMAβ), para o PCR simples *bla*_{ACT} e na sequenciação.

Designação do Primer	Sequência	Temperatura de hibridação	Gene	Tamanho do fragmento
PCR Multiplex:				
MOXM – F	5'GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT-3'	64°C	<i>bla</i> _{MOX}	520bp
MOXM - R	5'CACATTGACATAGGTGTGGTGC-3'			
CITM - F	5'TGGCCAGAACTGACAGGCAAA-3'	64°C	<i>bla</i> _{CIT}	462bp
CITM- R	5'TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC-3'			
DHAM-F	5'AACTTTTACAGGTGTGCTGGGT-3'	64°C	<i>bla</i> _{DHA}	405bp
DHAM-R	5'CCGTACGCATACTGGCTTTGC-3'			
ACCM-F	5'ACCAGCCTCAGCAGCCGGTTA-3'	64°C	<i>bla</i> _{ACC}	346bp
ACCM-R	5'TTCGCCGCAATCATCCCTAGC-3'			
EBCM-F	5'CAGTTCTGCATTCCGCCGAC-3'	64°C	<i>bla</i> _{MIR}	802bp
EBCM-R	5'CACCTTGTTATCACTGCCTCCGAC-3'			
FOXMF	5'GGACTCATCGCCAGTATTCCAACC-3'	64°C	<i>bla</i> _{FOX}	286bp
FOXMR	5'AACCTCAGCAGATCCGCCGAAC-3'			
PCR Simples:				
EBC-F	5'AAATCCCTAAGCTGTGCCCTGCTG -3'	64°C	<i>bla</i> _{MIR}	1137bp
EBC-R	5' TTAGCTGCAGCGCTCGAGGAT -3'			

(*)

Tabela 8. Características dos *primers* utilizados na amplificação por PCR *multiplex*, e na sequenciação dos genes que conferem resistência às quinolonas (PMQR).

Designação do <i>Primer</i>	Sequência	Temperatura de hibridação	Gene	Tamanho do fragmento
PCR Multiplex:				
<i>qnrA</i>	5'GGGTATGGATATTATTGATAAAG3'	55°C	<i>qnrA</i>	661bp
<i>qnrB</i>	5'CTAATCCGGCAGCACTATTA-3'			
<i>qnrBF-TW</i>	5'CCTGAGCGGCAGCACTGAATTTAT-3'	55°C	<i>qnrB1</i>	409bp
<i>qnrBR-TW</i>	5'GTTTGCTGCTCGCCAGTCGA-3'			
<i>qnrCF2</i>	5'AACGTACGATCAAATTG-3'	55°C	<i>qnrC</i>	561bp
<i>qnrCR</i>	5'TCCACTTTACGAGGTTCT-3'			
<i>qnrDF</i>	5'CGAGATCAATTTACGGGGAATA-3'	55°C	<i>qnrD</i>	582bp
<i>qnrDR</i>	5'AACAAGCTGAAGCGCCTG-3'			
<i>qnrSJF</i>	5'ACGACATTCGTCAACTGCAA-3'	55°C	<i>qnrS</i>	417bp
<i>qnrSJR</i>	5'TAAATTGGCACCCCTGTAGGC-3'			
<i>aac6lb-5*</i>	5'TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA-3'	55°C	<i>aac</i>	482bp
<i>aac6lb-6</i>	5'CTCGAATGCCTGGCGTGTTC-3'			
<i>qepAF</i>	5'GAACCGATGACGAAGCACAG-3'	55°C	<i>qepA1</i>	1013bp
<i>qepAR</i>	5'CGTCGTTAAAGCATTCTTGTC-3'			
PCR Simples e sequenciação:				
<i>qnrBF2*</i>	5'ATGACGCCATTACTGTATAA-3'	49°C	<i>qnrB</i>	681bp
<i>qnrBR2*</i>	5'CTAACCAATCACCGCGATGC-3'			
<i>qnrSF2</i>	5'ATGGAAACCTACAATCATAC-3'	50°C	<i>qnrS</i>	654bp
<i>qnrSR2</i>	5'GTCAGGATAAACAACAATAC-3'			
<i>oqxA-F*</i>	5'AGAGTTCAAAGCCACGCTG-3'	64°C	<i>oqxA</i>	921bp
<i>oqxB-R</i>	5'CTCCTGCATCGCCGTCACCA-3'	64°C	<i>oqxB</i>	921bp

(*) *Primers* utilizados no PCR e na sequenciação.

A pesquisa e identificação dos genes *bla*_{CTX-M} (Tabela 9), do ambiente genético do gene *bla*_{KPC} (Tabela 10), *bla*_{TEM} (externos), *bla*_{OXA-1G} (externos) e *bla*_{SHV} (externos) (Tabela 6), foi realizada com um PCR simples, utilizando uma mistura pré-PCR composta por tampão (1x, *Quiagen*), dNTPs (0,2mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3mM, *Quiagen*), Q solution (1x, *Quiagen*), *primers* específicos 9 e 10) e Taq polimerase (0,5 unidades, *Quiagen*).

Tabela 9. Características dos *primers* utilizados na amplificação por PCR dos genes *bla_{CTX-M}* e na sequenciação

Designação do Primer	Sequência	Temperatura de hibridação	Gene	Tamanho do fragmento
CTXiF	5'TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA-3'	55°C	<i>bla_{CTX-M}</i>	544bp
CTXiR	5'CGATATCGTTGGTGGTGCCATA-3'			
CTX-M-1F*	5'ATGGTTAAAAAATCACTGCG-3'	55°C	<i>bla_{CTX-M-1}</i>	870bp
CTX-M-15R*	5'ACCGTCGGTGACGATTTTAG-3'			
CTX-M-15F*	5'AGAATAAGGAATCCCATGGTT-3'	55°C	<i>bla_{CTX-M-1}</i>	903bp
CTX-M-1R*	5'CCGTTTCCGCTATTACAA-3'			
CTX-M-9R2	5'AGTTACACGCCTTCGGCGAT-3'	55°C	<i>bla_{CTX-M-9}</i>	878bp
CTX-M-9F	5'ATGGTGACAAAGAGAGTGCAAC-3'			

(*) *Primers* utilizados no PCR e na sequenciação.

Ainda foi efetuada a pesquisa do gene *bla_{OXA-48}* numa amostra aleatória (n=106), de entre as 426 estirpes iniciais, nomeadamente as 22 selecionadas, utilizando um PCR simples (Tabela 10).

Tabela 10. Características dos *primers* utilizados na amplificação por PCR dos genes que codificam carbapenemases de classe A, classe B e classe D.

Designação do Primer	Sequência	Temperatura de hibridação	Gene	Tamanho do fragmento
KPC -F*	5'ATGTCAGTGTATCGCCGTCTAG-3'	55°C	<i>bla_{KPC}</i>	1018bp
KPC -R*	5'AGAGCCTTACTGCCCCGTTG-3'			
GES -F*	5'AAAGCAGCTCAGATCGGTGT-3'	56°C	<i>bla_{GES}</i>	891 bp
GES - R*	5'AATTCGTACAGTTCTACGGC-3'			
OXA-48 -F	5'ATGCGTGTATTAGCCTTATC-3'	58°C	<i>bla_{OXA-48}</i>	140 bp
OXA-48 -R	5'CCTAAACCATCCGATGTG-3'			
KPC_istB-F	5'GCTACCGCTTGAAGGACAAG-3'	60°C	<i>bla_{KPC}</i>	1800bp
KPC_tnpA-R	5'GTCAATGCCAAGACCCATCC-3'			
NDM - F	5'GTTTGATCGTCAGGGATGGC-3'	58°C	<i>bla_{NDM}</i>	359 bp
NDM - R	5'ACCGGTGATATTGCTACTGGT-3'			
IMP - F	5'GAAGGCGTTTATGTTTCATAC-3'	56°C	<i>bla_{IMP}</i>	234 bp
IMP - R	5'AGAATTAAGCCACTCTATTCC-3'			
VIM -F	5'GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3'	55°C	<i>bla_{VIM}</i>	556 bp
VIM -R	5'GGAATGACGAAGTGTGCTTC-3'			

(*) *Primers* utilizados no PCR e na sequenciação.

Assim, a amplificação por PCR dos genes *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}* e *bla_{IMP}* utilizou a seguinte mistura pré-PCR: tampão (1x, *Quiagen*), dNTPs (0,2mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3mM, *Quiagen*), Q solution (1x, *Quiagen*), *primers* específicos (Tabela 10), e Taq polimerase (1,25 unidades, *Quiagen*).

Para a amplificação por PCR dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{GES}*, e *bla_{NDM}* (Tabela 10), *ompK35*, *ompK36*, *ompK37* utilizou-se a seguinte mistura pré-PCR: tampão (1x, *Quiagen*), dNTPs (0,2mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3mM,

Quiagen), Q solution (1x, *Quiagen*), *primers* específicos (Tabela 11) e Taq polimerase (0,6 unidades, *Quiagen*).

Tabela 11. Características dos *primers* utilizados na amplificação por PCR e na sequenciação dos genes que codificam as porinas OmpK35/OmpF/Omp35; OmpK36/OmpC/Omp36 e OmpK37.

Designação do <i>Primer</i>	Sequência	Temp. de hibridação	Gene	Tamanho do fragmento
ompK35 –F	5'GTAATAAATAATGATGAAGCG-3'	55°C	<i>ompK35/ompF</i>	1080 bp
ompK35 –R	5'TTAGAATTGGTAAACGATAC-3'		<i>/omp35*</i>	
ompK36 –F	5'GTTAATAACATGAAAGTTAAAG-3'	55°C	<i>ompK36/ompC</i>	1105bp
ompK36 –R	5'GTGCTTAGAACTGGTAAAC-3'		<i>/omp36*</i>	
ompK37 –F	5'GTACTGGCCCTCGTTATTC-3'	55°C	<i>ompK37</i>	1113 bp
ompK37 –R	5'GATGTTATCGGTAGAGATAC-3'			

Todos os *primers* foram utilizados na amplificação por PCR e na sequenciação. (*) Existe homologia entre as sequências destes genes, permitindo usar o mesmo par de *primers*.

A todos os PCRs foi adicionado DNA numa concentração final de 4ng/μl e água destilada necessária para um volume final de 25μl. De seguida as amostras foram amplificadas num termociclador (*C1000 Thermocycler, Bio-Rad*), utilizando-se os programas das reações de PCR *multiplex* e de PCR simples específicos de cada protocolo.

Os diferentes produtos de PCR foram aplicados (7 μl), juntamente com 2 μl de tampão (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% xileno-cianol e 30% glicerol), num gel de agarose a 2% (*Agarose Multi-Purpose, BIOLINE*) em TAE 1x (0,04M tris-acetato, 0,001M EDTA), com *SYBR SYBR® Safe* a 1%; de seguida efetuou-se uma electroforese, durante 45 minutos, a 120 V. Finalmente, observou-se cada gel utilizando o *Sistema de Documentação de Imagem Gel Doc 2000 2001 (Biorad)*. Observaram-se as bandas, e o tamanho do produto de amplificação permitiu identificar os genes presentes na amostra em estudo, por comparação com as bandas de tamanho conhecido de um controlo positivo (previamente identificados por comparação com um marcador de peso molecular). Em todas as corridas foi colocado um controlo positivo e um controlo negativo.

2.4.3. Purificação dos produtos PCR

Após reação de PCR, os dNTPs e *primers*, não utilizados na reação, e que permaneceram juntamente com o produto de amplificação, podiam interferir com o PCR cíclico a realizar na sequenciação nucleotídica. Para contornar esta situação, purificaram-se os produtos de PCR com *ExoSAP-IT (Usb®)*, o qual é constituído por duas enzimas hidrolíticas, uma exonuclease (degrada *primers* de cadeia simples residuais e DNA de cadeia simples), e uma fosfatase alcalina (hidrolisa dNTPs que não foram utilizados).

Assim, foram adicionados 4µl de EXOSAP a 10µl de produto de PCR, seguindo-se uma incubação a 37°C, durante 15 minutos, a qual promoveu a atividade daquelas enzimas, e, de seguida, uma incubação a 80°C, durante 15 minutos, na qual as mesmas foram inativadas. Esta reação foi igualmente realizada no termociclador (*C1000 Thermocycler, Bio-Rad*).

2.4.4. Sequenciação nucleotídica de genes de resistência

Após a deteção dos genes de resistência, por PCR, foi necessário proceder à sua identificação, pela determinação da respetiva sequenciação nucleotídica.

Aos produtos purificados (10ng de DNA) adicionou-se uma mistura de pré-sequenciação: 2µl de BigDye v1.1 (*Applied Biosystem*), *primer* específico do gene a sequenciar (*reverse* ou *forward*) e água estéril necessária para perfazer um volume final de 10µl.

A reação de sequenciação foi efetuada no termociclador (*C1000 Thermocycler, Bio-Rad*) em 3 fases: uma de desnaturação (96 °C/30s), seguindo-se uma fase de incubação (56 °C/5s) e, por último, uma fase de extensão (60 °C/4 min).

Terminada a sequenciação, as amostras foram enviadas à *Unidade de Tecnologia e Inovação* do INSA, onde, primeiramente, foram removidos os terminadores, por precipitação alcoólica e, posteriormente, foi realizada a migração no sequenciador automático (*ABI PRISM® 3100, Applied Biosystem*). Os registos das sequências nucleotídicas (eletroferogramas), ali obtidos, foram analisados e interpretados no Laboratório URRÁ, recorrendo ao *software Bionumerics© Applied Maths*.

2.5. Detecção e identificação de plasmídeos

A deteção e identificação de plasmídeos foi efetuada nos isolados com o gene *bla*_{KPC} e o gene *bla*_{GES}.

2.5.1. Conjugação

Depois de identificados os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{GES} foi necessário estudar a sua localização. Para tal, realizou-se a transferência plasmídica pela técnica de conjugação. Esta utilizou as seguintes estirpes recetoras: *E. coli* J₅₃ NaN₃^R, *E. coli* C600 S^R e *E. coli* C600 Rif^R, resistentes à azida, estreptomicina e rifampicina, respetivamente, e suscetíveis ao ertapeneme e amoxicilina. A conjugação consistiu na adição das estirpes recetoras (*de per si*) com as estirpes a estudar (dadoras), suscetíveis aos três antibióticos referidos, mas resistentes ao ertapeneme e amoxicilina. Posteriormente, avaliou-se a presença de colónias resistentes à azida + ertapeneme + amoxicilina, ou estreptomicina + ertapeneme + amoxicilina, ou rifampicina + ertapeneme + amoxicilina, de acordo com as suscetibilidades, quer das estirpes dadoras, quer das recetoras.

Assim, a conjugação foi efetuada utilizando um protocolo de vários dias, o primeiro consistindo num “screening”, utilizando meio seletivo de MacConkey agar com antibiótico incorporado. As estirpes dadoras e a recetora C600 Rif^R foram semeadas em meio impregnado com rifampicina (250µg/ml); num meio impregnado com estreptomicina (160 µg/ml) foram semeadas as estirpes dadoras e a estirpe recetora C600 S^R, seguiu-se o mesmo modelo para o conjunto de estirpes dadoras e estirpe recetora J₅₃ NaN₃^R. Em meio seletivo de MacConkey agar incorporado com ertapeneme (0,5 µg/ml), e separadamente, amoxicilina (50 µg/ml), semearam-se todas as estirpes dadoras e todas as recetoras. Após uma incubação a 37°C, durante 18h, observou-se o crescimento de colónias, e selecionaram-se aquelas que estariam aptas para a conjugação. Transferiu-se então uma colónia isolada dessas estirpes para 5 ml de meio BHI e incubou-se durante 3 horas. De seguida, pipetou-se 100µl da estirpe dadora juntamente com 200µl da estirpe recetora, em meio BHI, e incubou-se sem agitação, a 37°C, durante 18 horas, em banho-maria. No terceiro dia, procedeu-se à seleção de transconjugantes, pelo que se inoculou 100µL da cultura de transconjugantes em placas de meio seletivo de MacConkey agar com antibiótico incorporado (marcadores de seleção) e incubou-se a 37°C, durante 18 horas. No dia seguinte, picaram-se as colónias obtidas, usando palitos estéreis, e inoculou-se, cada um, em 5 mL de BHI, na mesma concentração de antibiótico utilizada nas placas de seleção e incubou-se, com agitação, a 37°C, durante 6 horas. As estirpes que

apresentavam crescimento foram semeadas em placas de meio seletivo de MacConkey agar com antibióticos incorporados (marcadores de seleção) e incubadas a 37°C, durante 18 horas. A presença de transconjugantes foi analisada da seguinte forma: caso os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{GES} fossem plasmídicos o fenótipo que conferiam passaria a ser expresso pela estirpe recetora, o que foi pesquisado e confirmado por PCR do DNA destas estirpes, utilizando *primers* específicos para os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{GES}.

2.5.2. Determinação da localização cromossômica ou plasmídica de genes *bla*: restrição com a enzima I-CeuI

A enzima I-CeuI caracteriza-se por digerir DNA cromossômico. Foi utilizada neste trabalho para analisar a localização dos genes que codificam as enzimas *bla*_{KPC} e *bla*_{GES} nas estirpes clínicas. Para a realização desta técnica utilizou-se a mesma metodologia usada na técnica de PFGE, consistindo nos seguintes passos:

2.5.2.1. Preparação dos discos

As estirpes em estudo foram semeadas em meio de gelose simples (INSA) e incubadas a 37°C, durante 18 horas. De seguida, repicaram-se várias colónias de cada amostra; uma vez em *ependorfs*, adicionou-se 1 ml de tampão fosfato (0,05M pH 8); após centrifugação a 5800 rpm, durante 10 minutos, a 4°C, rejeitou-se 0,15 ml do sobrenadante e emulsionou-se o volume restante, que foi colocado numa cuvete e lida a densidade ótica, num espectrofotómetro, a 650 nm (situou-se entre 1,5 e 1,6). Desta solução retirou-se 0,3 ml, colocou-se a 41°C, em banho-maria, durante 5 minutos e adicionou-se 0,3 ml de agarose (SeaPlaque GTG –Low Melting 1,5%). Recorrendo a uma seringa de 1 ml, aspirou-se a solução e colocou-se no congelador durante 4 minutos, seguidos de 10 minutos à temperatura ambiente. Os discos foram cortados (1mm de espessura), colocados num tubo *falcon* de 15 ml, emersos em 1 ml de tampão EC (*Bacterial Lysis Solution*) e incubados, a 50°C, durante 3 horas. Terminado o tempo de incubação, retirou-se a solução EC, adicionou-se 1 ml de uma solução ES (*Digestion Buffer*) com proteinase K, e colocou-se em banho-maria, a 55°C, com agitação, durante 18 horas. Passado esse tempo, rejeitou-se a solução existente, adicionou-se 5 ml de água destilada autoclavada, e colocou-se no agitador orbital a 20 ver/s, durante 5 minutos; rejeitou-se a água, adicionou-se 10 ml de solução TE (*TE buffer*) 1x e colocou-se no agitador, durante 30 minutos, repetindo-se 4 vezes este processo. Os discos foram então colocados em *ependorfs* com 0,5 ml de solução TE 1x, estando prontos a ser utilizados.

2.5.2.2. Digestão enzimática

Com o objetivo de equilibrar os discos antes da digestão, preparou-se um tampão de restrição (0,01 ml de tampão específico da enzima, NEB2; 0,09 ml de água estéril, por estirpe) e adicionou-se 0,1 ml a cada tubo contendo os discos, seguindo-se uma incubação em banho-maria, a 37°C, durante 10 minutos. Rejeitou-se então o tampão de restrição, adicionou-se 0,1 ml da MIX de restrição (88 µl de água, 10 µl de tampão NEB2, 1 µl de BSA e 2 µl de enzima *Ceul* (*New England BioLab_{Inc}*), utilizando um volume de 0,12µl e 1,5 µl para as estirpes clínicas, e incubou-se a 37°C, durante 16 horas, em banho-maria. Para parar a reação colocaram-se os tubos a 4°C.

2.5.2.3. Gel de PFGE

O gel foi preparado para um volume de 200 ml, a 1% de agarose (Agarose Seakem Gold e solução TBE 0,5 x). Após o suporte estar preparado, já com o pente, verteu-se a agarose e deixou-se polimerizar. Os discos foram colocados no gel, uma amostra por poço, juntamente com os marcadores (*Lamba Ladder*, *New England BioLab_{Inc}*), e iniciou-se a corrida, com as seguintes especificações: Pulso inicial 0,1 s; Pulso final 36 s; 6 v/cm; 24 horas; 11°C. Após as 24 horas, o gel foi introduzido em solução TBE (*TBE buffer*) 0,5 x e 0,05 ml de solução *Gel Red*, durante 20 minutos, seguindo-se a descoloração (colocou-se o gel em água destilada, por 18 horas), fotografando de seguida, utilizando o *Sistema de Documentação de Imagem Biorad Gel Doc 2000 2001*.

Depois da digestão com a enzima, foi extraído DNA das bandas resultantes (*KIT illustra™ GFX™ PCR DNA and GEL Band Purification*) e realizado o PCR específico dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{GES}*. Um resultado positivo no PCR correspondia à presença do gene no cromossoma.

2.5.3. Pesquisa do grupo de incompatibilidade por PCR Based Replicon

Type (PBRT)

A pesquisa do grupo de incompatibilidade dos plasmídeos foi efetuada através do método PBRT, constituído por 18 PCRs simples para cada isolado em estudo. Este método permitiu identificar 18 plasmídeos que poderiam conferir resistência a antibióticos. A mistura pré-PCR foi idêntica para todos os PCR: tampão (1x, *Quiagen*), dNTPs (0,2mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (3mM, *Quiagen*), Q solution (1x, *Quiagen*), *primers* específicos para cada plasmídeo (Tabela 12) e Taq polimerase (0,5 unidades, *Quiagen*).

Tabela 12. Características dos *primers* usados na amplificação por PCR dos genes que caracterizam 18 grupos de incompatibilidade.

Designação do Primer	Sequência	Temperatura de hibridação	Tamanho do fragmento
A/C-Fwd1	5'AGAGAACCAAAGACAAAGACC-3'	57°C	467bp
A/C-Rev1	5'ACGACAAACCTGAATTGC-3'	57°C	467 bp
I1-F1	5'GGCACTCTGTGGAGCAAAGC-3'	57°C	164 bp
I1-R	5'TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT-3'	57°C	164 bp
T-F1	5'CCTGTTTGTGCCTAAACCAT-3'	59,1°C	742 bp
T-R1	5'GATTACACTTAGCTTTGGAC-3'	59,1°C	742 bp
P-F1	5'CCAGAAACGCCGTCGAAG-3'	59,1°C	508 bp
P-R1	5'GGCGCAGCCCTGGTTAA-3'	59,1°C	508 bp
FIC-F1	5'TATCCAGGCCCGGTTAAAAG-3'	60°C	288 bp
FIC-R1	5'TCTCCTCGTCGCCAAACTAG-3'	60°C	288 bp
W-F1	5'GTGTGCATTCCGAGCCTTTG-3'	67,6°C	346 bp
W-R1	5'TGCCTAAGAACAACAAAGCCC-3'	67,6°C	346 bp
HI1-R	5'TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA-3'	64°C	471 bp
HI1-F1	5'GAGCGATGGATTACTTCAGTAC-3'	64°C	471 bp
Fils-F	5'CTGTGTAAGCTGATGGC-3'	56°C	289 bp
Fils-R	5'CTCTGCCATAAACTTCAGC-3'	56°C	289 bp
FIB-F1	5'TTCAGTCAGTTAGCGGAGTTC-3'	62°C	712 bp
FIB-R1	5'GTGCTTCAGGGCATTAAATCG-3'	62°C	712 bp
N-F	5'GTCTAACGAGCTTACCGAAG-3'	58°C	560 bp
N-R	5'GTTTCAACTCTGCCAAGTTC-3'	58°C	560 bp
X-F1	5'AACCTTAGAGGCTATTTAAG-3'	52°C	369 bp
X-R1	5'TGAGAGTCAATTTTTATCTC-3'	52°C	369 bp
FrepB-F	5'TGATCGTTTAAGGAATTTTG-3'	50,5°C	270 bp
FrepB-R	5'AAGATCAGTCACCCATCC-3'	50,5°C	270 bp
Y-F1	5'CAAACAACACTGTGCAGCCTG-3'	64°C	760 bp
Y-R1	5'CGAGAATGGACGATTACAAAAC-3'	64°C	760 bp
L/M-F1	5'AAACTGACAGACGCTGGAT-3'	56°C	753 bp
L/M-R1	5'GGGCGGATTCTTTAGGGG-3'	56°C	753 bp
K-F1	5'TATTGCGGATCGTTATTCAGTG-3'	58°C	202 bp
K-R	5'TCTTTCACGAGCCCGCCAAA-3'	58°C	202 bp
B/O-F1	5'GGTGGAAAAGGGGTATATTG-3'	58°C	212 bp
B/O-R1	5'TCTGCGTTCCGCCAAGTTCG-3'	58°C	212 bp
HI2-F1	5'GCTTCTCCTGAGTCACCTG-3'	67,6°C	648 bp
HI2-R1	5'GCTCACTACCGTTGTCATCCT-3'	67,6°C	648 bp
FIA-F1	5'CCATGCTGGTTCTAGAGAAG-3'	62°C	462 bp
FIA-R1	5'GTATATCCTTACTGGCTCCG-3'	62°C	462 bp

2.6. Determinação da clonalidade e diversidade genética

2.6.1. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Para esta técnica utilizou-se exatamente a mesma metodologia descrita no capítulo 2.5.2., à exceção da enzima usada, que, neste caso, foi a enzima *XbaI* (*New England BioLab, Inc*) na seguinte mistura pré-restrição: 88 µl de água, 10 µl de tampão NEB2, 1 µl de BSA e 2 µl de enzima *XbaI*.

2.6.2. MLST

O método de MLST permitiu estudar a variabilidade genética, no tempo, de diferentes estirpes, pois caracteriza-as baseando-se nos perfis alélicos, através da técnica de PCR e sequenciação de 7 *housekeeping genes* e comparação dos resultados obtidos com Sequências Tipo (ST), disponíveis em bases de dados específicas (de acordo com a bactéria em causa). Neste trabalho, realizou-se o MLST dos isolados de *K. pneumoniae* com o gene *bla_{KPC}* e *bla_{GES}*, e do único isolado de *E. coli* com o gene *bla_{CTX-M-15}* para verificar se este correspondia à estirpe pandémica produtora de CTX-M-15 (Tabela 13 e 14).

Tabela 13. Primers usados na amplificação por PCR e sequenciação dos genes incluídos no MLST de *K. pneumoniae*.

Designação do Primer	Sequência	Temperatura de hibridação	Gene	Tamanho do fragmento
rpoB-F	5'GGCGAAATGGCGGAAAAC-3'	55.4°C	<i>rpoB</i>	1053 bp
rpoB-R	5'TGAACGCTACACGCATGT-3'	55.4°C	<i>rpoB</i>	1053 bp
phoE-F	5'GCAACACCGACTTCTTC-3'	55.4°C	<i>phoE</i>	593 bp
phoE-R	5'TCAGAAGTGGTAGGTCATAC-3'	55.4°C	<i>phoE</i>	593 bp
tonB-F	5'GCTTTATACCTCGGTACATC-3'	55.4°C	<i>tonB</i>	570 bp
tonB-R	5'ATCGCGCTTTTCACCTCG-3'	55.4°C	<i>tonB</i>	570 bp
pgi-F	5'GAGAAAAACCTGCCTGTAAGT-3'	55.4°C	<i>pgi</i>	741 bp
pgi-R	5'CCACGCTTTATAGCGGTTAAT-3'	55.4°C	<i>pgi</i>	741 bp
gapA-F	5'TGAAATATGACTCCACTCACGG-3'	59.6°C	<i>gapA</i>	637 bp
gapA-R	5'TTGATTTCTTCGTAGGACGCTG-3'	59.6°C	<i>gapA</i>	637 bp
mdh-F	5'CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAAG-3'	59.6°C	<i>mdh</i>	757 bp
mdh-R	5'CCGTTTTTCCCAGCAGCAG-3'	59.6°C	<i>mdh</i>	757 bp
infB-F	5'CTCGCTGCTGGACTATATTCG-3'	59.6°C	<i>infB</i>	463 bp
infB-R	5'CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC-3'	59.6°C	<i>infB</i>	463 bp

Tabela 14. *Primers* usados na amplificação por PCR e sequenciação dos genes incluídos no MLST de *E. coli*.

Designação do <i>Primer</i>	Sequência	Temperatura de hibridação	Gene	Tamanho do fragmento
adkF2	5'ATGCGTATCATTCTGCTTGG-3'	60°C	<i>adk</i>	593 bp
adkR	5'CCGTCAACTTTCGCGTATTT-3'	60°C	<i>adk</i>	593 bp
fumCF2	5'TCCCGGCAGATAAGCTGTGG-3'	60°C	<i>fumC</i>	667 bp
fumCR3	5'AACCAGGGCATCACAGGTC-3'	60°C	<i>fumC</i>	667 bp
gyrBF1	5'TGGTAGATAACGCTATCGACG-3'	60°C	<i>gyrB</i>	767 bp
gyrBR1	5'GTCCATGTAGGCGTTCAGG-3'	60°C	<i>gyrB</i>	767 bp
icdF1	5'ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTTC-3'	60°C	<i>icd</i>	878 bp
icdR	5'GGACGCAGCAGGATCTGTT-3'	60°C	<i>icd</i>	878 bp
mdhF2	5'ATGAAAGTCGCAGTCCTCG-3'	60°C	<i>mdh</i>	780 bp
mdhR2	5'GTA CTGACCGTCGCCTTC-3'	60°C	<i>mdh</i>	780 bp
purAF1	5'TCGGTAACGGTGTGTGCTG-3'	60°C	<i>purA</i>	845 bp
purAR	5'CATACGGTAAGCCACGCAGA-3'	60°C	<i>purA</i>	845 bp
recAF2	5'TCGTCGAAATCTACGGAC-3'	55.8°C	<i>recA</i>	704 bp
recAR2	5'ACCTTTGTAGCTGTACCAC-3'	55.8°C	<i>recA</i>	704 bp

3. Resultados

Considerando os objetivos propostos para este estudo e utilizando os métodos fenotípicos, bioquímicos e moleculares, descritos no ponto 2., obteve-se os resultados, que se passam a apresentar.

3.1. Análise da suscetibilidade aos antibióticos

3.1.1. Suscetibilidade aos carbapenemes

A pesquisa inicial da suscetibilidade aos carbapenemes de 426 isolados permitiu detetar 22 (5,2%) que presumivelmente teriam suscetibilidade diminuída a estes antibióticos. Portanto, foram retidos para o restante estudo, todos estes isolados, que existiam em 9 dos 17 hospitais da amostra inicial (Figura 8).

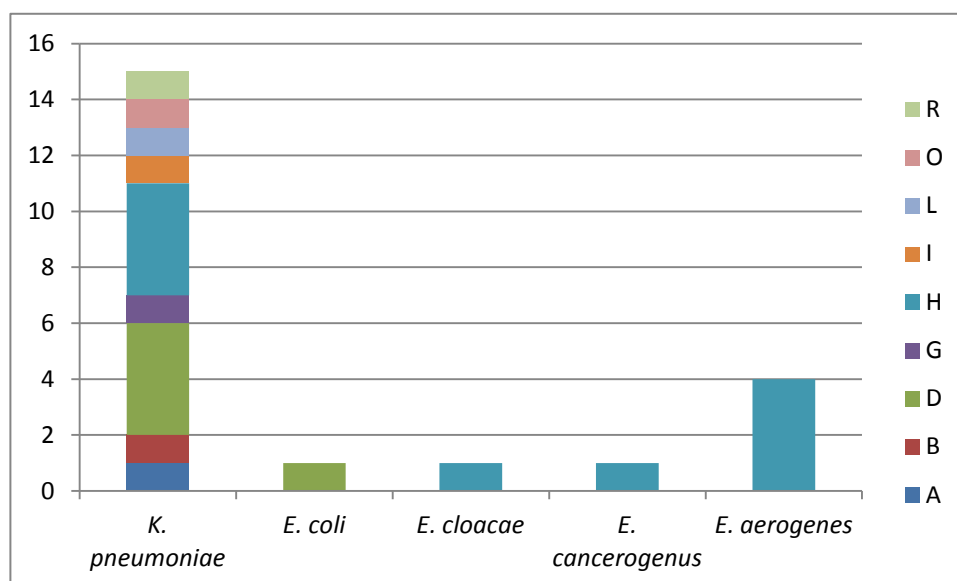


Fig. 8. Isolados (n=22) com suscetibilidade diminuída ao ertapeneme por espécie bacteriana e por hospital.

3.1.2. Perfil de suscetibilidade aos antibióticos e multirresistência

O teste de suscetibilidade aos antibióticos foi realizado aos 22 isolados com suscetibilidade diminuída ao ertapeneme. A interpretação do TSA permitiu identificar o perfil de suscetibilidade aos antibióticos testados, apresentado na Figura 9. Confirmou-se que aqueles isolados apresentavam suscetibilidade diminuída aos carbapenemes, mas destes, apenas 2 eram resistentes aos 3 carbapenemes estudados. Todos os isolados expressam um fenótipo de suscetibilidade diminuída aos seguintes

antibióticos: amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, ticarcilina, cefalotina, cefuroxima, ceftazidima, cefpodoxima, cefixima e ertapeneme. Verificou-se também que todos os isolados são suscetíveis à colistina e fosfomicina.

Globalmente, verificou-se que 16, dos 22 isolados, apresentavam multirresistência aos antibióticos: Kp1, Kp2, Kp3, Kp4, Kp5, Kp6, Kp7, Kp8, Kp9, Kp10, Kp11, Kp12, Kp13, Kp14, Kp15 (*K. pneumoniae*) e Ea6 (*E. aerogenes*).

Na Figura 10 está ilustrado o perfil de suscetibilidade a 32 antibióticos, de 8 classes diferentes, de um isolado de *K. pneumoniae* (Kp6) produtor de β -lactamase KPC, onde se pode ver a sinergia do ertapeneme e da ceftazidima + ácido clavulânico com o ácido borónico (Figura 10A), bem como a sinergia do imipeneme, do aztreoname, da cefotaxima e da cefotaxima + ácido clavulânico com o ácido borónico (Figura 10B, sinergias sugestivas de produção de uma carbapenemase de classe A). Foi também detetada a sinergia do imipeneme com o imipeneme + EDTA, que sugere a produção de uma metalo- β -lactamase (carbapenemase de classe B).

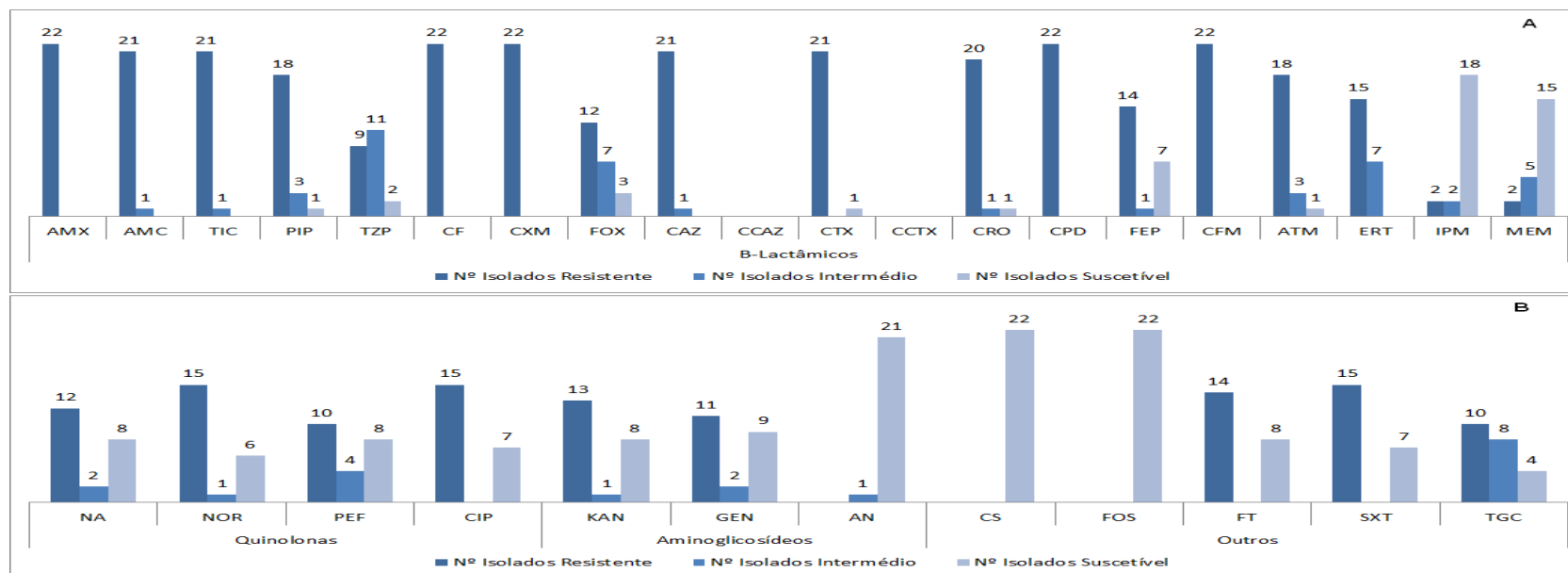


Fig. 9. A, Perfil de suscetibilidade de 22 isolados aos antibióticos β -lactâmicos obtido no TSA. B, Perfil de suscetibilidade de 22 isolados às quinolonas, aminoglicosídeos e a antibióticos de 5 outras classes, obtido no TSA. (As abreviaturas utilizadas estão discriminadas abaixo).

Abreviaturas (Figura 9 e 10): AN, amicacina; IMP, imipeneme; TZP, piperacilina + tazobactame; NA, ácido nalidixico; PEF, pefloxacina; FOX, cefoxitina; CTX, cefotaxima; CCTX, cefotaxima + ácido clavulânico; CRO, ceftriaxona; AMC, amoxicilina + ácido clavulânico; AMX, amoxicilina; ATM, aztreoname; CF, cefalotina; CAZ, ceftazidima; CCAZ, ceftazidima + ácido clavulânico; CFM, cefixima; CIP, ciprofloxacina; CPD, cefpodoxima; CXM, cefuroxima; ERT, ertapeneme; FT, nitrofuranos; FEP, cefepima; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; MEM, meropeneme; NOR, norfloxacina; PIP, piperacilina; SXT, trimetoprim/sulfamidas; TGC, tigeciclina; TIC, ticarcilina; CS, colistina; FOS, fosfomicina.

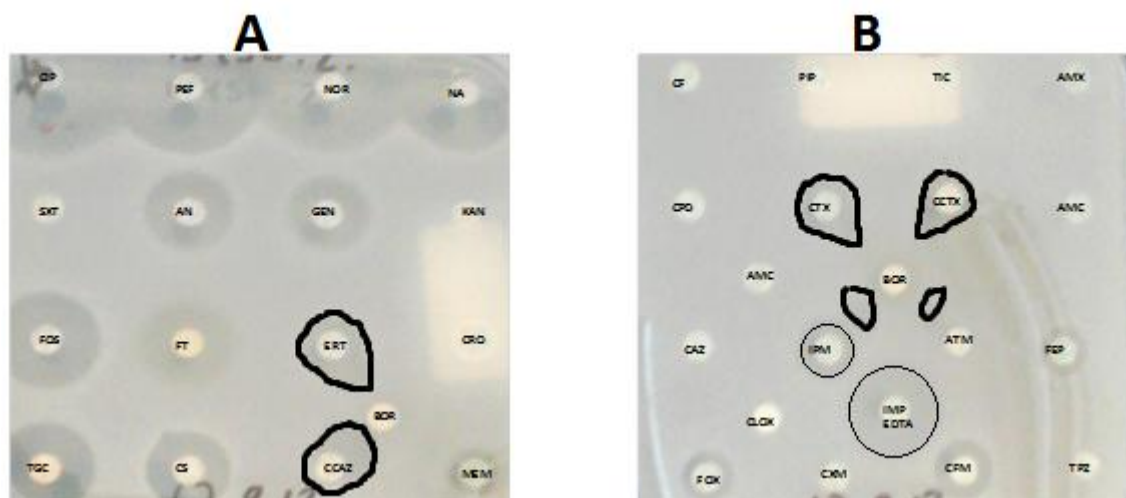


Fig. 10. Imagem do TSA de uma estirpe produtora de β -lactamase KPC. A, identifica-se sinergia do ertapeneme (ERT), do meropeneme (MEM), do CRO e CCAZ com o ácido borónico (sinergia sugestiva de β -lactamase de classe A). B, identifica-se sinergia do imipeneme (IMP), do ATM, do CCTX e do CTX com o ácido borónico, assim como sinergia do imipeneme com imipeneme + EDTA (IMP EDTA) (sinergia sugestiva de metalo- β -lactamase). (As abreviaturas utilizadas estão mencionadas na Figura 10 e 11).

3.1.3. Confirmação fenotípica de mecanismos de resistência aos carbapenemes

A leitura interpretativa do teste do ertapeneme (Figura 7) permitiu confirmar fenotipicamente alguns dos mecanismos de resistência expressos pelos isolados estudados e, assim, orientar a realização dos testes moleculares.

Dos 22 isolados, aos quais se realizou o teste do ertapeneme, 17 não revelaram sinergia deste antibiótico com o ácido borónico, com o EDTA e com a cloxacilina, logo sugeria a presença de uma ESBL, uma β -lactamase da família OXA-48 (Classe D) ou um outro mecanismo de resistência; outros 4 isolados de *K. pneumoniae* (Kp2, Kp6, Kp7 e Kp8) apresentaram sinergia com o ácido borónico, indicando a produção de uma carbapenemase de classe A (Figura 10A e 11), e 1 (Kp4) apresentou sinergia com o ácido borónico e a cloxacilina sugerindo a produção de AmpC associada a um mecanismo de impermeabilidade por perda de porinas.

No caso do isolado Kp6 (Figura 10 B), ao verificar-se a existência de sinergia do imipeneme + EDTA com o imipeneme, que sugeria a produção de metalo- β -lactamase, este teste, utilizando o ertapeneme, não confirmou a presença dessa família de β -lactamases de classe B, pois revelou ser um falso positivo.

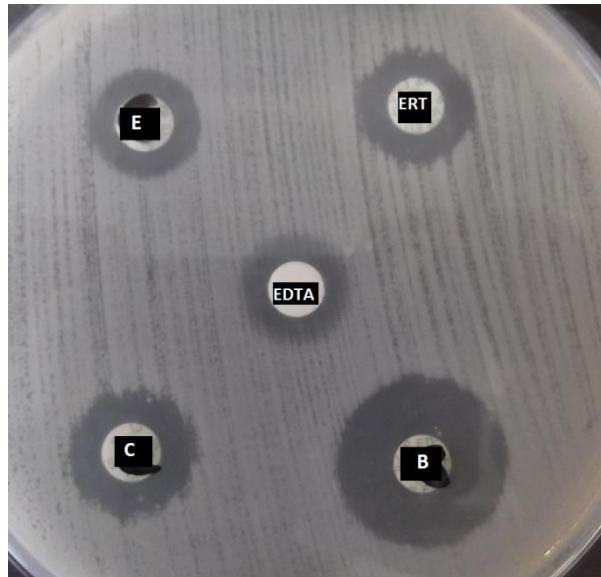


Fig. 11. Teste do ertapeneme (isolado Kp6), detetando-se a sinergia com o ácido borónico (B), indicativo de produção de uma β -lactamase de classe A. E, ertapeneme + EDTA; ERT, ertapeneme; B, ertapeneme + ácido borónico; C, ertapeneme + cloxacilina.

3.2. Caracterização de β -lactamases

3.2.1. Ponto isoeletrico

A focagem isoeletrica permitiu identificar algumas das β -lactamases expressas pelos isolados bacterianos em estudo. Assim, foram detetadas as enzimas da família TEM (pI 5,4) em 15 isolados, SHV (pI 7,6 e 8,2) em 13 isolados, CTX-M (pI 8,9) em 9 isolados, KPC (pI 6,7) em 3 isolados, GES (pI 5,8) num isolado e OXA (pI 7,2) noutra (Tabela 15). Os isolados do género *Enterobacter* (n=6) apresentaram pI entre 8,5 e 9, podendo corresponder à presença de AmpC cromossómica, ubiquitária nestas espécies. Não foi possível classificar as β -lactamases com os pI de 7,2 e 7,8.

Por este método ser apenas qualitativo e nem sempre sensível, foi necessário recorrer ao método molecular PCR para confirmar a presença dos genes que codificam estas enzimas.

Tabela 15. Determinação do ponto isoelétrico de 22 isolados bacterianos com suscetibilidade diminuída ao ertapeneme.

	Identificação	Ponto Isoelétrico	B-lactamase expressa
Kp1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,4; 7,6; 8,9	TEM-tipo, SHV-tipo, CTX-M
Ecan1	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	9	
Ea4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	8,8	
Ea2	<i>Enterobacter aerogenes</i>	8,5	
Eclo3	<i>Enterobacter cloacae</i>	8,8	
Ea5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	8,5	
Ea6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-
Ec1	<i>Escherichia coli</i>	5,4; 8,9	TEM-tipo, CTX-M
Kp2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,4; 6,7; 7,6	TEM-tipo, KPC-tipo, SHV-tipo
Kp12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,4; 7,6; 8,9	TEM-tipo, SHV-tipo, CTX-M-tipo
Kp3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,4; 8,9	TEM-tipo, CTX-M-tipo
Kp4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7,6; <u>7,8</u>	SHV-tipo
Kp13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,4; 7,6; 8,9	TEM-tipo, SHV-tipo, CTX-M-tipo
Kp5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,4; 7,6; 8,9	TEM-tipo, SHV-tipo, CTX-M-tipo
Kp6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,4; 6,7; 7,6	TEM-tipo, KPC-tipo, SHV-tipo
Kp10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,4; 7,6; 8,9	TEM-tipo, SHV-tipo, CTX-M-tipo
Kp7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,4; 5,8; 7,6; 8,2	TEM-tipo, GES-tipo, SHV-tipo
Kp11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,4; 7,6; 8,9	TEM-tipo, SHV-tipo, CTX-M-tipo
Kp14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,4; 7,6; 8,9	TEM-tipo, SHV-tipo, CTX-M-tipo
Kp15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,4; 7,6	TEM-tipo, SHV-tipo, CTX-M-tipo
Kp8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,4; 6,7; 7,6	TEM-tipo, KPC-tipo, SHV-tipo
Kp9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,4; <u>7,2</u> ; 7,4; 8,9	TEM-tipo, OXA-tipo, CTX-M-tipo, SHV-tipo

3.2.2. Perfil genotípico: genes *bla*

Este teste molecular permitiu confirmar a expressão fenotípica e bioquímica das β -lactamases, anteriormente referida. Através do método de PCR foi, assim, possível identificar os perfis genotípicos dos 22 isolados estudados, relativamente a diversas famílias dos genes *bla*.

No que corresponde às β -lactamases de classe A, foram detetados os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} em 15, 14 e 11 isolados, respetivamente, o gene *bla*_{KPC} em 3 isolados e o gene *bla*_{GES} num isolado. O gene *bla*_{SHV} estava presente em todos os isolados de *K. pneumoniae*, correspondendo aos pl 7,6 identificados na focagem isoelétrica (Tabela 15), justificado pelo facto de ser uma β -lactamase ubiquitária desta espécie.

Os resultados obtidos por PCR para o gene *bla*_{TEM} confirmam os resultados da focagem isoelétrica. No entanto, o gene *bla*_{CTX-M}, foi identificado no isolado (Kp15), não tendo sido detetada a enzima CTX-M, pelo método bioquímico, com o pl característico (pl 8,9).

Foi também confirmada, por PCR, a presença dos genes que codificam as enzimas GES e KPC, correspondendo, respetivamente, aos pl 5,8 e 6,7.

No que respeita às β -lactamases de classe B (metalo- β -lactamases), foram pesquisados os genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{NDM}, não tendo sido detetados nos isolados em estudo, confirmando os testes fenotípicos.

Os genes *ampC*, que codificam β -lactamases de classe C, foram também pesquisados nos 22 isolados, tendo-se obtido um resultado positivo, ou seja, a presença do gene *bla*_{MIR-tipo}, no isolado de *E. cloacae* (Eclo3), β -lactamase ubiqüitária nesta espécie. Não se detetou a presença de genes PMA β em nenhum isolado.

O gene *bla*_{OXA-1-tipo}, pertencente às β -lactamases de classe D, foi detetado em 9 amostras, das quais, 8 não foram identificadas pela focagem isoelétrica, isto é, não se detetou um pl correspondente (pl 7,4). Foi também pesquisada a enzima OXA-48, por ser uma β -lactamase em grande expansão no mundo inteiro, no entanto, nenhum isolado possuía o gene que codifica essa β -lactamase.

Após deteção por PCR, a sequenciação permitiu especificar quais os genes expressos nos 22 isolados (Tabela 16). No que diz respeito aos genes da família *bla*_{KPC}, foi identificado o gene *bla*_{KPC-3} em 3 isolados (Kp2, Kp6 e Kp8), na família dos genes *bla*_{GES}, identificou-se o gene *bla*_{GES-5} (Kp7). Na família dos genes *bla*_{TEM} foram identificados os genes *bla*_{TEM-1a} (n=4) e *bla*_{TEM-1b} (n=10).

Foram também identificados os genes parentais *bla*_{SHV-1} (n=5), *bla*_{SHV-11} (n=6), *bla*_{SHV-32} (n=1), *bla*_{SHV-36} (n=1) e o gene *bla*_{ESBL} *bla*_{SHV-12} (n=1).

No que respeita à família de genes *bla*_{CTX-M}, foram identificados 8 isolados com o gene *bla*_{CTX-M-15}.

Tabela 16. Genótipo correspondente às β -lactamases de 22 isolados com suscetibilidade diminuída ao ertapeneme

Genótipo ^a	Nº Isolados (n=22)
<i>bla</i> _{MIR-tipo}	1
<i>bla</i> _{SHV-1} + <i>bla</i> _{OXA-1}	1
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1a}	1
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1b}	1
<i>bla</i> _{TEM-1a} + <i>bla</i> _{SHV-11} + <i>bla</i> _{KPC-3}	2
<i>bla</i> _{TEM-1a} + <i>bla</i> _{SHV-36} + <i>bla</i> _{KPC-3}	1
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1b} + <i>bla</i> _{SHV-1}	1
<i>bla</i> _{TEM-1a} + <i>bla</i> _{SHV-12} + <i>bla</i> _{SHV-1+} + <i>bla</i> _{GES-5}	1
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1b} + <i>bla</i> _{SHV-1} + <i>bla</i> _{OXA-1}	3
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1b} + <i>bla</i> _{SHV-11} + <i>bla</i> _{OXA-1}	4
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-1b} + <i>bla</i> _{SHV-32} + <i>bla</i> _{OXA-1}	1
ND ^a	5

^aNão foi detetado nenhum gene.

3.3. Porinas

3.3.1. Perfil de OMPs por SDS-PAGE

Na Figura 12 apresenta-se o perfil das OMPs dos 22 isolados em estudo, após separação por SDS-PAGE. Como se pode verificar, os isolados de *K. pneumoniae* (Fig. 12 A e B) ou possuem a banda OmpK36 correspondente à OmpK36 da estirpe de referência *K. pneumoniae* (*wild-type*), embora numa posição diferente (ex.: Kp2), ou não possuem essa banda (ex.: Kp4, Kp7, Kp9, Kp12 Kp14 e Kp15). Nos perfis das OMPs dos isolados de *Enterobacter spp.* (Fig.12 C) podemos verificar que as bandas, correspondentes às porinas OmpC (*E. cancerogenus*) e Omp36 (*E. aerogenes*), destes isolados, em relação à estirpe de referência (*wild-type*), se encontravam numa posição diferente, localizando-se um pouco acima (Ecan1, Ea2, Ea4, Ea5 e Ea6). Para o isolado Eclo3 é possível observar duas bandas, aparentemente (fraca visibilidade da banda no gel), na mesma posição da estirpe referência. No que diz respeito ao isolado Ec1, este possui a banda correspondente à porina OmpC um pouco mais acima, quando comparada com a estirpe de referência (*wild-type*).

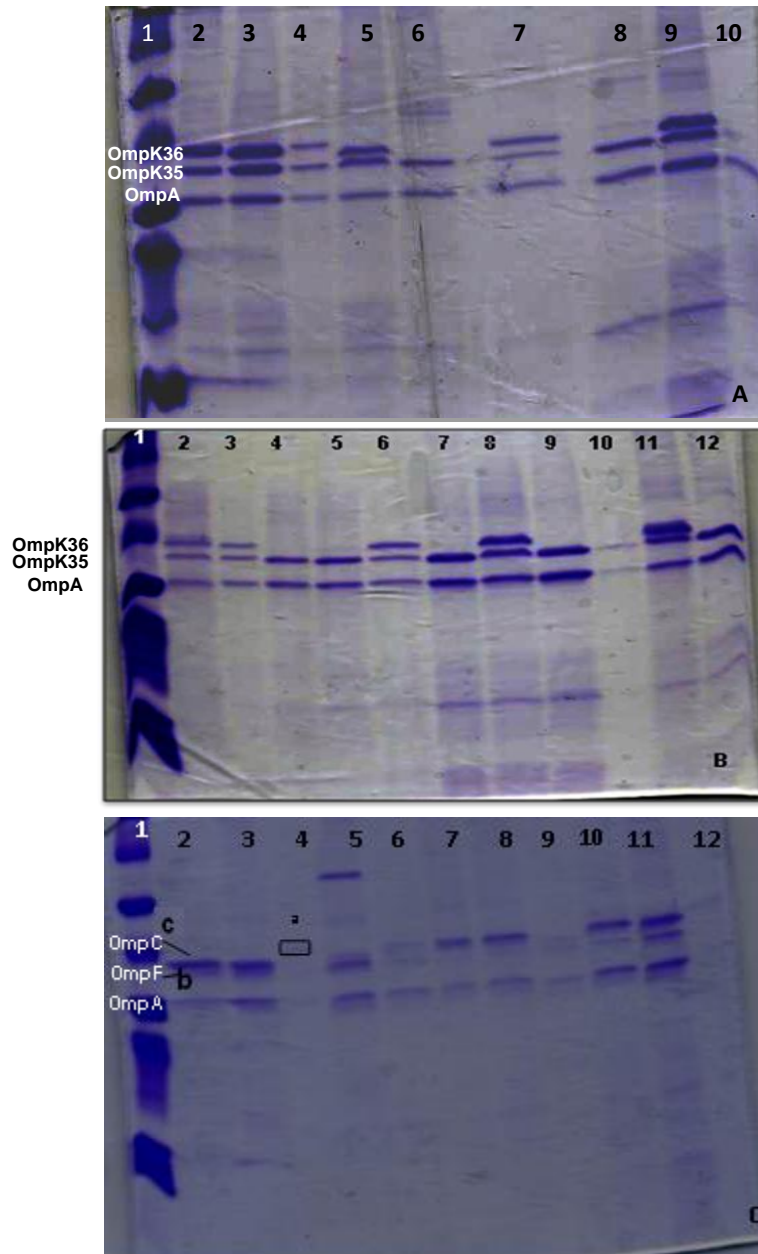


Fig. 12. Perfis de OMPs dos isolados (A e B) de *K. pneumoniae* (Kp1–Kp15) e (C) de *E. coli* (Ec1) e *Enterobacter* spp. Ecan1, isolado de *E. cancerogenus*; Eclo3, *E. cloacae*; Ea2, Ea4, Ea5 e Ea6, *E. aerogenes*. A: 1, marcador de peso molecular; 2, 3, estirpe de referência para *K. pneumoniae* (*wild-type*); 4, Kp1; 5, Kp2; 6, Kp12; 7, Kp3; 8, Kp4; 9, Kp13; 10, Kp5. B: 1, marcador de peso molecular; 2, estirpe de referência para *K. pneumoniae* (*wild-type*); 3, Kp5 (*); 5, Kp6; 6, Kp10; 7, Kp7; 8, Kp11; 9, Kp14; 10, Kp15; 11, Kp8; 12, Kp9. C: 1, marcador de peso molecular; 2, 3, estirpe referência (*wild-type*) para *E. coli*; 4, Ec1; 5, estirpe referência para *Enterobacter* spp (*wild-type*); 6, Ecan1; 7, Ea4; 8 Ea2; 9, Eclo3; 10, Ea5; 11, Ea6; 12, Ec1. (*) Perfil em duplicado na imagem A poço 10 e imagem B poço 3. (**) Perfil do poço 4 e 12 em duplicado na imagem C. (a) banda pouco visível na fotografia; (b) OmpF homóloga de Omp35; (c) OmpC homóloga de Omp36.

3.3.2. Perfil Genotípico: genes *omp*

Foram pesquisados por PCR os genes que codificam as porinas de membrana externa OmpK35, OmpK36 e OmpK37 em *K. pneumoniae*, OmpF e OmpC em *E. coli*, *E. cancerogenus* e *E. cloacae*, e Omp35 e Omp36 em *E. aerogenes*. Não foi detetado nenhum gene no isolado Eclo 3, pertencente à espécie *E. cloacae*, enquanto que em 2 isolados do género *Enterobacter*, Ecan1 e Ea2, foram detetados apenas os genes que codificam as porinas OmpF (*E. cancerogenus*) e Omp35 (*E. aerogenes*). Num isolado foram detetados os genes que codificam as porinas OmpF e OmpC (Ec1), e em Ea4, Ea5 e Ea6 foram detetados os genes das Omp35 e Omp36. Em todos os isolados de *K. pneumoniae* foram detetados os genes que codificam as 3 porinas, OmpK35, OmpK36 e OmpK37 (Tabela 17)

Tabela 17. Genótipo correspondente aos genes que codificam as porinas OmpK35, OmpF, Omp35, OmpK36, OmpC, Omp36 e Ompk37.

Genótipo	Nº Isolados (n=22)	Espécie
OmpF	1	<i>E. cancerogenus</i>
Omp35	1	<i>E. aerogenes</i>
OmpF + OmpC	1	<i>E. coli</i>
Omp35 + Omp36	3	<i>E. aerogenes</i>
OmpK35 + OmpK36 + OmpK37	15	<i>K. pneumoniae</i>
ND ^a	1	<i>E. cloacae</i>

^a ND, não foi detetado nenhum gene que codifica as porinas OmpC e OmpF.

3.3.3. Identificação dos genes *omp* por sequenciação nucleotídica

As sequências nucleotídicas obtidas para o gene *ompk35*, codificando a proteína OmpK35 dos isolados de *K. pneumoniae* foram analisadas através do alinhamento com a sequência nucleotídica da estirpe de referência (*wild-type*) KT755 (GenBank accession nº AJ011501). A sequência aminoacídica, respetiva, levou à identificação de um codão stop no aminoácido Trp229 da OmpK35 da estirpe Kp1, situado numa zona periplasmática daquela porina, e no aminoácido Glu255 da OmpK35 do isolado Kp3 situado na zona do loop L6 (Tabela 18 e 19; Anexo I).

Tabela 18. Alterações identificadas na sequência aminoacídica da porina OmpK35 de isolados de *K. pneumoniae*.

Aa Id.	225	226	227	228	229	229	251*	252*	253*	254*	255*
WT	D	K	A	E	A	W	N	M	T	P	E
Kp1	D	K	A	E	A	STOP	N	M	T	P	E
Kp3	D	K	A	E	A	W	N	M	T	P	STOP
Kp(**)	D	K	A	E	A	W	N	M	T	P	E

WT, *wild-type* (Accession nº AJ011501), com numeração aminoacídica desde o codão de iniciação (Met) Anexo I. STOP, Codão stop; (*), aminoácidos localizados na zona do Loop L6; (**) Isolados de *K. pneumoniae* sem alterações aminoacídicas na OmpK35 (Sequência igual à estirpe *wild-type*):Kp2, Kp4 à Kp15.

Na Tabela 19 e 20 (Anexo II) estão apresentadas as substituições aminoacídicas e deleções encontradas na porina OmpK37 dos isolados de *K. pneumoniae* utilizando a estirpe KpSD8 (GenBank accession nº AJ011502) como referência. Aí se pôde identificar a existência de uma mutação no loop L3 da OmpK37 dos isolados Kp10 e Kp14 (Val118Ala), no loop L5 dos isolados Kp12 e Kp15 (Ser210Phe). Além destas substituições, existem outras nos aminoácidos Ala18Cys, Ala19Agr, His20Ala, Ala21Cys, Ala22Gly e Glu23Gly, sendo as duas últimas já na proteína madura e Gly230Asn, bem como Gln233Met, na cadeia β desta porina. A estas acrescem substituições nos aminoácidos do loop L5 (Glu239Gln), Arg240Thr, Tyr241Asn, Lys243Arg), em β 10 (Asp248Glu) e no loop L6 (Ser278Asn). Detetaram-se ainda deleções nos aminoácidos His234, Tyr235, Thr236 e His237, situados no loop L5 (Kp1, Kp2, Kp3, Kp4, Kp8, Kp9, Kp10 e Kp14) e nos aminoácidos Thr279, Ser280, Ser281, Thr282, Asn283, Gly284, situados na porção β -12 (Kp1, Kp2, Kp3, Kp4, Kp8, Kp9, Kp10 e Kp14).

Na Tabela 19 e 21 (Anexo III) encontram-se as mutações na sequência aminoacídica da porina OmpK36 dos isolados de *K. pneumoniae*, utilizando como referência a estirpe Kp MGH 78578 (GenBank accession nº ABR78053). Destaca-se a inserção, nas OmpK36 dos isolados Kp1 dos aminoácidos Glu, Ser, Asp, Ser, Ile, Ser e Gly entre as posições Glu273 e Pro274, situados no loop L6, e a inserção dos aminoácidos Phe, Thr, Gly, Val e Asn entre as posições Gly309 e Tyr310, situados no loop L7, bem como a inserção do aminoácido Arg (em Kp4) entre as posições Glu308 e Gly309. Foi também identificado um codão stop na sequência aminoacídica da OmpK36 dos seguintes isolados: Kp2, na posição Ala285 (β -12), Kp9, na posição Trp94 (loop L2), Kp12, na posição Leu32 (β 1) e Kp15, na posição Trp125 (loop L3).

Tabela 19. Interpretação das alterações ao nível dos genes que codificam OMPs e respetivas substituições aminoacídicas.

Isolados	Genótipo ^a		
	<i>ompK35</i>	<i>ompK36</i>	<i>ompK37</i>
Kp1	β10: codão stop	loop L4: 3S + deleção 1 aa; β8 e β9: 1S; loop L5: 4S + deleção 1 aa; loop L6: inserção 7 aa + 4S; loop L7: 2S	loop L5: deleção de 4 aa + 6 S; loopL6: deleção de 6 aa + 3 S
Kp2	Sem mutações	β 12: codão stop	loop L5: deleção de 4 aa + 6 S; loop L6: deleção de 6 aa + 3 S
Kp3	Loop L6: codão stop	loop L4: 1S; β13: 1S; loop L8: 1S	loop L5: deleção de 4 aa + 6 S; loopL6: deleção de 6 aa + 3 S
Kp4	Sem mutações	loop L4: 4S + 3 deleções; β8: 1S; T5: 1S; β9: 1S; loop L5: 5S; β11: 1S	loop L5: deleção de 4 aa + 6 S; loop L6: deleção de 6 aa + 3 S
Kp5	Sem mutações	loop L8: 1S	Sem mutações
Kp6	Sem mutações	loop L2 *; loop L4: 1S;	Sem mutações
Kp7	Sem mutações	β 7: mutada	L8: 1S
Kp8	Sem mutações	Sem mutações	loop L5: deleção de 4 aa + 6 S; loop L6: deleção de 6 aa + 3 S
Kp9	Sem mutações	L2: codão stop; loop L6: 1S; loop L7: 1S; loop L8: 3S	loop L5: deleção de 4 aa + 6 S; loop L6: deleção de 6 aa + 3 S
Kp10	Sem mutações	β 2: 1S; loop L4: 1S; loop L8: 1S	loop L3. 1S; loop L5: deleção de 4 aa + 6 S; loop L6: deleção de 6 aa + 3 S
Kp11	Sem mutações	loop L4: 1S; loop L8: 1S	Sem mutações
Kp12	Sem mutações	β 1: codão stop; loop L4: 2S + 1 deleção; β8 e β9: 1S; loop L5: 4S + deleção 1 aa; loop L6: inserção 7 aa + 4S; loop L7: 2S	β 8: 1S
Kp13	Sem mutações	loop L8: 1S	Sem mutações
Kp14	Sem mutações	loop L8: 1S	loop L3. 1S; loopL5: deleção de 4 aa + 6 S; loop L6: deleção de 6 aa + 3 S
Kp15	Sem mutações	loop L3: codão stop; loop L4: 2S + 1 deleção; β8 e β9: 1S; loop L5: 4S + deleção 1 aa; loop L6: inserção 7 aa + 4S; loop L7: 2S	β 8: 1S

Isolado	OmpF	OmpC
Ec1	loop L1:1S; loop L5: 3S; loop L7 1S; β15: 4S; loop L8: 6S	β 1: 1S; loop L1: 2S; loop L3: 1S; loop L4: 5S + deleção de 4aa; β 9: 2S; loop L5: 2S + inserção de 6aa; β13: 1S; loop L7: inserção de 4aa + 1S; β15: 2S
Ecan1	Sem mutações	Não foi possível amplificar
Eclo3	Não foi possível amplificar	Não foi possível amplificar

Isolado	Omp35	Omp36
Ea2	Sem mutações	Não foi possível amplificar
Ea4	Sem mutações	loop L4: 1S; loop L5: 1S + inserção 1 aa
Ea5	Sem mutações	β 2: 1S; loop L4: 1S; loop L5: 1S + inserção 1 aa
Ea6	Sem mutações	Sem mutações

(*): sequência obtida a partir do loop L2; S: substituição aminoacídica.

Tabela 20. Alterações e deleções identificadas na sequência aminoacídica da porina OmpK37 de isolados de *K. pneumoniae*.

Aa id	18	19	20	21	22	23	118	210	230	233	234	235	236	237	239	240	241	243	248	278	279	280	281	282	283	284	285	287	
WT	A	A	H	A	A	E	V	S	G	Q	H	Y	T	H	E	R	Y	K	D	S	T	S	S	T	N	G	G	I	
Kp1									N	M	-	-	-	-	Q	T	N	R	E	N	-	-	-	-	-	-	-	D	V
Kp2									N	M	-	-	-	-	Q	T	N	R	E	N	-	-	-	-	-	-	-	D	V
Kp3	C	R	A	C	G	G			N	M	-	-	-	-	Q	T	N	R	E	N	-	-	-	-	-	-	-	D	V
Kp4	C	R	A	C	G	G			N	M	-	-	-	-	Q	T	N	R	E	N	-	-	-	-	-	-	-	D	V
Kp5																													
Kp6	C	R	A	C	G	G																							
Kp7																													
Kp8									N	M	-	-	-	-	Q	T	N	R	E	N	-	-	-	-	-	-	-	D	V
Kp9	C	R	A	C	G	G			N	M	-	-	-	-	Q	T	N	R	E	N	-	-	-	-	-	-	-	D	V
Kp10			A	C	G	G	A		N	M	-	-	-	-	Q	T	N	R	E	N	-	-	-	-	-	-	-	D	V
Kp11																													
Kp12								F																					
Kp13																													
Kp14	C	R	A	C	G	G	A		N	M	-	-	-	-	Q	T	N	R	E	N	-	-	-	-	-	-	-	D	V
Kp15	C	R	A	C	G	G		F																					

WT, *wild-type* (Accession nº AJ011502), com numeração aminoacídica desde o codão de iniciação (Met) (Anexo II) ; - , Deleção aminoácidos; d₂ Deleção aminoácidos.

Tabela 21. Alterações, inserções e deleções identificadas na sequência aminoacídica da porina OmpK36 de isolados de *K. pneumoniae*.

Aa Id.	32	59	94	125	165	179	183	184	185	186	192	193	194	201	210	221	225	226	227	230	231	232	233	234	258	269	270	271	272	273	+	276	285	294	307	308	+	309	+	315	344	346	349		
WT	L	V	W	W	L	P	A	L	S	P	T	A	L	Y	Y	N	L	G	D	S	K	L	A	L	T	A	G	S	L	G		N	A	R	L	E		G		I	D	S	R		
Kp1						V	T	-			G			F		H	N			R			D	K		F	S	G	H		+1									L	D				
Kp2																																													
Kp3						V																																						H	
Kp4						V		-	-	-	G	W	S	F	W	H	T	D	E		V	P				S																			
Kp5																																												H	
Kp6						V																																							
Kp7					a																																								
Kp8																																													
Kp9			*																																										
Kp10		L				V																																							H
Kp11						V																																							T
Kp12	*					V	T	-			G			F		H	N			R	-		D	K		F	S	G	N		+1												L	E	D
Kp13						V																																							H
Kp14						V																																							H
Kp15				*		V	T	-			G			F		H	N			R	-		D	K		F	S	G	N		+1												L	E	D

WT, *wild-type* (Accession nº ABR 78053), com numeração aminoacídica desde o codão de iniciação (Met) (Anexo III); *, codão stop; a, Alteração no quadro de leitura a partir deste aminoácido; -, Deleção do aminoácido; +1, Inserção dos aminoácidos Glu, Ser, Asp, Ser, Ile, Ser, Gly; +2, inserção do aminoácido Arg; +3, inserção do aminoácido Asn; +4, inserção dos aminoácidos Phe, Thr, Gly, Val, Asn. A cinzento: zonas a cinzento, correspondem a sequências aminoacídicas deduzidas da sequência nucleotídica, embora após o codão stop, assinalado (*).

De referir que, apesar da existência destes codões, que implicam a paragem da síntese da proteína (a partir desse aminoácido), a sequência nucleotídica da porção de aminoácidos não codificada foi obtida; esta deixa prever, em determinados OmpK36, (Kp9, Kp12 e Kp15), uma sequência em aminoácidos com substituições aminoacídicas (como em Kp1 e Kp4:Thr192Gly, entre outros), inserções (como em Kp1) e deleções (como em Kp1 e Kp4) (Tabela 21).

Foi ainda possível identificar a deleção dos aminoácidos Leu184, Ser185 e Pro 186 no isolado Kp4. A deleção do aminoácido Leu184 encontra-se também no isolado Kp1. O isolado Kp7 apresenta uma alteração no quadro de leitura a partir do aminoácido Leu165, situado na zona da cadeia β 7.

Destaca-se também a alteração aminoacídica Pro178Val nos isolados Kp1, Kp3, Kp4, Kp6, Kp10, Kp11, Kp13 e Kp14, a alteração Tyr210Trp (Kp4), Thr258Ser (Kp4), Arg294Cys (Kp3), Leu307Ile (Kp1), Ile315Leu (Kp1), Asp344Glu (Kp1) e Arg349His (Kp3, Kp5, Kp10, Kp13 e Kp14). Outras mutações existem entre o aminoácido Ala183 e Leu272 na OmpK36 de Kp1 e entre o aminoácido Thr192 e Leu232 em Kp4 (Tabela 21).

Na sequência aminoacídica de OmpC do isolado de *E. coli* (Ec1), utilizou-se como referência a estirpe de *E. coli* K12 MG 1655 (GenBank accession nº U00096.3), e observaram-se substituições aminoacídicas, deleções e inserções (Tabela 19 e 22; Anexo IV). Pode-se distinguir a deleção do aminoácido Gly180, Phe181, Thr182 e Ser183 (loop L4) e a inserção dos aminoácidos Asn, Phe, Gly, Leu, Asn e Gly entre Gln228 e Asn229 (loop L5), e dos aminoácidos Gly, Val, Ile e Asn entre Leu306 e Gly307 (loop L7). Sete substituições aminoacídicas foram identificadas já na proteína madura, entre o aminoácido Lys37 e Ser178, seis entre o aminoácido Asn228 e Leu296, uma no aminoácido Gly309, no aminoácido Asp336 e no aminoácido Tyr337. Da posição Ile339 à Thr348 houve mutação em todos os aminoácidos que se situam no loop L8. Das diferentes substituições aminoacídicas destaca-se Gly137Asp pois situa-se no loop L3.

No que respeita à sequência aminoacídica da porina OmpF (Tabela 19 e 23; Anexo V), distingue-se a mutação Asn51Asp (loop L1); Ala223Glu, Gln224Ser e Asn228Lys (loop L5); Glu305Asp (loop L7). De Asp 33 a Asp342 houve mutações em todos os aminoácidos que se situam no fim da porção β 15 e início do loop L8.

Para o isolado de *E. cancerogenus* (Ecan1) foi apenas detetado o gene que codifica a porina OmpF, não revelando mutações na sequência nucleotídica obtida,

quando comparada com a estirpe referência ATCC 35316 (GenBank Accession nº GG704863.1.)

No isolado de *E. cloacae* (*Eclo3*) não foram detetados os genes que codificam as porinas OmpF e OmpC.

Os isolados Ea4, Ea5 e Ea6, pertencentes à espécie *E. aerogenes*, apresentaram resultados positivos para os genes que codificam as porinas Omp35 e Omp36; no entanto, não foi possível obter amplificação por PCR para a porina Omp36 do isolado Ea2. Quando se comparou a sequência aminoacídica da estirpe referência KCTC 2190 (GenBank Accession nº CP002824.1), com as sequências, respetivas, dos isolados não foram detetadas mutações na Omp35, tendo, no entanto, sido detetadas na Omp36 (Tabela 19 e 24; Anexo VI). O isolado Ea6 não apresentou qualquer mutação na Omp36.

A sequência aminoacídica da Omp36 de Ea4 apresenta substituições do resíduo Asp189Gly, Phe190Tyr (loop L4). Existem várias mutações no loop L5 de Asn227Ser a Gly240Arg. No entanto, entre Asn227 e Ser228, existe a inserção de um resíduo valina. Em relação ao isolado Ea5 apresenta, a substituição Ile59Val e as mesmas substituições que Omp36 do isolado Ea4, no aminoácido 189 e do aminoácido 227 ao 240 bem como a mesma inserção.

Os resultados do fenótipo e genótipo das OMPs dos 22 isolados em estudo, que acabámos de detalhar, encontram-se resumidos na Tabela 25. Aí se resume também o perfil de suscetibilidade aos antibióticos testados, bem como os mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, por produção de β -lactamases, e de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos, que passamos a falar de seguida (alínea 3.2.3).

Tabela 22. Alterações, inserções e deleções identificadas na sequência aminoacídica da porina OmpC de isolados de *E. coli*

Aa Id.	37	49	50	137*	176	177	178	181	182	183	184	186	192	216	218	226	227	+	+	+	+	+	+	228	239	230	231	233	296	306	+	+	+	+	307	309	336	337	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348
WT	K	D	V	G	N	P	S	G	F	T	S	V	D	G	I	A	Q							N	T	A	A	I	L	L					G	G	D	Y	I	N	L	L	D	D	N	Q	F	T
Ec1	E	S	E	D	S	V	D	-	-	-	-	M	G	A	V	D	Q	N	F	G	L	N	G	Y	G	E	R	L	V	L	G	V	I	N	G	N	T	T	S	T	C	W	T	T	T	A	S	P

WT, *wild-type* (Accession nº U00096.3), com numeração aminoacídica desde o codão de iniciação (Met) (Anexo IV);*, loop L3; -, deleção de aminoácido; +, inserção de um aminoácido.

Tabela 23. Alterações, inserções e deleções identificadas na sequência aminoacídica da porina OmpF de isolados de *E. coli*.

Aa Id.	51	223	224	228	305	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342
WT	N	A	Q	N	E	D	Y	I	I	N	Q	I	D	S	D
Ec1	D	E	S	K	D	T	T	S	S	T	R	S	I	R	Q

WT, *wild-type* (Accession nº U00096.3), numeração aminoacídica desde o codão de iniciação (Met) (Anexo V).

Tabela 24. Inserções identificadas na sequência aminoacídica da porina Omp36 de isolados de isolados de *E. aerogenes*.

Aa Id.	59	189	190	227	+	228	230	231	232	233	234	235	237	238	239	240
WT	I	D	F	N		S	F	V	S	K	T	D	G	R	Y	G
Ea4		G	Y	S	V	N	R	Y	T	D	S	N	V	S	R	R
Ea5	V	G		S	V	N	R	Y	L	D	S	N	V	S	R	R
Ea6																

WT, *wild-type* (Accession nº CP002824.1), numeração aminoacídica desde o codão de iniciação (Met) (Anexo VI); +, inserção de um aminoácido. Ea6, não revela qualquer alteração aminoacídica.

Tabela 25. Perfil de suscetibilidade aos antibióticos, em 22 isolados, e respectivos mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos (produção de β -lactamases e alteração de porinas) e quinolonas (determinantes PMQR).

Isolado	Perfil de suscetibilidade diminuída a:				Porinas (OMPs)			β -lactamases	PMQR	Hospital			
	Carb.	Q	C	Outros	Fenótipo ^a						Genótipo ^b		
					OmpK35	OmpK36	OmpA				ompK35	ompK36	ompK37
Kp1	E ^R ; M ^I	N ^I , O ^I , R ^R , I ^R	/	P; F; V; C2G; C3G; Z; G; S; U, A	+	+	+	STOP	I + D + M	D + M	CTX-M-15/SHV-1/TEM-1b	QnrB1	B
Kp2	E ^R ; M ^I	N ^R , O ^R , R ^R , I ^R	/	P; F; V; H; C3G; A; Z; K; G; S; U	+	+<	+	SM	STOP	D + M	KPC-3/SHV-11/TEM-1 ^a	Aac(6')-Ib	D
Kp3	E ^R ; M ^I	N ^R , O ^R , R ^R , I ^R	S	P; F; V; C2G; C3G; A; Z; K; S; U	+	+	+	STOP	3M	D + M	CTX-M-15/TEM-1a	Aac(6')-Ib/OqxAB	H
Kp4	E ^R	N ^R , O ^R , R ^R , I ^R	/	P; F; V; C2G; CRG; Z; K; S; U	+	-	+	SM	I + D + M	D + M	SHV-1/OXA-1	Aac(6')-Ib	H
Kp5	E ^I	R ^R , I ^R	/	P; F; V; C2G; C3G; A; Z; K; G; S	+	+	+	SM	1M	SM	TEM-1b/SHV-1/CTX-M-15/OXA-1	Aac(6')-Ib-cr/QnrB1	O
Kp6	E ^R ; I ^R ; M ^R	R ^R	R	P; F; V; C2G; C3G; A; Z; K; G; S	+	-	+	SM	1M	6M	KPC-3/SHV-36/TEM-1a	OqxAB/Aac(6')-Ib	L
Kp7	E ^R ; I ^R ; M ^R	N ^R , O ^R , R ^R , I ^R	R	P; F; V; C2G; C3G; A; Z; K; G; J; S; U	+	-	+	SM	Disf	SM	GES-5/SHV-12/SHV-1/TEM-1a	OqxAB/Aac(6')-Ib	I
Kp8	E ^R ; I ^I ; M ^I	N ^R , O ^R , R ^R , I ^R	/	P; F; V; C2G; C3G; A; Z; K; G; S; U	+	+	+	SM	SM	D + M	KPC-3/SHV-11/TEM-1 ^a	Aac(6')-Ib	D
Kp9	E ^R ; M ^I	N ^I , O ^I , R ^R , I ^R	/	P; F; V; C2G; C3G; A; Z; K; G; S; U	+	-	+	SM	STOP	D + M	OXA-1/CTX-M-15/SHV-32/TEM-1b	Aac(6')-Ib-cr/QnrB1	G
Kp10	E ^I	N ^R , O ^R , R ^R , I ^R	R	P; F; V; H; C3G; A; Z; K; G; S	+	+	+	SM	3M	D + M	OXA-1/CTX-M-15/SHV-1/TEM-1b	OqxAB/Aac(6')-Ib-cr	A
Kp11	E ^I	N ^R , O ^R , R ^R , I ^R	R	P; F; V; H; C3G; A; Z; K; G; S	+	+	+	SM	2M	SM	OXA-1/CTX-M-15/SHV-11/TEM-1b	QnrB1/OqxAB /Aac(6')-Ib-cr	H

Tabela 25 (continuação). Perfil de suscetibilidade aos antibióticos, em 22 isolados, e respectivos mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos (produção de β -lactamases e alteração de porinas) e quinolonas (determinantes PMQR).

Kp12	E ^R	N ^R , O ^R , R ^R , I ^R	/	P; F; V; C2G; C3G; A; Z; K; G; S; U	+ - +	SM	STOP	1M	OXA-1/CTX-M-15/SHV-11/TEM-1b	Aac(6')-Ib-cr	R
Kp13	E ^R	N ^R , O ^R , R ^R , I ^R	R	P; F; V; C2G; C3G; A; Z; K; G; S; U	+ + +	SM	2M	SM	OXA-1/CTX-M-15/SHV-11/TEM-1b	QnrB1/OqxAB/ Aac(6')-Ib-cr	H
Kp14	E ^R	N ^R , O ^R , R ^R , I ^R	S	P; F; V; C2G; C3G; A; Z; K; G; S; U	+ - +	SM	2M	D + M	OXA-1/CTX-M-15/SHV-1/TEM-1b	Aac(6')-Ib-cr/OqxAB	D
Kp15	E ^R ;	N ^R , O ^R , R ^R , I ^R	/	P; F; V; C2G; C3G; A; Z; K; G; S; U	+ - +	SM	STOP	M	OXA-1/CTX-M-15~/SHV-11/TEM-1b	Aac(6')-Ib-cr/QnrB1	D
Isolado	Carb.	Q	C		OmpF OmpC OmpA	OmpF	OmpC	/	B-lactamases	PMQR	HOSP.
Ec1	E ^R	N ^R , O ^R , R ^R , I ^R	/	X; T; L; F; C2G; C3G; A; Z	+ +> +	M	D + M	/	TEM-1b/CTX-M-15	-	D
Ecan1	E ^I ;		/	P; F; V; C2G; C3G; Z	+ +> +	SM	-	/	-	-	H
Ec1o3	E ^R		/	P; F; V; C2G; C3G; Z	+ + +	-	-	/	ACT	-	H
Isolado	Carb.	Q	C		Omp35 Omp36 OmpA	Omp35	Omp36	/	B-lactamases	PMQR	HOSP.
Ea2	E ^I		/	P; F; V; C2G; C3G; Z	+ +> +	SM	-	/	-	-	H
Ea4	E ^I		/	P; F; V; C2G; C3G; Z	+ +> +	SM	I	/	-	Aac(6')-Ib-cr	H
Ea5	E ^I ;		/	P; F; V; C2G; C3G; Z; U	+ +> +	SM	I + M	/	-	-	H
Ea6	E ^R	R ^I	/	X; T; F; V; C2G; C3G (W ^S); U	+ +> +	SM	SM	/	-	Aac(6')-Ib-cr	H

^a, obtido por SDS-PAGE, sendo detetada a OmpA, OmpK35, OmpK36, OmpC, OmpF, Omp35 e Omp36, a OmpK37 não é detetada;

^b, obtido por PCR e sequenciação: detecção de Omp35, Omp36, OmpC, OmpF, OmpK35, OmpK36 e OmpK37. As mutações, deleções e inserções estão especificadas nas Tabelas 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24.

Stop, Codão stop; M, Mutação; I, Inserção; D, Deleção; S, suscetível; R, resistente; I, intermédio; /, não realizado; -, não detetado; +, detetada; +>, banda com tamanho molecular superior à banda da estirpe referência; +<, banda com tamanho inferior à banda da estirpe referência; SM, sem mutações; Disf., alteração no quadro de leitura; A, cefepime; B, cefpodoxima; C, cloranfenicol; Carb., carbapenemes; C2G, cefalosporinas de 2ª geração; C3G, cefalosporinas de 3ª geração; D, ácido nalidíxico; E, ertapeneme; F, cefalotina; G, gentamicina; H, cefuroxima; I, imipeneme; J, amicacina; K, kanamicina; L, piperacilina; M, meropeneme; N, ciprofloxacina; O, pefloxacina; P, penicilinas; Q, quinolonas; R, norfloxacina; S, trimetoprim; T, Ticarcilina; U, nitrofuranos; V, amoxicilina+ ácido clavulânico; W, cefotaxima; X, amoxicilina; Z, aztreoname. Kp1-Kp15, *K. pneumoniae*; Ec1, *E. coli*; Ecan1, *E. cancerogenus*; Ea2-Ea6, *E. aerogenes*; Ec1o3, *E. cloacae*.

3.4. Mecanismos de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos

Efetuiu-se a detecção e identificação de mecanismos de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos (PMQR) por métodos moleculares. Para a bomba de efluxo OqxAB, relacionou-se com a suscetibilidade ao cloranfenicol.

3.4.1. Suscetibilidade ao cloranfenicol e às quinolonas

O teste de suscetibilidade ao cloranfenicol foi realizado apenas nos isolados que expressavam a bomba de efluxo OqxAB, de modo a compreender se este mecanismo de resistência afetava a suscetibilidade àquele antibiótico. Dos 7 isolados com OqxAB, 5 eram resistentes ao cloranfenicol (Kp6, Kp7 Kp10, Kp11 e Kp13) e 2 (Kp3 e Kp14) eram suscetíveis (Tabela 25). No que respeita ao ácido nalidíxico (quinolonas) e às fluoroquinolonas ensaiadas, pode observar-se que, dos 22 isolados, 10 eram resistentes às 4 quinolonas/fluoroquinolonas estudadas (isolados de *K. pneumoniae*) e 5 (*Enterobacter spp.*) eram suscetíveis aos mesmos antibióticos.

3.4.2. Isolados PMQR positivos

Para a análise molecular da resistência às quinolonas/fluoroquinolonas foram pesquisados os genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib*, *qepA*, bem como o operão *OqxAB*. Assim, foi detetado o gene *qnrB* em 6 isolados, o gene *aac(6')-Ib* em 16 e o operão *oqxAB* em 7 (Tabela 25).

Foram sequenciados todos os genes amplificados por PCR: *oqxAB*, *aac(6')-Ib* e *qnrB*. Dos 16 genes *aac(6')-Ib* encontrados nos isolados em estudo, 10 pertenciam à variante *aac(6')-Ib-cr* (Kp5, Kp9, Kp10, Kp11, Kp12, Kp13, Kp14, Kp15, Ea4 e Ea6), identificados pela substituição de uma base nas posições T304C e G535T (Figura 13). A sequenciação dos genes *qnrB* permitiu identificar a variante *qnrB-1* (Kp1, Kp5, Kp9, Kp11, Kp13 e Kp15) (Tabela 25).



Fig. 13. Alinhamento das sequências dos genes *aac(6)-lb-cr* e *aac(6)-lb*, onde se encontram, marcadas a vermelho, as duas mutações que caracterizam o gene *aac(6)-lb-cr*.

No que diz respeito aos fragmentos dos genes *oqxA* e *oqxB* (amplificados), que codificam a bomba de efluxo OqxAB, pertencente à família RND, verificou-se que as suas sequências evidenciavam uma homologia de 98,9% quando comparadas com a estirpe de referência *K. pneumoniae* MGH 78578 (GenBank accession nº CP000647) (Figura 14). Estes fragmentos situam-se entre os nucleótidos 950 e 1176, do gene *oqxA*, e entre os nucleótidos 1220 e 1780 do gene *oqxB*.

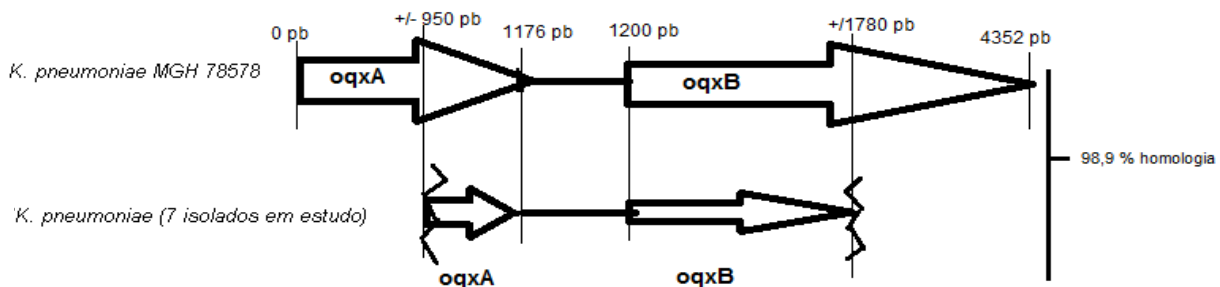


Fig. 14. Esquema representativo do alinhamento da sequência nucleotídica dos genes *oqxA* e *oqxB* (e respetivas posições nucleotídicas) de 7 isolados estudados e da estirpe de referência *K. pneumoniae* MGH78578.

3.5. Suporte genético de genes de resistência

3.5.1. Transferência plasmídica de genes de resistência

A conjugação das estirpes produtoras de KPC foi realizada com sucesso. Este ensaio efetuou-se com a estirpe recetora C600 *Rif^R* para os isolados Kp2 e Kp8, resultando no transformante Kp2B e Kp8C, respetivamente, e com a estirpe recetora J₅₃AzNa^R, para o isolado Kp6, obtendo-se o transformante Kp6A. Para a estirpe Kp7, produtora de GES, não foi obtido qualquer transconjugante. Para confirmar a passagem dos genes *bla_{KPC}* para as estirpes recetoras, pesquisou-se a sua presença nos trasconjugantes, por PCR. Assim, identificou-se o gene *bla_{KPC}*, mas também o gene *bla_{TEM}*, não tendo, no entanto, sido transferido o gene *bla_{SHV}* (cromossómico em *K. pneumoniae*). Os genes que codificam a bomba de efluxo OqxAB não foram detetados nos transformantes, sugerindo que não se encontravam no plasmídeo.

Foi realizado também um TSA aos transformantes para comparar os seus perfis fenotípicos com os dos isolados (Tabela 26). No geral, são idênticos, realçando-se as seguintes exceções: imipeneme para o qual a estirpe Kp2 era suscetível e a estirpe Kp2B era não suscetível; cefoxitina para o qual a estirpe Kp8 era não suscetível e a estirpe Kp8C sensível; suscetibilidade dos transformantes às quinolonas/fluoroquinolonas, ao contrário dos isolados; amicacina, para a qual os isolados eram suscetíveis e os transconjugantes não; nitrofuranos e meropeneme para os quais os isolados eram resistentes e os transconjugantes não.

Para o isolado Kp6 os resultados foram ligeiramente diferentes: esta era não suscetível à norfloxacina e aos nitrofuranos, enquanto o transconjugante era suscetível; era suscetível à colistina e o transconjugante era resistente.

3.4.1. Localização plasmídica/cromossómica dos genes de resistência

A restrição do DNA cromossómico com a enzima I-CeuI foi utilizada para confirmar a localização dos genes que codificam as carbapenemases e que codificam a bomba de efluxo OqxAB.

Para garantir que a enzima I-CeuI funcionou e que a extração de DNA, a partir das bandas do gel de PFGE, correu de acordo com o esperado, realizou-se um PCR para a pesquisa dos genes que codificam a enzima SHV, pois esta é cromossómica de *K. pneumoniae*.

Tabela 26. Perfil de suscetibilidade aos 32 antibióticos estudados dos isolados clínicos e seus transconjugantes.

Estirpes		Kp2	Kp2B	Kp6	Kp6A	Kp8	Kp8C
Antibióticos							
Antibióticos β - lactâmicos	Amoxicilina	R	R	R	R	R	R
	AMC	R	R	R	R	R	R
	Ticarcilina	R	R	R	R	R	R
	Piperacilina	R	R	R	R	R	R
	TZP	R	R	R	R	R	R
	Cefalotina	R	R	R	R	R	R
	Cefuroxima	R	R	R	R	R	R
	Cefoxitina	S	S	R	I	I	S
	Ceftazidima	R	R	R	R	R	R
	Cefotaxima	R	R	R	R	R	R
	Ceftriaxona	R	R	R	R	R	R
	Cefpodoxima	R	R	R	R	R	R
	Cefepima	I	R	R	R	R	R
	Cefixima	R	R	R	R	R	R
	Aztreoname	R	R	R	R	R	R
	Ertapeneme	R	R	R	R	R	R
Imipeneme	S	I	R	I	I	I	
Meropeneme	I	S	R	I	I	S	
Quinolonas	Ác. nalidíxico	R	S	S	S	R	S
	Norfloxacina	R	S	I	S	R	S
	Pefloxacina	R	S	S	S	R	S
	Ciprofloxacina	R	S	S	S	R	S
Aminoglicosídeos.	Kanamicina	R	R	R	R	R	R
	Gentamicina	I	R	R	I	I	R
	Amicacina	S	R	R	S	S	R
Outros	Colistina	S	S	S	R	S	S
	Fosfomicina	S	S	S	S	S	S
	Nitrofuranos	R	S	R	S	R	S
	Trimetoprim	R	R	R	R	R	R

R, resistente; I, Intermédio; S, suscetível; AMC, amoxicilina + ácido clavulânico; TZP, piperacilina + tazobactame

Como expectável, obteve-se um resultado positivo para o gene *bla*_{SHV}, confirmando a sua localização no cromossoma, mas o resultado dos PCRs para os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{GES} e *bla*_{TEM} foi negativo, indicando que estes não se encontravam no cromossoma (Tabela 27).

No que diz respeito aos genes *oqxA* e *oqxB* também se obtiveram resultados negativos, nos respetivos PCR, o que indica, que se encontravam em plasmídeos não conjugáveis, visto que estes genes também não foram detetados nos transformantes (Tabela 27).

Tabela 27. Caracterização dos isolados clínicos e seus transconjugantes.

Estirpes	PCR				I-Ceul					PBRT
	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>oqxAB</i>	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{GES}	<i>oqxAB</i>	
Kp2	+	+	+	+	-	+	-	-	-	N
Kp2B	+	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	
Kp6	+	+	+	+	-	+	-	-	-	FII + N
Kp6A	+	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	
Kp8	+	+	+	+	-	+	-	-	-	
Kp8C	+	-	+	-	nd	nd	nd	nd	nd	

+, positivo; -, negativo; nd, não determinado.

3.4.2. Caracterização de plasmídeos

Com a técnica de tipagem dos plasmídeos por grupos incompatibilidade, foi possível identificar quais os plasmídeos presentes nos três transconjugante e respetivos isolados (Kp2, Kp2B, Kp6, Kp6A, Kp8 e Kp8C) (Tabela 27) em estudo. Num isolado, produtor de KPC, foi encontrado o plasmídeo do tipo N (Kp2), mas não no seu transconjugante; de igual forma, noutra isolado, também produtor de KPC, foram encontrados os plasmídeos FII e N (Kp6), mas não foram também detetados na estirpe transconjugante.

No entanto, do isolado Kp8 e do respetivo transconjugante (Kp8C) não foi possível classificar qualquer plasmídeo pertencente aos grupos de incompatibilidade por PBRT, portanto não se exclui a possibilidade de existirem plasmídeos não tipáveis nestas estirpes, bem como em Kp2 e Kp6 (e respetivos transconjugante).

3.5. Ambiente genético do gene *bla*_{KPC}

Ao sequenciar o ambiente genético do gene *bla*_{KPC-3} dos isolados Kp2, Kp6 e Kp8 foi identificado o transposição Tn3-like Tn4401 com uma deleção de 68 nucleótidos a montante do gene *bla*_{KPC}, na zona do promotor.

3.6. Determinação da clonalidade e diversidade genómica

A clonalidade entre os isolados de *K. pneumoniae* foi estudada recorrendo ao método de PFGE, o qual estabelece a relação genética entre o DNA genómico dos mesmos. Os resultados estão ilustrados na Figura 15. Foram identificados 4 clones, existindo 100% de homologia, entre os isolados do cluster KpIII (100% de relação genética), provenientes do mesmo doente. O cluster KpII inclui dois isolados produtores de KPC, provenientes do mesmo hospital, tendo uma relação genética inferior ao anterior, de

88% (88% de homologia). O clone KpIV é interessante pois os isolados partilham 94% de homologia e, no entanto, provêm de hospitais situados em diferentes zonas do país. No clone KpI os isolados partilham 83% de homologia genética.

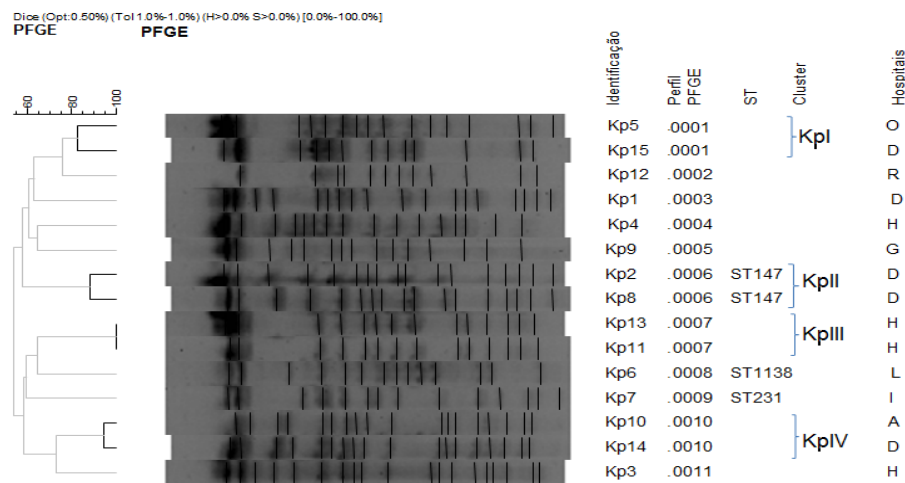


Fig. 15. Representação do PFGE.

A diversidade genómica dos isolados de *K. Pneumoniae* produtores de GES-5 e KPC-3, foi analisada por MLST. Os ST obtidos foram identificados recorrendo ao *Institut Pasteur MLST Databases* (www.pasteur.fr/mlst). Os isolados Kp2 e Kp8 foram identificados com o ST147, Kp7 com o ST231 e Kp6 com o ST1138. Este ST foi descrito pela primeira vez neste trabalho e deriva do ST26, como está ilustrado na Figura 16.

O isolado Ec1 foi identificado com o ST131, recorrendo ao *MLST Databases* (ERI, University College Cork <http://mlst.ucc.ie/>).

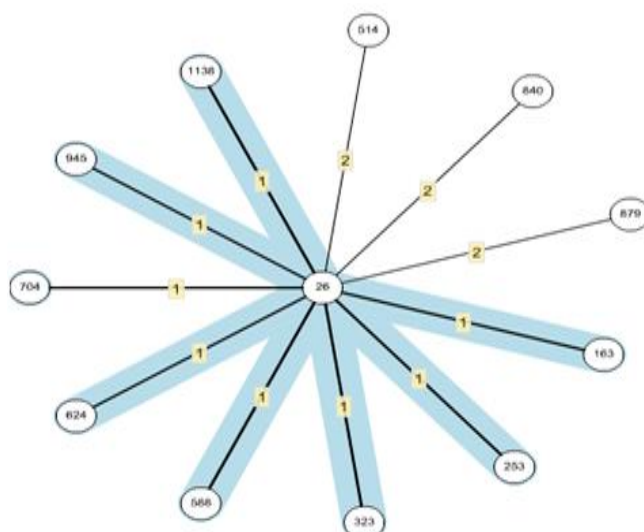


Fig. 16. Ilustração da filogenia do ST1138

4. Discussão

As *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro alargado (ESBL) contribuem em grande escala para o problema da resistência aos antibióticos em bactérias de Gram negativo. Os antibióticos pertencentes à classe dos carbapenemes surgiram como uma alternativa de tratamento, no entanto, são cada vez mais frequentes os casos de isolados clínicos resistentes a esta classe reduzindo aquelas opções de tratamento (Teo et al, 2012). Foi também detetado um aumento de estirpes de *K. pneumoniae* e *E. coli* resistentes apenas ao ertapeneme, mas não aos outros carbapenemes (meropeneme e imipeneme), o que pode ser explicado pelo uso intensivo do ertapeneme como tratamento alternativo em infeções causadas por isolados com multirresistência aos antibióticos (Teo et al, 2012). A suscetibilidade diminuída apenas ao ertapeneme foi verificada também neste estudo, onde 15 dos 22 isolados com aquele perfil de suscetibilidade eram suscetíveis ao meropeneme e imipeneme.

Tendo em vista a avaliação da emergência da resistência aos carbapenemes, elaborou-se a pesquisa de suscetibilidade diminuída àqueles antibióticos em 426 isolados, provenientes de várias regiões (hospitais) de Portugal. Deste modo, foram selecionados e retidos 22 isolados para o estudo subsequente, pois apresentavam suscetibilidade diminuída ao ertapeneme (5%). Nestes foram analisados os mecanismos envolvidos na resistência aos carbapenemes e às quinolonas/fluoroquinolonas, os quais não estão suficientemente esclarecidos.

Através de testes fenotípicos, bioquímicos e moleculares foi possível efetuar aquela análise e contribuir para a compreensão daqueles mecanismos.

Como foi referido anteriormente, a produção de ESBL e carbapenemases por bactérias de Gram negativo constitui uma forte ameaça à saúde pública, assim, o estudo deste mecanismo de resistência, neste trabalho, é de maior relevância.

Da amostra estudada (n=22), 11 isolados apresentaram produção de ESBL (CTX-M-15 e SHV-12) (dez isolados de *K. pneumoniae* e um de *E. coli*), 4 apresentaram produção de carbapenemases (três isolados de KPC-3 e um de GES-5), todos eles pertencentes à espécie *K. pneumoniae*, mostrando que os isolados de *K. pneumoniae*

produtores de ESBL se mantêm em Portugal, uma vez que em estudos prévios já existiam numa frequência elevada (Mendonça et al. 2009). Na realidade, Portugal tem, uma das taxas de ESBL mais altas da Europa (Machado et al, 2007).

Como tem sido descrito em Portugal (Manageiro et al, 2012a, Machado et al, 2007) e na Europa (Coque et al, 2008b), as estirpes produtoras de ESBL co-expressam, com frequência, outras β -lactamases de espectro reduzido. Também neste estudo, as estirpes produtoras de ESBL expressam, concomitantemente, outras enzimas, nomeadamente β -lactamases parentais, como: TEM-1a, TEM-1b, SHV-1, SHV-11, SHV-32 e OXA-1.

No que se refere às carbapenemases, estas têm-se disseminado entre as *Enterobacteriaceae*, nos últimos 10 anos (Nordmann et al, 2011a). A enzima KPC é a mais comum e, desde o seu aparecimento, em 1996, tem-se propagado por todo o mundo, e Portugal não foi exceção. A produção desta carbapenemase tem sido maioritariamente descrita na espécie *K. pneumoniae* (Nordmann et al, 2011a), tal como os 3 isolados produtores de KPC, deste estudo, que pertencem também a esta espécie. Ao estudar o ambiente genético de um dos isolados com o gene *bla*_{KPC}, foi possível identificar o transposão *Tn4401*, na isoforma contendo uma deleção de -68 bp a montante do gene, sendo este um elemento genético móvel importante na disseminação desta β -lactamase, por todo o mundo (Cuzon et al, 2011).

Na conjugação, realizada às estirpes produtoras desta enzima, foi observada a co-existência, no plasmídeo, do gene *bla*_{TEM-1} e *bla*_{KPC-3}. Este mesmo caso já tinha sido reportado por Leavitt et al (2010b), em Israel, numa estirpe de *K. pneumoniae* produtora de KPC-3, sendo o gene que codifica aquela enzima, veiculado por um plasmídeo.

Neste trabalho foi apenas identificado um isolado produtor de GES, pertencente ao tipo 5. Expressava, conjuntamente, a ESBL SHV-12. Em 2004, na Coreia, foi detetado um surto de *K. pneumoniae* produtora destas duas enzimas, em simultâneo (Jeong et al, 2005). A carbapenemase GES-5 foi detetada, em primeiro lugar, na Grécia e, desde então, tem sido reportada no Brasil, China e Coreia (Naas et al, 2008) e, em Portugal, foi descrita, pela primeira vez, em ambiente aquático, por Manageiro et al (2013). A nosso conhecimento, após pesquisa bibliográfica, podemos concluir que a expressão simultânea de GES-5 e SHV-12 foi descrita, neste trabalho, pela primeira vez em Portugal.

A β -lactamase OXA-48, também da classe das carbapenemases, foi descrita pela primeira vez em Istambul, tendo-se disseminado rapidamente por vários países mediterrânicos (Poirel et al, 2012). Em Portugal, já foi descrita num isolado de *A. baumannii* (Gonçalves et al, 2013). No entanto, em *K. pneumoniae* não há estudos que indiquem a sua presença no nosso país. Assim, neste trabalho, a enzima OXA-48 foi pesquisada numa amostra aleatória de 106 isolados, incluindo os 22 não suscetíveis ao ertapeneme, não se tendo obtido qualquer resultado positivo.

Dos 153 isolados de *E. coli* do presente estudo, apenas um foi selecionado (0,7%) por apresentar suscetibilidade diminuída ao ertapeneme, o que reflete o panorama europeu, pois num estudo realizado na Europa, apenas 0,2 % dos isolados de *E. coli* são resistentes ao ertapeneme (Hawser et al, 2011). O mesmo estudo revela que a enzima OXA-48 é emergente nesta espécie, no entanto, não foi detetada neste isolado. Contrariamente, encontrou-se uma frequência consideravelmente superior (6%, 15/249) de isolados de *K. pneumoniae* com aquele fenótipo.

A presença de carbapenemases, por si, justifica o fenótipo de não suscetibilidade ao ertapeneme encontrado nos 3 (em 22) isolados produtores de KPC e num produtor de GES, o que não se verifica nos restantes 18 isolados. Destes 18, 11 eram produtores de ESBL, não justificando aquele fenótipo.

A resistência aos carbapenemes surge, nas bactérias não produtoras de carbapenemases, quando há presença de ESBL ou β -lactamases de classe C em associação com alterações nas proteínas de membrana, porinas, ou quando surge um aumento da atividade das bombas de efluxo, reduzindo a acumulação de antibiótico dentro da célula (Doumith et al, 2009). Com o intuito de caracterizar o mecanismo de resistência ao ertapeneme foi pesquisada fenotípica e genotipicamente a presença das porinas OmpK35, OmpK36 e OmpK37 em *K. pneumoniae*, das porinas OmpC e OmpF em *E. coli* e *Enterobacter spp* e de Omp35 e Omp36 em *E. aerogenes*.

No isolado pertencente à espécie *E. cloacae* (Eclo3) não se detetou a presença dos genes que codificam aquelas porinas, no entanto, por SDS-PAGE, observaram-se as duas bandas correspondentes às porinas OmpC e OmpF e a banda correspondente à porina OmpA. A razão para os genes que codificam estas porinas não terem sido amplificados por PCR, pode dever-se à existência de uma mutação na zona de hibridação do *primer*, podendo, assim, justificar a suscetibilidade diminuída ao ertapeneme. Em dois isolados, pertencentes às espécies *E. cancerogenus* (Ecan1) e *E. aerogenes* (Ea2) não foram detetados, por PCR, os genes *ompC* e *omp36*, respetivamente, tendo sido detetadas por SDS-PAGE a banda correspondente à

porina OmpC (*E. cancerogenus*) e à porina Omp36 (*E. aerogenes*). Porém, estas bandas têm um tamanho ligeiramente superior, quando comparadas à estirpe de referência, o que pode ser justificado pela presença de uma inserção na zona de hibridação do *primer*, impedindo a amplificação e, também, neste caso, podendo estar na origem do perfil de suscetibilidade diminuída ao ertapeneme. Cornaglia et al (1995) referiu a importância da perda destas porinas em *Enterobacter spp.* Nos isolados Ea4 e Ea5, pertencentes à espécie *E. aerogenes*, foram detetadas mutações e inserções na porina Omp36. As bandas correspondentes a estas duas porinas, foram observadas por SDS-PAGE; no entanto, a banda da porina Omp36 encontra-se numa posição superior, revelando um peso molecular maior, justificado pela presença de inserções na sequência aminoacídica obtida.

No isolado Ea6 (*E. aerogenes*) não foram detetadas alterações na sequência aminoacídica da porina Omp36, no entanto, a banda que lhe corresponde, obtida por SDS-PAGE, situa-se mais acima da banda obtida para a estirpe de referência, o que pode ser justificado pela presença de uma inserção numa zona da sequência nucleotídica que não foi possível sequenciar. Um estudo conduzido por Lavigne et al (2013), afirma que a alteração das porinas Omp35 e Omp36 foi observada em isolados com resistência ao ertapeneme. Thiolas et al (2004), referiu que as zonas mais conservadas correspondem aos domínios transmembranares ($\beta 1$ a $\beta 15$) e, onde verificou mais alterações, foi nas zonas correspondentes aos loops superficiais L5 e L4, podendo o loop L5, uma vez que contém vários grupos polares, ser representativo da Omp36 de *E. aerogenes*. Este loop L5 é também um *hotspot* de variações aminoacídicas que podem gerar uma completa modificação no perfil das cargas desta zona (Thiolas et al, 2004). Neste estudo foram identificadas as mesmas substituições aminoacídicas descritas por Thiolas et al (2004), concretamente nas posições Asn207 a Asp225, no entanto, foi ainda detetada uma outra mutação, Ser211Leu, e a inserção do aminoácido Val entre a posição aminoacídica 206 e 207, não descrita no estudo mencionado.

No isolado de *E. coli* (*Ec1*) foram detetados os genes *ompF* e *ompC*. Na sequência aminoacídica da porina OmpC foram identificadas inserções nas zonas dos loops L5 e L7. Estes loops (L5 e L7), em OmpC, são superficiais (Pezeshki, 2009), sendo o L7, juntamente com o L2 e L4, os únicos que diferem da OmpK36 em *K. pneumoniae* (Baslé et al, 2006). Foi ainda identificada uma substituição aminoacídica no loop L3, Gly116Asp, na porina OmpC, da qual não temos conhecimento ter sido reportada anteriormente. Esta substituição encontra-se numa zona muito importante da porina que contribui para a resistência aos carbapenemes, por constrição do canal formado

(Masi and Pagés, 2013). Na porina OmpF foram identificadas 14 substituições aminoacídicas, das quais 9 se encontravam no final da sequência, na porção que corresponde ao início do loop L8. Estas mutações, associadas à produção de CTX-M-15, justificam a resistência ao ertapeneme (Tangdén et al, 2012).

No que se refere às estirpes de *K. pneumoniae*, foi detetada a presença dos três genes, que codificam as principais porinas, nos 15 isolados, e através da sequenciação nucleotídica foi possível deduzir a sequência aminoacídica e identificar um codão stop na porina OmpK35 em dois isolados: na posição Trp229 (Kp1) e na posição Glu255 (Kp3). Este último codão stop encontrava-se no loop L6, situado numa zona superficial da porina (Galdiero et al, 2012). Até onde nos foi possível pesquisar, é a primeira vez que estes dois codões stop são referidos. Porém, num estudo realizado por Crowley et al (2002), foi identificado um codão stop na posição Trp316. Ao contrário do esperado, as duas bandas correspondentes a esta porina OmpK35, obtidas por SDS-PAGE, estão presentes, e com um peso molecular correspondente ao da estirpe de referência o que pode ser justificado pelo facto de estes codões se apresentarem no fim da sequência aminoacídica obtida, não impedindo a sua expressão na totalidade, mas, conferindo um perfil de suscetibilidade diminuída aos carbapenemes.

Na porina OmpK36 foram identificados codões stop em outros 4 isolados: posições aminoacídicas Leu32, em Kp12; Trp94, em Kp9; Trp125, em Kp15 e Ala285, em Kp2. Destes 4 isolados, apenas Kp2 apresenta uma banda (obtida por SDS-PAGE) correspondente à porina OmpK36, o que se pode justificar por o codão stop se encontrar no final da sequência obtida. Mais uma vez, esta localização parece não impedir a expressão da porina, mas confere um perfil de não suscetibilidade aos carbapenemes. O codão stop do isolado Kp15 localiza-se na zona do loop L3, sendo idêntico ao descrito por García-Fernández et al (2010), aí confirmando que resulta na interrupção da tradução da porina OmpK36.

Vários estudos demonstraram que a alteração ou ausência das porinas OmpK35 e OmpK36 altera a suscetibilidade aos carbapenemes (García-Fernández et al, 2010; Kaczmarek et al, 2006). Concretamente, alterações na zona do loop L3 (tanto na porina OmpK35 como na porina OmpK36), como a inserção de dois aminoácidos, Asp137 e Thr138, têm sido referidas como tendo particular influência na diminuição da suscetibilidade aos antibióticos (García-Fernández et al, 2010).

Ainda na análise das sequências da porina OmpK36, foi possível detetar a presença de várias mutações, nomeadamente a alteração aminoacídica de uma prolina por

valina, situada na zona do loop L4, encontrada em 8 isolados. A inserção de 7 aminoácidos no loop L6 de um isolado (Kp1) é referida também no estudo de Crowley et al, (2002). É também de notar as substituições encontradas no loop L8, onde o aminoácido arginina, foi substituído pelo aminoácido histidina, sendo ambos aminoácidos básicos, mas com uma configuração bastante diferente. Esta substituição pode ter influência na entrada dos antibióticos para dentro da célula, pois este loop está envolvido na abertura do canal para o exterior (Galdiero et al, 2012). O isolado Kp4 não expressa esta porina, quando analisada por SDS-PAGE, no entanto, não foi detetado nenhum codão stop na sua sequência. Esta ausência de expressão pode ser explicada por um eventual codão stop no início da sequência, a qual não foi possível sequenciar. No entanto, este isolado tem também a substituição de uma tirosina (aminoácido polar), por triptofano (aminoácido não polar), na posição 186, na zona do *turn* T5, assim como uma deleção de 3 aminoácidos no loop L4 e 5 substituições no loop L5. Não nos foi possível encontrar na bibliografia se alguma destas mutações implica a ausência de expressão da porina.

A porina OmpK36 de Kp6 não foi detetada por SDS-PAGE, colocando-se também, neste caso, a hipótese da existência de um codão stop no início, uma vez que não foi possível obter o início da sequência aminoacídica (obtida só a partir da cadeia β 12). A mesma situação se coloca para o isolado Kp7, que não expressava a porina na análise de SDS-PAGE, mas, embora não apresentasse um codão stop prematuro, a sequência aminoacídica evidenciava uma alteração no quadro de leitura, a partir da cadeia β 7.

Analisando a porina OmpK37, foi possível detetar que 6 isolados apresentavam as mesmas deleções e mutações nos loops L5 e L6, mas, mais importante, foi detetada uma substituição no loopL3 (Kp10 e Kp14), que no nosso conhecimento, e na bibliografia utilizada, foi aqui descrita pela primeira vez. Apesar de não estar descrita na bibliografia a relação direta entre substituições aminoacídicas no loop L3 da porina OmpK37 com a suscetibilidade diminuída aos carbapenemes, vários estudos comprovam que as moléculas de antibióticos pertencentes à classe dos carbapenemes utilizam esta porina como meio alternativo de entrada para a célula, indicando que a perda ou sub-expressão desta porina pode levar a um aumento dos níveis de resistência aos carbapenemes. (Doménech-Sánchez et al, 1999). Está também descrito que esta porina é sobre-expressa em isolados deficientes em OmpK35 e OmpK36, diminuindo, assim, os níveis de resistência aos carbapenemes (Martínez-Martínez, 2008), no entanto, neste estudo, tal não se verificou. Havendo

uma mutação no loop L3, o mais importante na resistência aos antibióticos (em OmpK36) é provável que interfira na entrada destes antibióticos.

Devido à grave ameaça que a resistência aos carbapenemes representa, é de extrema importância perceber quais os mecanismos que lhe estão associados, pelo que, tal como tem sido referido ao longo deste trabalho, esse foi o nosso principal objetivo.

Assim, resumem-se os mecanismos que justificam o perfil de suscetibilidade diminuída ao ertapeneme para cada isolado do estudo:

- Para o isolado Kp1 e Kp3 a presença do codão stop na porina OmpK35, assim como várias substituições, deleções e inserções nas porinas OmpK36 e OmpK37, em associação com a expressão de ESBL, justifica o perfil fenotípico.
- O isolado Kp2 tem um codão stop na porina OmpK36, assim como o gene que expressa a carbapenemase KPC.
- O isolado Kp4 não expressa (por SDS-PAGE) a porina OmpK36, tendo várias substituições aminoacídicas, inserções e deleções tanto na porina OmpK36 como OmpK37, no entanto, não tem nenhum gene *bla*_{ESBL} ou um gene que codifique especificamente carbapenemases. O fenótipo pode estar, então, justificado pela ausência da porina.
- Os isolados Kp5, Kp11 e Kp13 têm uma substituição no loop L8 na porina OmpK36, e expressam ESBL. Esta substituição no loop L8, tal como referido anteriormente, pode interferir com a entrada do antibiótico para a célula, justificando assim o fenótipo.
- Os isolados Kp6 e Kp7 não expressam, por SDS-PAGE, as porinas OmpK36, e expressam ainda os genes que codificam as carbapenemases KPC e GES, resultando num perfil de resistência aos ertapeneme, imipeneme e meropeneme, apenas verificado nestes dois isolados.
- O isolado Kp8 não tem mutações nas principais porinas, apenas na OmpK37, mas expressa o gene que codifica a carbapenemase KPC, justificando o fenótipo.
- Os isolados Kp9, Kp12 e Kp15 têm um codão stop na porina OmpK36, assim como a expressão de ESBL.
- Os isolados Kp10 e Kp15 têm uma substituição no loop L8 (OmpK36), mas também uma substituição no loop L3 da porina OmpK37 que, pode estar envolvido na suscetibilidade diminuída aos carbapenemes, embora, aqui, associado à expressão de ESBL.

- O isolado pertencente à espécie *E. coli* expressa ESBL, assim como uma substituição no loop L3 da porina OmpC, esta relacionada com a resistência aos carbapenemes.
- O isolado Ea6, não apresenta nenhum dos mecanismos estudados para justificar a resistência aos carbapenemes.
- Ea4 e Ea5 apresentam substituições e inserções na porina Omp36, destacando-se aquelas que se encontram no loop L5.
- Não foram detetadas, por PCR, as porinas Omp36 no isolado Ea2 e OmpC no isolado Ecan1
- No isolado Eclo3, produtor da β -lactamase da família MIR, não foi detetada, por PCR, nem a porina OmpC, nem OmpF.
- Associada às alterações nas porinas de *Enterobacter spp*, referidas, está a produção das enzimas AmpC cromossómicas, ubiquitárias, resultando no perfil de suscetibilidade diminuída aos carbapenemes, em concreto ao ertapeneme. De facto, Poirel et al (2007) indica que várias enzimas de classe C de Ambler possuem uma habilidade intrínseca, mas muito fraca, para hidrolisar carbapenemes. Assim, sugere-se que, no presente estudo, este mecanismo seja também responsável pela suscetibilidade diminuída apenas ao ertapeneme, (e, portanto, suscetível aos outros 2 carbapenemes testados), nas diferentes espécies de *Enterobacter*, com particular destaque para Ea6, onde este poderá ser o único mecanismo a justificar aquela resistência.

Assim foi possível perceber que os mecanismos de resistência aos carbapenemes com maior relevância são a produção de carbapenemases, e/ou a expressão de ESBL ou AmpC em simultâneo com alteração da permeabilidade de membrana por porinas modificadas.

De importância é também a existência de mecanismos de resistência às quinolonas, pois em conjunto com os mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos conferem um perfil de multirresistência, que, na presença de resistência aos carbapenemes, deixa muito poucas opções de tratamento.

Para este trabalho foram estudados os mecanismos de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos, PMQR.

Como foi anteriormente referido, o gene *aac(6')-Ib* e a variante *aac(6')-Ib-cr* foram detetados apenas em *K. pneumoniae* e *E. aerogenes*. A variante *-cr* foi detetada em simultâneo com os genes *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{OXA-1}* e *bla_{TEM-1}*, em 8/22 isolados.

A disseminação do gene *bla*_{CTX-M-15}, em associação com os genes *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1} e *aac(6')-Ib-cr*, está ligada a uma estirpe epidêmica de *E. coli* do grupo filogenético B2 (Machado et al, 2006), no entanto, no presente estudo encontramos esta associação em estirpes de *K. pneumoniae*, o que também é suportado pela bibliografia, mas ali não se encontra descrito se se trata de uma estirpe epidêmica e a que grupo filogenético pertence (Machado et al, 2006). Foi também detectado o gene *qnrB1* em 6/22 isolados.

No que respeita a esta classe de antibióticos (fluoroquinolonas), foi possível identificar que todos os isolados pertencentes à espécie *K. pneumoniae* apresentavam um perfil de suscetibilidade diminuída aos mesmos. No entanto, não foi possível estabelecer uma ligação entre o perfil fenotípico e o perfil genotípico, pois existem isolados com o mesmo perfil fenotípico e diferente perfil genotípico (Kp8, Kp13 e Kp14, por exemplo), o que poderá dever-se à resistência cromossômica não pesquisada a nível molecular (portanto não incluída no genótipo).

A bomba de efluxo OqxAB, codificada pelos genes *oqxA* e *oqxB*, foi também encontrada em 7/22 isolados, todos eles pertencentes à espécie *K. pneumoniae*, onde, segundo alguns estudos (Yuan et al, 2012; Bin Kim et al, 2009), estes genes são cromossômicos. Esta bomba de efluxo está associada à redução da suscetibilidade a vários antibióticos, tais como o cloranfenicol – ensaiado, neste estudo, e apenas com suscetibilidade em 2 isolados – e olaquinox (Bin Kim et al, 2009).

A presença desta bomba de efluxo, justifica a suscetibilidade diminuída aos antibióticos. Assim, neste trabalho, as sequências nucleotídicas obtidas por sequenciação, dos fragmentos amplificados por PCR, apresentavam uma homologia de 98,9% com a estirpe de referência *K. pneumoniae* (MGH 78578). Estes genes foram também pesquisados, diretamente nos transconjugantes, acima citados, e também no DNA extraído das bandas obtidas com a enzima I-CeuI, com o intuito de perceber a sua localização. Contudo, não se obtiveram resultados positivos, nem nos transconjugantes, portanto não houve conjugação, nem no DNA cromossômico, o que pode indicar que estes genes se encontravam num plasmídeo, mas que este não era conjugável, pelo menos nas condições existentes, tal como descrito por Rodríguez-Martínez et al (2012).

Deste modo, foi possível identificar vários mecanismos associados à resistência aos carbapenemes e à multiresistência, contribuindo para o esclarecimento dos mesmos, em isolados clínicos.

Com o intuito de estabelecer a relação genética dos isolados, em termos de clonalidade e diversidade, foram realizados os testes de PFGE e MLST.

O MLST permitiu identificar o ST (*Sequence type*) dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases e perceber se se tratava de uma estirpe com um ST já conhecido e eventual disseminação. Em *K. pneumoniae*, o ST mais conhecido, associado à produção de KPC, é o ST258 e encontrando-se disseminado pelo mundo inteiro (Lascols et al, 2013).

Neste trabalho, foi identificado o ST147, o qual tem sido relatado em estirpes produtoras de OXA-181, NDM-1, VIM-1, CTX-M-15 e SHV-12, e o ST231, já identificado em estirpes produtoras de NDM-1, OXA-48, VIM-1, KPC e CTX-M-15; ambos os ST têm surgido disseminados por vários países, concretamente Índia, Filipinas, Grécia e Itália (Lascols et al 2013). No entanto, neste trabalho, o ST147 foi identificado em dois isolados produtores de KPC-3 e o ST231 num isolado produtor de GES-5; no isolado Kp6, produtor também de KPC-3, foi identificado o ST1138, aqui descrito pela primeira vez, pertencendo ao mesmo complexo clonal do ST26. Na bibliografia pesquisada, não foi encontrada nenhuma referência que associasse o ST26 à produção de KPC. Foi então verificado se este ST estaria associado a algum fator de virulência, em particular aos serotipos capsulares K1, K2, K4 e K5; segundo um estudo de Brisse et al (2009), este ST não está associado a nenhum destes determinantes virulentos, no entanto, o ST163, também pertencente ao mesmo complexo clonal do ST26, está associado ao serotipo K1, considerado um dos mais virulentos (Abate et al, 2012).

No isolado de *E. coli* (Ec1), foi identificado o ST131. Este ST está fortemente associado à disseminação mundial do gene *bla*_{CTX-M-15}, tendo este gene também sido identificado neste isolado (Livermore, 2012). A dispersão global de *bla*_{CTX-M-15}, que codifica uma ESBL, é um dos maiores exemplos de propagação de determinantes de resistência mediados por plasmídeos. Este gene foi descrito em diversos plasmídeos com tamanho variável entre 7kb a 430 kb e contém, normalmente, determinantes de resistência a outros antibióticos (Naseer and Sundsfjord, 2011). Usualmente, o CTX-M-15 tem sido identificado em plasmídeos do tipo IncFII (Naseer and Sundsfjord, 2011), no entanto, neste isolado não foi detetado este plasmídeo. Em Portugal, vários estudos relatam a presença deste ST em *E. coli* (Coque et al, 2008b; Nicolas-Chanoine et al, 2008).

Com o método de PFGE pudemos identificar 4 clones principais, geneticamente relacionados (> 80% homologia), um deles formando o *cluster* KpII, (com os isolados

Kp2 e Kp8, produtores de KPC-3, e o perfil de PFGE 0006), ambos com o ST147, e provenientes do mesmo hospital (D).

O outro clone (com o perfil, único, de PFGE 0008) produtor de KPC-3 não é geneticamente relacionado, pois não pertence àquele *cluster*. Esta heterogeneidade genética, tal como noutros estudos, pode sugerir uma disseminação de KPC por transferência genética horizontal e não por uma disseminação clonal (Leavitt et al, 2010a, Manageiro et al, 2012b). Foram identificados outros três *clusters*, KpI, KpIII e KpIV; duas estirpes incluídas no *cluster* KpIII partilham 100% de homologia e pertencem ao mesmo hospital, sugerindo disseminação clonal. Tanto o *cluster* KpI, como o KpIV, incluem estirpes que não pertencem ao mesmo hospital, embora sejam relacionados geneticamente.

Além de aprofundar os principais mecanismos envolvidos na resistência aos carbapenemes e tentar compreender formas de disseminação entre os isolados de *K. pneumoniae*, foi também importante explorar, embora superficialmente (tendo em consideração o número reduzido de isolados selecionados, por apenas nos interessarem os que apresentam suscetibilidade diminuída aos carbapenemes), qual a relação entre aqueles mecanismos de resistência e a origem dos isolados.

Os patogénicos, produtores de ESBL e AmpC, têm-se tornado endémicos em alguns hospitais, como indica um estudo realizado nos Estados Unidos da América (Hanson et al, 2008). Inclusivamente, um dos fatores de risco associados a estas infeções é a hospitalização prévia (Pitout et al, 2005). No entanto, já vários estudos relatam que bactérias produtoras destas enzimas são frequentes em doentes que não estão hospitalizados (Hanson et al, 2008), ou mesmo em doentes que nunca foram hospitalizados (Pitout et al 2005). Este cenário reflete-se neste trabalho, pois das 22 estirpes estudadas, 2, produtoras de ESBL, provêm da comunidade, e outras duas, uma produtora de ESBL CTX-M-15 e outra de KPC-3, foram isoladas em serviços de urgências, podendo sugerir que provêm de um ambiente extra-hospitalar. Esta situação é preocupante, pois a comunidade começa a ser um foco de infeções por microrganismos multirresistentes, o que dificulta o controlo da sua disseminação (Pitout et al, 2005). Assim, é importante reunir esforços para melhor controlar a disseminação das infeções bacterianas, nomeadamente com resistência aos carbapenemes.

5. Conclusão

Com este estudo foi possível caracterizar 22 isolados não suscetíveis ao ertapeneme, selecionados de uma amostra de 426 isolados (5%), e contribuir para o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na resistência aos carbapenemes e às fluoroquinolonas mediadas por plasmídeos, bem como, sobre os diferentes fenótipos associados, nomeadamente de multirresistência (4%).

Foi também perceptível que os mecanismos de resistência aos carbapenemes mais comuns são a expressão de ESBL (sobretudo CTX-M-15) ou AmpC, em simultâneo com a alteração da permeabilidade da membrana, seja pela existência de um codão stop prematuro, ou pela existência de várias mutações, inserções e/ou deleções, que, por sua vez, em *K pneumoniae*, estão sempre associados a um fenótipo de multirresistência.

No entanto, é de realçar a produção de carbapenemases da família KPC e GES, contribuindo para aquele fenótipo, não existindo, em qualquer dos casos, co-produção com ESBL CTX-M-15, à exceção da co-produção de GES-5 e SHV-12, descrita, pela primeira vez, em Portugal.

Foi ainda identificado um novo ST, associado à produção de KPC-3 em *K. pneumoniae*, e a estirpe de *E. coli* ST131, pandémica.

Considerando a importância dos antibióticos, no geral, e dos carbapenemes, em particular, como último recurso no tratamento de infeções multirresistentes, julga-se que este trabalho teve importância, como previamente sugerido nos objetivos, desejando-se que seja alargado a um maior número de isolados. De facto, os resultados obtidos deixam prever um quadro, que poderá vir a ser preocupante, tornando imprescindível a tomada de medidas que previnam a disseminação destes microrganismos, assim como o controlo exaustivo da utilização dos antibióticos.

6. Bibliografia

- Abate, G., Koh, T. H., Gardner, M. & Siu, L. K. 2012. Clinical and bacteriological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* causing liver abscess with less frequently observed multi-locus sequences type, ST163, from Singapore and Missouri, US. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 45, 31-36.
- Arnold, R. S., Thom, K. A., Sharma, S., Phillips, M., Kristie, J. J. & Morgan, D. J. 2011. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Southern Medical Journal*, 104, 40-5.
- Baslé, A., Rummel, G., Storici, P., Rosenbusch, J. P., & Schirmer, T. 2006. Crystal Structure of Osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. *Journal of Molecular Biology*, 362, 933-942.
- Becker, B. & Cooper, M. A. 2012. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. *ACS Chemical Biology*, 8, 105-115.
- Bin, K. H., Wang, M., Park, C.H., Kim, E., Jacoby, G. A. & Hooper, D. C. 2009. *Enterobacteriaceae* in Human clinical isolates of *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 3582.
- Blair, J. & Piddock, L. J. 2009. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current Opinion in Microbiology*, 12, 512-519.
- Bonnet, R., Caron, F., Cavallo, J. D., Chardon, H., Chidiac, C., Courvalin, P., Drugeon, H., Dubreuil, I., Jarlier, V., Jehl, F., Lambert, T., Leclercq, R., Nicolas-Chanoine, M. H., Plesiat, P., Ploy, M. C., Quentin, C., Soussy, C. J., Varon, E. & Weber, P. 2012. *Committee De L'Antibiogramme De La Société Française De Microbiologie*.
- Borg, M. personal communication, April 2013 *in*: Glasner, C., Albiger, B., Buist, G., Tanbić-Andrasević, A., Canton, R., & Carmeli, Y. 2013. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveillance*, 18, 28.
- Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., & Grimont, P. 2009. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One*, 4, 4982.

- Carattoli, A. 2011. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 654-658.
- Choffnes, E. R., Relman, D. A. & Mack, A. 2010. Antibiotic resistance: implications for global health and novel intervention strategies: workshop summary. *National Academies Press*.
- Coque, T.M., Baquero, F. & Cantón, R. 2008a. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveillance Journal*, 20, 13.
- Coque, T. M., Novais, Â., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L. & Nordmann, P. 2008b. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 195.
- Cornaglia, G., Russel, K., Satta, G. & Fontana, R. 1995. Relative importance of outer membrane permeability and group 1 β -lactamase as determinants of meropenem and imipinem activities against *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 350-355.
- Cornaglia, G., Giamarellou, H. & Rossolini, G. M. 2011. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *The Lancet Infectious Diseases*, 11, 381-93.
- Crowley, B., Benedí, V. J., & Doménech-Sánchez, A. 2002. Expression of SHV-2 β -lactamase and of reduced amounts of OmpK36 porin in *Klebsiella pneumoniae* results in increased resistance to cephalosporins and carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46, 3679-3682.
- Cuzon, G., Naas, T. & Nordmann, P. 2011. Functional Characterization of Tn4401, a Tn3-Based Transposon Involved in *bla_{KPC}* Gene mobilization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 5370.
- Delcour, A. H. 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics*, 1794, 808-816.
- Dimou, V., Dhanji, H., Pike R., Livermore, D. M. & Woodford, N. 2012. Characterization of *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 1660-5
- Doménech-Sánchez, A. S., Hernandez-Alles, L., Martinez-Martinez, V. J. & Benedi, S. A. 1999. Identification and characterization of a new porin gene of

- Klebsiella pneumoniae*: its role in lactam antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 181, 2726–2732.
- Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Hernández-Allés, S., Conejo, M., Pascual, Á., Tomás, J. M., & Benedí, V. J. 2003. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 3332-3335.
 - Doumith, M., Ellington, M. J., Livermore, D. M. & Woodford, N. 2009. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter spp* clinical isolates from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, 659-667.
 - Drawz, S. M. & Bonomo R. A. 2010. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 160–201.
 - D'Andrea, M. M., Arena, F., Pallecchi, L., & Rossolini, G. M. 2013. CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303, 305-17.
 - Egan, A. J. & Vollmer, W. 2013. The physiology of bacterial cell division. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277, 8-28.
 - Galdiero, S., Capasso, D., Vitiello, M., D'Isanto, M., Pedone, C., & Galdiero, M. 2003. Role of surface-exposed loops of *Haemophilus influenzae* protein P2 in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Infection and Immunity*, 71, 2798-2809.
 - Galdiero, S., Falanga, A., Cantisani, M., Tarallo, R., Elena, D. M., Doriano, V. & Galdiero, M. 2012 Microbe-host interactions: structure and role of gram-negative bacterial porins. *Current Protein and Peptide Science*, 13, 843-854.
 - Garau J. 2008. Other antimicrobials of interest in the era of extended-spectrum beta-lactamases: fosfomicin, nitrofurantoin and tigecycline. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 198-202.
 - García-Fernández, A., Miriagou, V., Papagianmisis, C., Giordano, A., Venditti, M., Mancini, C. & Carattoli, A. 2010. An ertapenem-resistant extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OmpK36 porin variant. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, 54, 4178-4184.
 - Glasner, C., Albiger, B., Buist, G., Tanbić-Andrasević, A., Canton, R., & Carmeli, Y. 2013. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveillance*, 18, 28.

- Gonçalves D., Cecilio P., Ferreira H. 2013. First detection of OXA-48-like-producing *Acinetobacter baumannii* in the faecal flora of nursing home residents in Northern Portugal, 23rd ECCMID, *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*.
- Hanson, N. D., Moland, E. S., Hong, S. G., Propst, K., Novak, D. J., & Cavalieri, S. J. 2008. Surveillance of community-based reservoirs reveals the presence of CTX-M, imported AmpC, and OXA-30 β -lactamases in urine isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in a US community. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 3814-3816.
- Harada, S., Ishii, Y., & Yamaguchi, K. 2008. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 28, 401-412.
- Hawser, S. P., Bouchillon, S. K., Lascols, C., Hackel, M., Hoban, D. J., Badal, R. E., & Canton, R. 2012. Susceptibility of European *Escherichia coli* clinical isolates from intra-abdominal infections, extended-spectrum β -lactamase occurrence, resistance distribution, and molecular characterization of ertapenem-resistant isolates (SMART 2008–2009). *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 253-259.
- Jacoby, G. A. & Munoz-Price, L. S. 2005. The New β -Lactamases. *New England Journal of Medicine*, 91, 352-380.
- Jeong, S. H., Bae, I. K., Kim, D., Hong, S. J., Song, J. S., Lee J. H. & Lee S. H. 2005. First Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 Extended-Spectrum β -Lactamases in Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 4809.
- Kaczmarek, F., Dib-Hajj, F., Shang, W. & Gootz, T. 2006. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of *bla*_{ACT-1} β -lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin PhoE. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 3396-3406.
- Kang, C. I., Kim, S. H., Bang, J. W., Kim, H. B., Kim, N. J., Kim, E. C. & Choe, K. W. 2006. Community-acquired versus nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: clinical features, treatment outcomes, and clinical implication of antimicrobial resistance. *Journal of Korean Medical Science*, 21, 816-822.
- Karageorgopoulos, D. E., Wang, R., Yu, X. H. & Falagas, M. E. 2012. Fosfomicin: evaluation of the published evidence on the emergence of

- antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 255-68.
- Kumar, S. & Varela, M. F. 2012. Biochemistry of Bacterial Multidrug Efflux Pumps. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 4484-4495.
 - Lascols, C., Peirano, G., Hackel, M., Laupland, K. B., & Pitout, J. D. 2013. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 130-136.
 - Lavigne, J. P., Sotto, A., Nicolas-Chanoine, M. H., Bouziges, N., Bourg, G., & Davin-Regli, A. 2012. Membrane permeability, a pivotal function involved in antibiotic resistance and virulence in *Enterobacter aerogenes* clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 539-545.
 - Leavitt, A., Carmeli, Y., Chmelnitsky, I., Goren, M. G., Ofek, I., & Navon-Venezia, S. 2010a. Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 3002-3006.
 - Leavitt, A., Chmelnitsky I., Ofek I., Carmeli Y. & Navon-Venezia S. 2010b. Plasmid pKpQIL encoding KPC-3 and TEM-1 confers carbapenem resistance in an extremely drug-resistant epidemic *Klebsiella pneumoniae* strain. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 243 –248.
 - Liras, P. & Martín, J.F. 2006. Gene clusters for β -lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? *International Microbiology*, 2006, 9-19.
 - Livermore, D. M. 2012. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 27, 128-142.
 - Machado, E., Coque, T., Cantón, R., Baquero, F., Sousa, J. C. & Peixe, L. 2006. Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *acc(6)-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone- modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 3220-3221
 - Machado, E., Coque, T., Cantón, R., Novais, A., Sousa, J. C., Baquero, F. & Peixe, L. 2007. On behalf of The Portuguese Resistance Study Group. High diversity of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 1370-4.

- Manageiro, V., Ferreira, E., Jones-Dias, D., Louro, D., Pinto, M., Diogo, J. & Caniça M. 2012a. Emergence and risk factors of β -lactamase-mediated resistance to oxymino- β -lactams in *Enterobacteriaceae* isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 72, 272-277.
- Manageiro, V., Ferreira, E., Louro, D., & Caniça, M. 2012b. Polyclonal KPC-3-producing *Enterobacteriaceae* in Portugal. In: Méndez.Vilas, A. Worldwide Research Efforts in the Fighting Against Microbial Pathogens: From Basic Research to Technological Developments, p. 212-216. Ed. BrownWalker Press Boca Raton, Florida (USA).
- Manageiro, V., Ferreira, E., Caniça, M. & Manaia, C. M. 2013. GES-5 among the β -lactamases detected in ubiquitous bacteria isolated from aquatic environment samples. *FEMS Microbiology Letters* (in press).
- Martínez-Martínez, L. 2008. Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 82-89.
- Masi, M. & Pagès, J. M. 2013. Structure, Function and Regulation of Outer Membrane Proteins Involved in Drug Transport in *Enterobacteriaceae*: the OmpF/C–TolC Case. *The Open Microbiology Journal*, 1, 7-22.
- Mendonça, N., Leitão, J., Manageiro, V., Ferreira, E. & Caniça, M. 2007. Spread of Extended-Spectrum β -lactamase CTX-M-Producing *Escherichia coli* Clinical Isolates in Community and Nosocomial Environments in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 1946-1955.
- Mendonça, N., Ferreira, E., Louro, D. & Caniça, M. 2009 Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended- and broad-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34, 29-37.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L. & Ochoa, T. J. 2011. Mecanismos Moleculares de Resistência Antibiótica en *Escherichia coli* Asociadas a Diarrea. *La Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 28, 648-56.
- Naas, T., Poirel, L. & Nordmann, P. 2008. Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiological Infectious*, 14, 45-52.
- Naseer, U., & Sundsfjord. 2011. A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microbial Drug Resistance*, 17, 83-97.
- Nation, R. L. & Li, J. 2009. Colistin in the 21st century. *Current Opinion Infectious Diseases*, 22, 535-43.

- National Research Council (US). 2006. Committee on New Directions in the Study of Antimicrobial Therapeutics, New Classes of Antimicrobials, & Immunomodulation. Treating infectious diseases in a microbial world: report of two workshops on novel antimicrobial therapeutics. National Academy Pr.
- Neu HC, Gootz TD. Antimicrobial Chemotherapy. *In*: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 11
- Nicolas-Chanoine, M. H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M. P., Caniça, M. M. & Johnson, J. 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25: H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 273-281.
- Nicolau, D. P. 2008. Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert Opinion*, 9, 23-37.
- Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. 2011a. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 1791-8.
- Nordmann, P., Poirel, L., Carrère, A., Toleman, M. A. & Walsh, T. R. 2011b. How to detect NDM-1 producers. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 718-21.
- O'Fallon, E., Schreiber, R., Kandel, R. & D'Agata, E. M. C. 2009. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria at a Long-Term Care Facility: Assessment of Residents, Healthcare Workers, and Inanimate Surfaces. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 30, 1172-9.
- Pagès, J. M., James, C. E., & Winterhalter, M. 2008. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 893-903.
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. 2011. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 4943-4960.
- Patel, G. & Bonomo R. A. 2013. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Frontiers in Microbiology*, 14, 4-48.
- Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. 2005. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 657–686.
- Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K. M., Bonomo, R. A. 2007. The Continuing Challenge Of ESBLs. *Current Opinion Pharmacology*, 7, 459–469.

- Pezeshki, S., Chimerel, C., Bessonov, A. N., Winterhalter, M., & Kleinekathöfer, U. 2009. Understanding ion conductance on a molecular level: an all-atom modeling of the bacterial porin OmpF. *Biophysical Journal*, 97, 1898-1906.
- Pitout, J. D. D., Nordmann, P., Laupland, K. B. & Poirel, L. 2005. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum b-lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 52–59.
- Poirel, L., Pitout, J. D., & Nordmann, P. 2007. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiology*, 2, 501-512.
- Poirel, L., Potron, A. & Nordmann, P. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 1597-1606.
- Poole, K. 2003. Overcoming multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 4, 128-139.
- Rodríguez-Martínez, J. M., Cano, M. E., Velasco, C., Martínez-Martínez, L. & Pascual, A. 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *Journal of Infectious Chemotherapy*, 17, 149-82.
- Rodríguez-Martínez, J. M., Díaz, P., Briales, A., Machuca, J., Lossa, M., Fernández-Cuenca, F., Rodríguez, J., Martínez-Martínez, L. & Pascual, A. 2012. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68, 68-73.
- Ruiz, J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 1109-1117.
- Seral, C., Gude, M. J. & Castillo, F. J. 2012. Emergence of plasmid mediated AmpC β -lactamasas: Origin, importance, detection and therapeutical options. *Revista española de quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 25, 89.
- Spratt, B. G. 2012. The 2011 Garrod Lecture: From penicillin-binding proteins to molecular epidemiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 1578-1588.
- Stuart, C. J., & Leverstein-Van Hall, M. A. 2010 Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, 205-210.

- Sun, Y., Cai, Y., Liu, X., Bai, N., Liang, B. & Wang, R. 2013. The emergence of clinical resistance to tigecycline. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41, 110-6.
- Tängdén, T., Adler, M., Cars, O., Sandegren, L., & Löwdin, E. 2013. Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem in an in vitro pharmacokinetic model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68, 1319-1326.
- Tenover, F. C. 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119, 3–10.
- Teo, J., Cai, Y., Tang, S., Lee, W., Tan, T. Y., Tan, T. T. & Kwa, A. L. H. 2012. Risk Factors, Molecular Epidemiology and Outcomes of Ertapenem-Resistant, Carbapenem-Susceptible *Enterobacteriaceae*: A Case-Case-Control Study. *Plos One*, 7, 342-54.
- Theuretzbacher, U. 2013. Global antibacterial resistance: The never-ending story. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 1, 63-69.
- Thiolas, A., Bornet, C., Davin-Régli, A., Pagès, J. M., & Bollet, C. 2004. Resistance to imipenem, cefepime, and ceftazidime associated with mutation in Omp36 osmoporin of *Enterobacter aerogenes*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317, 851-856.
- Tsai, Y. K., Fung, C. P., Lin, J. C., Chen, J. H., Chang, F. Y., Chen, T. L., & Siu, L. K. 2011. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 1485-1493.
- Vouloumanou, E. K., Karageorgopoulos, D.E., Rafailidis, P. I., Michalopoulos A., Falagas, M. E., 2011. Trimethoprim /sulfamethoxazole: evaluation of the available clinical and pharmacokinetic/pharmacodynamic evidence. *International Journal Antimicrobial Agents*, 38, 197-216.
- Walsh, T. R. 2010 Emerging carbapenemases: a global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, 8-14
- Yuan, J., Xu, X., Guo, Q., Zhao, X., Ye, X., Guo, Y. & Wang, M. 2012. Prevalence of the *oqxAB* gene complex in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 1655-1659.

Anexo IV

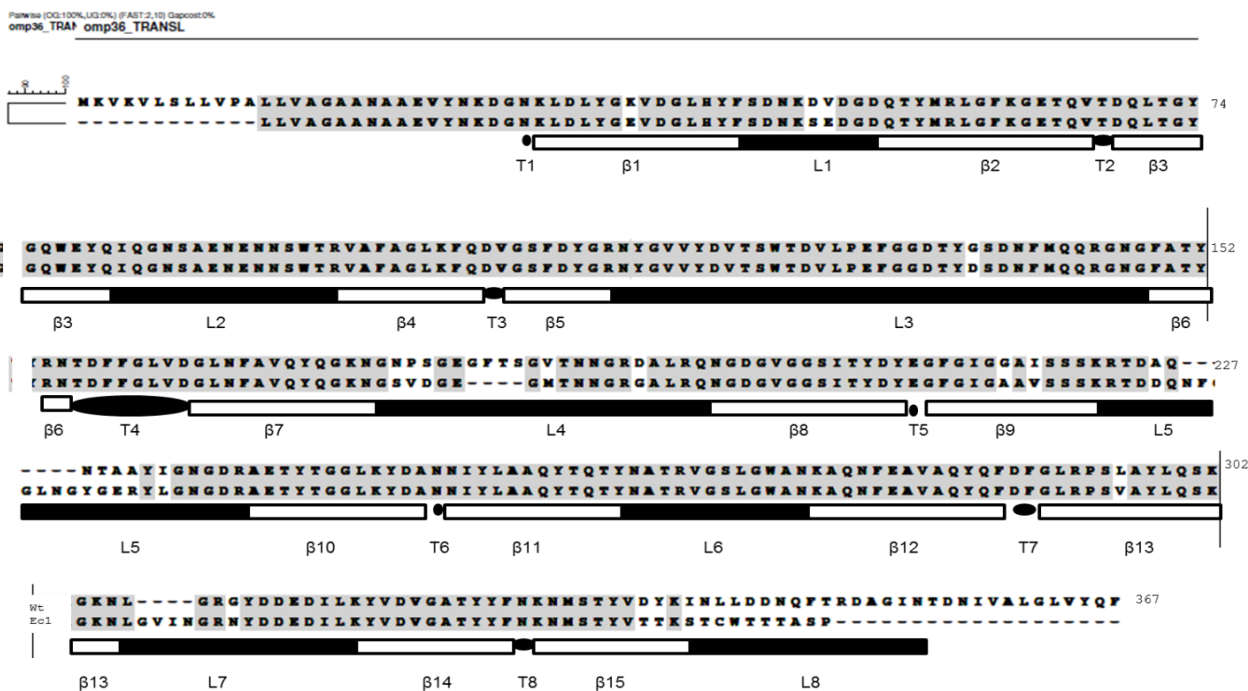


Ilustração 4. Alinhamento das sequências nucleotídicas da porina OmpC, com a estirpe de referência Accession nº U00096.3. Numeração aminoacídica desde o codão de iniciação (Met).

Anexo V

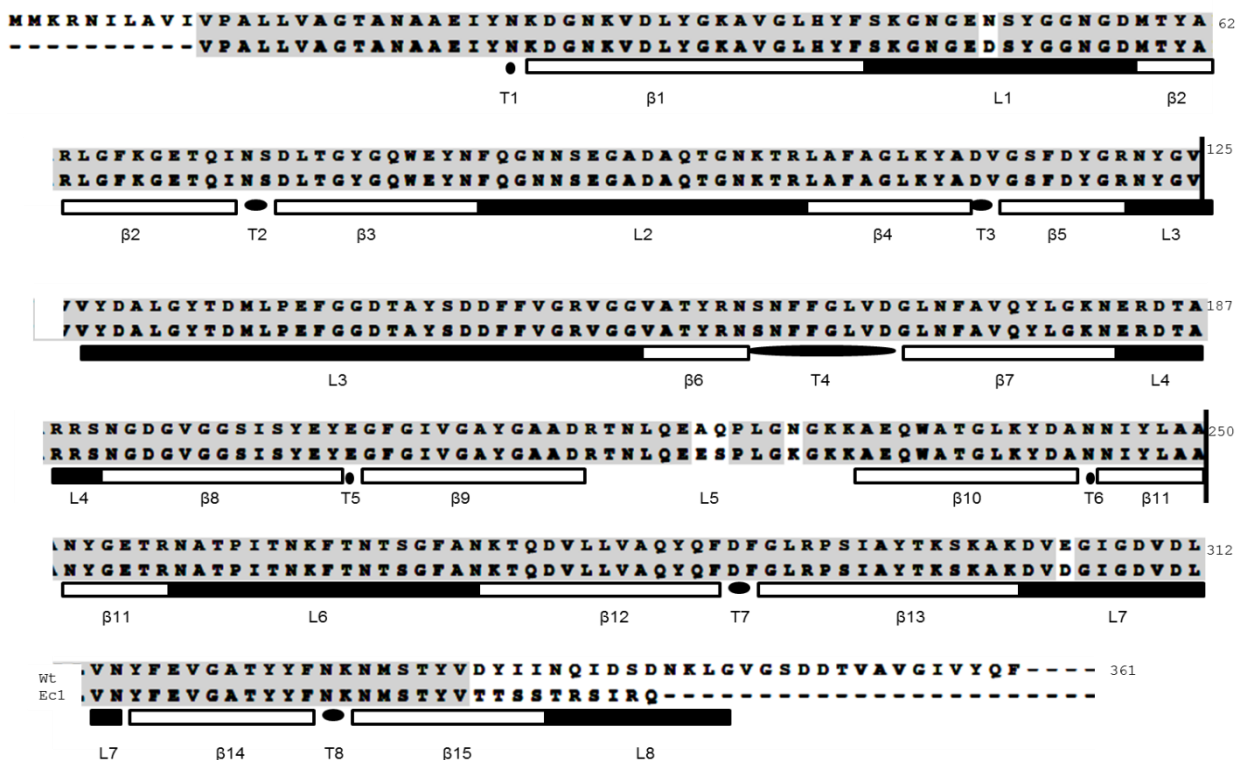


Ilustração 5. Alinhamento das sequências nucleotídicas da porina OmpF, com a estirpe de referência Accession nº U00096.3. Numeração aminoacídica desde o codão de iniciação (Met).

Anexo VI

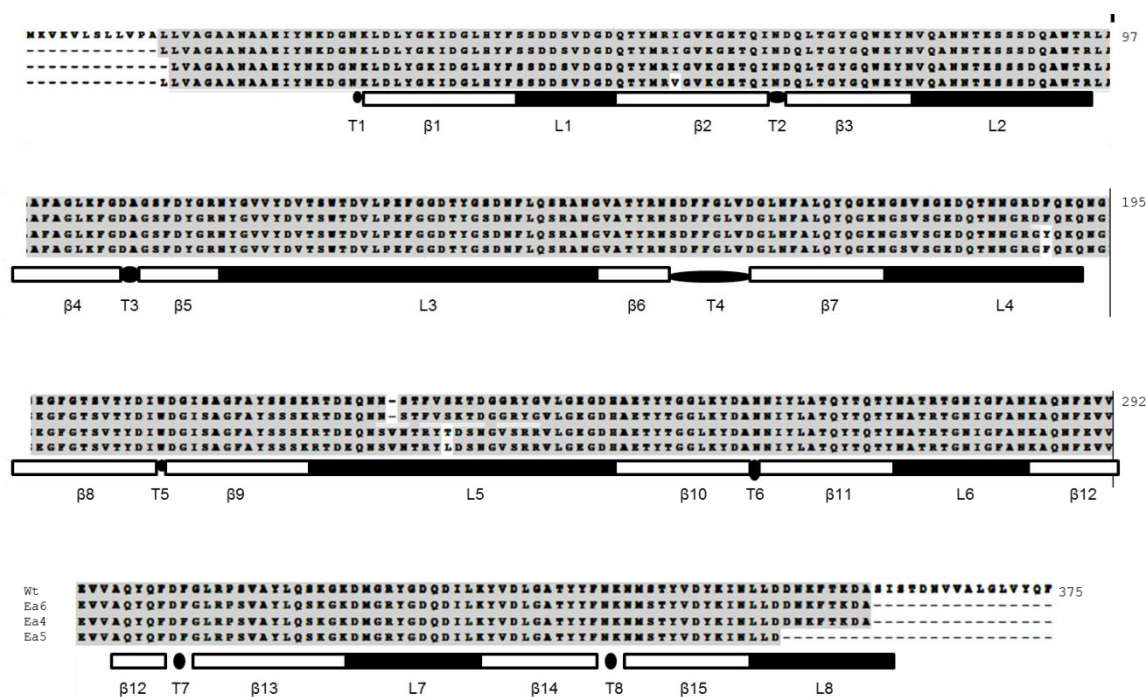


Ilustração 6. Alinhamento das seqüências nucleotídicas da porina Omp36, com a estirpe de referência Accession nº CP002824.1. Numeração aminoacídica desde o codão de iniciação (Met).