UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL

Caracterização da Resistência aos Antibióticos em estirpes isoladas de diferentes reservatórios ambientais

Rodrigo Guerreiro Coelho

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Vera Manageiro
Professora Doutora Deodália Dias

2022

Notas prévias:

A Professora Doutora Vera Manageiro, do Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde, Departamento de Doenças Infeciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, e do *European Program for Public Health Microbiology Training* (EUPHEM), Centro Europeu para Prevenção e Controle de Doenças (ECDC), participou como orientadora externa nesta dissertação de mestrado.

A Professora Doutora Deodália Dias do Departamento de Biologia Animal, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, participou como orientadora interna nesta dissertação de mestrado.

A Professora Doutora Manuela Caniça, do Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde, do Departamento de Doenças Infeciosas, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, participou como coorientadora nesta dissertação de mestrado.

As referências nesta dissertação de mestrado seguem os critérios da revista "*Environmental Microbiology"*

A escrita desta dissertação seguiu as regras do novo acordo ortográfico.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto OHEJP JRP15-R2-AMR2.2-FED-AMR, com financiamento do European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (Grant Agreement no. 773830).

Trabalhos apresentados em congressos:

Manageiro, V., **Coelho, R.**, Rosado, T., Vieira, P., Reis, L., Matias, R., Rodrigues, J., Menezes, C., Ferreira, E., Sequeira, A., Moreira, O., Dias, E., Caniça, M. Resistome, mobilome and virulome analysis of *Enterobacter cloacae* complex strains isolated from the water environment. 32nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious (ECCMID 2022) (*Online event*)

Manageiro, V., Cano, M., Dias, E., Rosado, T., Vieira, P., Reis, L., Matias, R., Rodrigues, J., **Coelho, R.**, Menezes, C., Ferreira, E., Sequeira, A., Moreira, O., Caniça, M. (**2021**). Diversity of bacterial communities and genes encoding AMR in different environmental compartments along the food/feed chain. One Health EJP Annual Scientific Meeting 2021 (OHEJP ASM 2021) (*Online event*)

Agradecimentos

À Doutora Vera Manageiro, pela oportunidade de trabalhar no laboratório, pela orientação, pela disponibilidade e paciência e pelo conhecimento partilhado.

À Doutora Manuela Caniça pela orientação e pelos conhecimentos partilhados.

À Doutora Eugénia Ferreira pela sua disponibilidade para ajudar.

À Doutora Deodália Dias pela sua ajuda e disponibilidade.

À Lígia, Patrícia e Catarina pela ajuda prestada e pelos bons momentos de convívio compartilhados.

Aos meus familiares por acreditarem em mim e por todo o apoio prestado no decorrer do meu percurso.

Ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge pelas condições disponibilizadas para a realização deste trabalho.

Resumo

A resistência aos antibióticos é um problema emergente de Saúde Pública, que tem causado uma elevada mortalidade devido ao aparecimento de clones multirresistentes para os quais não existe um tratamento eficaz. Apesar deste problema estar principalmente associado aos cuidados de saúde outros reservatórios de genes de resistência aos antibióticos, tais como os animais, as águas e os solos, têm vindo a ganhar alguma relevância, numa perspetiva Uma Só Saúde. Neste âmbito, este trabalho teve como principal objetivo a caracterização da resistência aos antibióticos em estirpes isoladas de diferentes reservatórios ambientais aquáticos. Foram isoladas 143 estirpes bacterianas pertencentes a 45 espécies diferentes. Dada a importância em termos de saúde pública das espécies pertencentes ao *Enterobacter cloacae* complex e sendo uma das espécies mais representadas nos reservatórios analisados (n=29, em 5 reservatórios: água do rio e afluente, água de superfície, lamas e efluente de uma lagoa de estabilização), procedeu-se à respetiva caracterização da suscetibilidade aos antibióticos.

A realização de testes fenotípicos (por difusão em disco e determinação da concentração inibitória mínima) foi efetuada para 7 classes de antibióticos, permitindo direcionar a pesquisa de genes de resistência por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A determinação da diversidade genética foi realizada recorrendo ao MLST (*Multilocus Sequence Typing*). A sequenciação total do genoma foi realizada para as estirpes que apresentavam um fenótipo mais relevante com o objetivo de identificar genes de resistência a antibióticos, fatores de virulência, plasmídeos, e respetivo pMLST, e outros elementos genéticos móveis (MGE), MLST, profagos e foi determinada a patogenicidade para os humanos utilizando ferramentas online. A análise filogenética foi efetuada com recurso ao CSI Phylogeny v1.4.

A maioria das estirpes de *E. cloacae* complex estudadas possuía um fenótipo de suscetibilidade a todos os antibióticos testados, com exceção das resistências naturais. No entanto, destaca-se a resistência a pelo menos um dos carbapenemes estudados e à colistina em 86% e 93% das estirpes, respetivamente. Globalmente, foram identificados genes relacionados com uma diminuição da suscetibilidade aos antibióticos β-lactâmicos ($bla_{\text{FRI-8}}$, $bla_{\text{IMI-6}}$ e $bla_{\text{ACT-tipo)}}$, quinolonas (*oqxAB*-tipo), fosfomicina (*fosA2*-tipo), macrólidos (*mdfA*-tipo) e ainda uma grande variedade de bombas de efluxo. Foram também detetados: um fator de virulência (*iroN*), plasmídeos [IncFII(Yp), Col(MG828), Col(pHAD28)], e diferentes elementos genéticos móveis (MGE). O estudo da diversidade genética permitiu identificar 5 STs diferentes, sendo o ST1688 o predominante, estando presente em 83% das estirpes, em 4 dos 5 reservatórios ambientais estudados. A análise filogenética agrupou as estirpes em três clades principais, contendo estirpes de diferentes reservatórios e estações do ano, variando entre si entre 6 e 49517 SNPs.

Em conclusão, este estudo demonstrou uma grande diversidade de genes de resistência e MGE em estirpes de *E. cloacae* complex isoladas de ambientes aquáticos, confirmando que estes podem funcionar como um reservatório de bactérias resistentes, e de genes de resistência a antibióticos, que podem ser patogénicas para o Homem. Assim, será necessária a implementação de uma rede de monitorização e vigilância não só nas águas, mas também em outros reservatórios ambientais por forma evitar a sua disseminação.

Palavras-chave: Resistoma; Mobiloma; Ambiente Aquático; Uma Só Saúde.

Abstract

Antibiotic resistance is an emerging Public Health problem that causes high mortality due to the emergence of multidrug-resistant clones for which there is no effective treatment. Despite this problem being mostly associated with healthcare facilities, other antibiotic resistance reservoirs have gained some relevance such as animals, water, and soils, in a One Health perspective. The aim of this study was to characterize the antibiotic resistance in strains isolated from different aquatic environmental reservoirs.

In total, 143 strains belonging to 45 different species were isolated. Characterization of antibiotic resistance was performed in *Enterobacter cloacae complex* strains due to their importance in Public Health and for being one of the most represented species in the analyzed reservoirs (n=29, in five reservoirs: river water, and affluent, surface water, sewage sludge and effluent of a wastewater treatment plant). Phenotypic characterization (by disk diffusion and minimum inhibitory concentration) was done for seven antibiotic classes, allowing the oriented search of antibiotic resistance genes by PCR (Polymerase Chain Reaction). The genetic diversity was studied using MLST (Multilocus Sequence Typing). Whole Genome Sequencing was performed for a subset of 12 strains presenting the most relevant phenotypes. Freeware web-based tools were used to identify antibiotic resistance genes, virulence factors, plasmids and respective pMLST, and other mobile genetic elements (MGE), and determine the pathogenicity for humans. Phylogenetic analysis was performed by using CSI Phylogeny v1.4 with default options.

Most of the strains were susceptible to all antibiotics tested except the natural resistances. However, 86% were resistant to at least one carbapenem and 93% were resistant to colistin. Globally we identified genes related with a decreased susceptibility to β-lactams ($bla_{\text{FRI-8}}$, $bla_{\text{IMI-6}}$, and $bla_{\text{ACT-type}}$), quinolones (*oqxAB*-type), fosfomycin (*fosA2*-type), macrolides (*mdfA*-type) and several efflux pumps. We also detected virulence factor (*iroN*), plasmids [(IncFII(Yp), Col(MG828), Col(pHAD28)], and different MGE. The study of the genetic diversity allowed identifying five different STs: ST1688 was the most represented, being identified in 83% of strains, in four of the five studied environmental reservoirs. The phylogenetic analysis identified three main clades, differing between 6 and 49517 SNPs, with closely related strains from different reservoirs and seasons.

In conclusion, this study demonstrated the diversity of antibiotic resistance genes (ARGs) and MGE within *E. cloacae complex* strains isolated from different aquatic environments, confirming that they can act as a reservoir of antibiotic resistant bacteria and ARGs that can be pathogenic to humans. Thus, it it necessary to implement a monitoring and surveillance network not only in water, but also in other environmental reservoirs to avoid their dissemination.

Keywords: Resistome; Mobilome; Aquatic environment; One Health.

Indice

Notas prévias i

Agradecimentos ii

Resumo iii

Abstract iv

Índice iv

Índice de Figuras viii

Índice de tabelas ix

Lista de siglas e abreviaturas x

I. Introdução 1

1. Os Antibióticos 1

2. Classificação dos antibióticos e respetivos mecanismos de ação 2

2.1. Inibição da síntese da parede celular 2
2.1.1. Antibióticos β-lactâmicos 3
2.1.2. Penicilinas 4
2.1.3. Cefalosporinas 4
2.1.4. Monobactames 5
2.1.5. Carbapenemes 5
2.1.6. Glicopeptídeos 5

2.2. Inibidores da membrana celular 6
2.2.1. Polimixinas 7
2.2.2. Lipopeptídeos 7

2.3. Inibição da síntese proteica 8
2.3.1. Fenicóis 9
2.3.2. Aminoglicosídeos 9
2.3.3. Oxazolidinonas 10
2.3.4. Tetraciclinas 10
2.3.5. Macrólidos 11

2.4. Inibição da síntese dos ácidos nucleicos 11
2.4.1. Quinolonas 12

2.5. Inibição de vias metabólicas essenciais 12
2.5.1. Sulfonamidas 13
2.5.2. Trimetoprim 13

3. Resistência aos antibióticos 13

3.1. Resistência intrínseca e adquirida 14

3.2. Processos de transferência genética horizontal 15
3.2.1. Conjugação 15
3.2.2. Transdução 15

3.2.3. Transformação 16
3.3. Mecanismos gerais de resistência aos antibióticos 16
3.3.1. Alteração da permeabilidade da membrana 17
3.3.2. Bombas de efluxo 17
3.3.3. Modificação do alvo do antibiótico 17
3.3.4. Inativação do antibiótico 18
3.4. Mecanismos de resistência por classe de antibióticos 18
3.4.1. β-lactâmicos 18
3.4.2. Polimixinas 19
3.4.3. Quinolonas 20
3.5. Importância dos elementos genéticos móveis na disseminação da resistência 21
3.5.1. Plasmídeos 21
3.5.2. Transposões 21
3.5.3. Sequências de inserção 22
3.5.4. Integrões 22
4. One Health 22
5. Reservatórios de genes de resistência aos antibióticos 23
5.1. Humano 24
5.2. Animais (cadeia alimentar e selvagens) 25
5.3. Meio ambiente (água e solos) 26
6. Objectivos 27
II. Metodologia 28
1. Amostragem e identificação bacteriana 28
2. Caracterização fenotípica da suscetibilidade aos antibióticos 28
2.1. Teste de suscetibilidade aos antibióticos por difusão em disco (TSA) 28
2.2. Determinação da concentração inibitória mínima por microdiluição 31
3. Caracterização genotípica da suscetibilidade aos antibióticos 32
3.1. Extração de DNA 32
3.2. Deteção de genes de resistência aos antibióticos 32
3.3. Eletroforese em gel de agarose 37
3.4. Purificação dos produtos de PCR 37
3.5. Sequenciação nucleotídica de Sanger 38
4. Transferência de material genético por conjugação 38
5. Determinação da clonalidade e diversidade genética 39
6. Sequenciação Total do Genoma 40
III. Resultados 42
1. Identificação das espécies bacterianas presentes nos diferentes reservatórios 42

2. Caracterização fenotípica 43
3. Caracterização genotípica por PCR e sequenciação de Sanger 46
4. Conjugação 49
5. *Multilocus Sequence Typing* (MLST) 49
6. Sequenciação total do genoma (WGS) 50
6.1. Resistoma, viruloma e mobiloma 53
6.2. Relação filogenética 53
IV. Discussão 57
V. Conclusão 63
VI. Referências 65
VII. Anexos 83

Índice de Figuras

Figura I.1. Alvos de ação dos antibióticos 2
Figura I.2. Semelhança estrutural entre a penicilina e o terminal D-Ala-D-Alanina do peptidoglicano 3
Figura I.3. Estrutura da membrana celular das bactérias de Gram negativo e de Gram positivo 6
Figura I.4. Esquema representativo do processo de conjugação……...15
Figura I.5. Esquema representativo do processo de transdução……16
Figura I.6. Esquema representativo do processo de transformação…….....16
Figura I.7. Áreas de abrangência do conceito One Health.....23
Figura I.8. Reservatórios de genes de resistência aos antibióticos 24
Figura II.1. Esquema e interpretação da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição..... 32
Figura III.1. Distribuição das estirpes de *E. cloacae* complex pelos diferentes reservatórios. 43
Figura III.2. Distribuição dos fenótipos observados nas diferentes estirpes. 44
Figura III.3. Distribuição dos tipos de sequência (ST) identificados por reservatório ambiental 50
Figura III.4. Árvore filogenética dos genomas de *E. cloacae* complex obtidos por WGS……54

Índice de tabelas

Tabela I.1. Classes de antibióticos β-lactâmicos, subclasses, exemplos e estrutura química.....3
Tabela II.1. Características dos discos de antibióticos utilizados e respetivos diâmetros críticos. 29
Tabela II.2. Testes fenotípicos complementares realizados para a deteção de β-lactamases.....30
Tabela II.3. Características dos *primers* usados para a amplificação dos genes que codificam carbapenemases das classes A e D.....33
Tabela II.4. Características dos *primers* usados para a amplificação dos genes que codificam carbapenemases da classe B e os genes de resistência à colistina (*mcr-1/2*).....33
Tabela II.5. Características dos *primers* usados para a amplificação dos genes que codificam para as carbapenemases da classe B VIM dos grupos I e II e IMP. 34
Tabela II.6. Características dos *primers* usados para a amplificação dos genes de resistência à colistina. 34
Tabela II.7. Características dos *primers* usados para a amplificação dos genes que codificam β-lactamases de espetro alargado. 34
Tabela II.8. Características dos *primers* usados para a amplificação dos genes que codificam β-lactamases de espetro alargado do tipo CTX-M. 35
Tabela II.9. Características dos *primers* usados para a amplificação dos genes que codificam β-lactamases do tipo AmpC.....35
Tabela II.10. Características dos *primers* usados para amplificar os genes que codificam para resistência às quinolonas 36
Tabela II.11. Características dos *primers* usados para a amplificação dos genes que codificam integrases das classes I, II e III 36
Tabela II.12. Características dos *primers* usados para a confirmação de alguns resultados obtidos em PCR's anteriores e para obter uma sequência mais completa no caso do gene $bla_{\text{ACT-tipo}}$. 37
Tabela II.13. Características dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes pertencentes ao MLST de *Enterobacter* spp. 40
Tabela II.14. Ferramentas bioinformáticas utilizadas para a análise dos *contigs* obtidos na sequenciação total do genoma 41
Tabela III.1. Distribuição dos isolados por coloração de Gram, género/espécie e por reservatório. ...42
Tabela III.2. Suscetibilidade aos antibióticos das 29 estirpes de *E. cloacae* complex, por reservatório ambiental. 45
Tabela III.3. Genes de resistência identificados nas diferentes estirpes de *E. cloacae* complex, obtidos por PCR e sequenciação. 47
Tabela III.4. Substituições aminoacídicas observadas nas diferentes variantes da proteína ACT relativamente à proteína de referência 48
Tabela III.5. Associação entre o ST e o respetivo perfil alélico para os 5 ST's identificados nas 29 estirpes de *E. cloacae* complex. 49
Tabela III.6. Quadro resumo dos resultados obtidos na análise bioinformática da sequenciação total do genoma. 51
Tabela III.7. Matriz de distâncias calculada utilizando os valores de SNPs. 55

Lista de siglas e abreviaturas

ABC (*Adenosine triphosphate-binding cassette family*)

and microbial genome diversity)

AmpC (*AmpC β-lactamase*)

ARG (*Antibiotic resistance genes*

/genes de resistência a antibióticos)

ATCC (*American Type Culture Collection*)

ATP (*Adenosine triphosphate*)

BHI (*Brain heart infusion*)

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)

CARD (*The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*)

CIM (Concentração inibitória mínima)

CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*)

CTX-M (*Cefotaximase-Munich*)

Dab (ácido diaminobutírico)

D-Ala-D-Ala (D-alanil-D-alanina)

dATP (*2'-Deoxy-adenosine-5'-triphosphate*)

dCTP (*2'-Deoxy-cytidine-5'-triphosphate*)

dGTP (*2'-Deoxy-guanosine-5'-triphosphate*)

DNA (*Deoxyribonucleic acid*)

dNMPs (*2'-Deoxyadenosine 5'-monophosphate*)

dNTPs (*deoxyribose nucleotide triphosphates*)

dTTP (*2'-Deoxy-thymidine-5'-triphosphate)*

EGM/MGE (Elementos genéticos móveis/*Mobile genetic elements*)

ESBL (*Extended spectrum β-lactamase)*

EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

FRI (*French Imipenamase*)

GES (*Guyana extended-spectrum-β-lactamase)*

IMI (*Imipenem-hydrolysing β-lactamase*)

IMP (*Imipenamase*)

INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge)

IPAC (Instituto Português da Acreditação)

IR (*Inverted repeat/* repetições invertdias)

IS (*Insertion sequence/*sequências de inserção)

KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*)

L-Ara4N (4-amino-4-deoxi-L-arabinose)

LNR-RA/IACS (Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde)

LPS (*Lipopolysaccharide*/lipopolissacarídeo)

MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*/Dessorção Ionização Assistida por Matriz - Tempo de Voo)

MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion family*)

MBL (*Metallo-β-lactamase*)

mcr (*Mobile colistin resistance*)

MDR (*Multiple drug resistance*)

MFS (*Major facilitator superfamily*)

MITE (*Miniature Inverted-repeat Transposable Elements*)

MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*)

MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

NCTC (*National Collection of Type Strains*)

NDM (*New Delhi metallo-β-lactamase*)

NMC-A (*Non-metallo-carbapenemase of class A*)

OMP-F (*outer membrane protein F*)

OMS (Organização Mundial de Saúde)

ORF (*Open reading frame*)

OXA (*Oxacilinase*)

PCR (*Polymerase chain reaction*)

pEtN (*phosphoethanolamine*/fosfoetanolamina)

pH (*potential of hydrogen*)

PLP (proteínas de ligação à penicilina)

PMAB (*Plasmid-mediated AmpC β-lactamases*)

PMCR (*Plasmid-mediated colistin resistance*)

PMQR (*Plasmid-mediated quinolone resistance*)

PubMLST (*Public databases for molecular typing*)

QRDR (*Quinolone resistance-determining regions*)

RCF (*Relative centrifugal force*)

RNA (*Ribonucleic acid*)

RND (*Resistance nodulation cell division family*)

ROS (*Reactive oxygen species/* espécies reativas de oxigénio)

rRNA (*Ribossomal ribonucleic acid*)

SARS (*Severe acute respiratory syndrome*)

SHV (*Sulfhydryl reagent variable*)

SMR (*Super multidrug resistance family*)

SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*)

ST (*Sequence type*)

TBE (*Tris-Borate-EDTA*)

TEM (Temoneira)

THF (Tetrahidrofolato)

tRNA (*Transfer ribonucleic acid*)

TSA (Teste de suscetibilidade aos antibióticos por difusão em disco)

TSB (*Trypticase soy broth*)

UDP-MurNAc (*Uridine diphosphate N-acetylmuramic acid*)

VIM (*Verona integron-encoded Metallo-β-lactamase*)

VRE (*Vancomycin-resistant Enterococci*)

WGS (*Whole genome sequencing*)

I. Introdução

1. Os Antibióticos

Um antibiótico é uma substância química, que pode ser de origem natural ou sintética, e que tem a capacidade de inibir o crescimento ou destruir por completo uma bactéria, interferindo com estruturas ou processos que são essenciais à sobrevivência destes microrganismos. A ação de um antibiótico é seletiva, afetando apenas os microrganismos alvo (Laskin, 2003; Yoneyama & Katsumata, 2006).

A descoberta dos antibióticos foi uma das grandes inovações do século XX, revolucionando a medicina. Tornou possível o tratamento de doenças infeciosas que causavam uma elevada mortalidade e morbilidade no passado, proporcionou condições para o avanço de vários procedimentos médicos (como a transplantação de órgãos, tratamento de vários tipos de tumores e cirurgias cardíacas), levando ao aumento da esperança média de vida (Davies, 2006; Hutchings *et al.*, 2019).

Em 1907, Paul Ehrlich propôs o conceito de quimioterapia e sintetizou o primeiro agente antibacteriano, o composto 606 (Salvarsan), obtendo assim a sua "bala mágica". Este composto, o Salvarsan, apesar de não ser eficaz contra a grande maioria das infeções bacterianas, foi o primeiro fármaco eficaz no tratamento da sífilis causada pela bactéria *Treponema pallidum*. Este fármaco entrou no mercado em 1910 e permaneceu como a medicação mais frequentemente prescrita, em conjunto com o seu derivado Neosalvarsan, uma alternativa eficaz e menos tóxica, até ser substituído pela penicilina, descoberta em 1928 por Alexander Fleming. A penicilina foi colocada no mercado em 1940, na sequência do desenvolvimento de um método para a sua produção em larga escala (Bennett & Chung, 2001; Aminov, 2010).

Entre os anos 50 e 70 do século XX decorreu a época dourada, em que foram descobertas a maioria das classes de antibióticos conhecidas atualmente, sendo derivados de produtos naturais ou produzidos a partir da modificação sintética dos produtos naturais. Estes antibióticos forneceram a base estrutural para as subsequentes modificações químicas que permitiram expandir o espetro de ação e a potência dos antibióticos nos anos seguintes (Adedeji, 2016; Overbye & Barrett, 2005).

Nos últimos anos tem ocorrido um declínio na descoberta de novos antibióticos, devido à falta de investimento por parte das indústrias farmacêuticas; na maior parte dos casos abandonaram completamente esta área devido à maior rentabilidade de outros fármacos (por exemplo, para o tratamento de doenças crónicas), que implicam um tratamento de longa duração. No caso das doenças infeciosas, o tratamento decorre apenas num curto período de tempo, e os novos antibióticos que surgem são reservados para infeções que as terapêuticas pré-estabelecidas não conseguem tratar, limitando o retorno económico inicial (Spellberg, 2014; Fair & Tor, 2014).

No que diz respeito ao desenvolvimento de novos antibióticos, um dos grandes desafios tem sido a penetração da membrana bacteriana, particularmente no caso das bactérias de Gram negativo. Estas bactérias são naturalmente resistentes a muitos antibióticos, devido 1) às suas membranas externa e interna, as quais impedem a entrada de moléculas anfipáticas (moléculas que apresentam características hidrofílicas e hidrofóbicas); e 2) à presença de bombas de efluxo ativas que reconhecem moléculas altamente hidrofóbicas (Fair & Tor, 2014).

2. Classificação dos antibióticos e respetivos mecanismos de ação

Os antibióticos podem ser classificados com base em diferentes critérios, entre os quais se destacam os seus mecanismos de ação, espetros de ação, tipo de atividade, e estruturas químicas. Quanto ao seu modo de ação os antibióticos podem ser classificados em bacteriostáticos, caso estes inibam o crescimento bacteriano, ou bactericidas, quando causam a morte da bactéria. Os antibióticos afetam processos que são essenciais à multiplicação da célula bacteriana, podendo também comprometer a sua sobrevivência (Etebu & Arikekpar, 2016). De acordo com a sua estrutura alvo na célula bacteriana, os antibióticos poderão ser classificados em inibidores da síntese da parede celular, inibidores da membrana celular, inibidores da síntese de ácidos nucleicos, inibidores da síntese proteica e bloqueio de vias metabólicas essenciais (Bakheet & Doig, 2010) (Figura I.1).

O critério mais utilizado para classificar os antibióticos é a estrutura química, uma vez que os que apresentam uma estrutura química semelhante, apresentam também padrões de atividade, efetividade e toxicidade semelhantes, destacando-se, entre as principais classes, os β-lactâmicos, macrólidos, tetraciclinas, quinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas, entre outros (Hutchings *et al*., 2019).

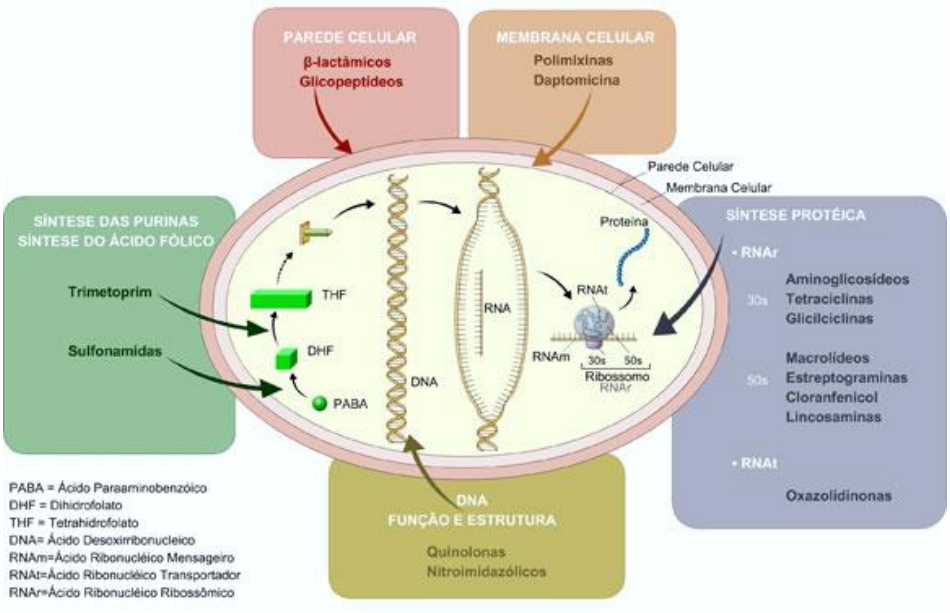


Figura I.1. Alvos de ação dos antibióticos (Adaptado de: Ribeiro, 2018)

2.1. Inibição da síntese da parede celular

A parede celular é uma estrutura que permite à célula bacteriana manter a sua forma, mesmo em condições adversas, e proteger a célula de alterações da pressão osmótica. Esta estrutura é composta por cadeias de peptidoglicano que são constituídas por monómeros alternados de N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico, sendo que este último constituinte apresenta pequenos péptidos ligados, responsáveis pela ligação cruzada entre as cadeias de peptidoglicano (Babic *et al*., 2006).

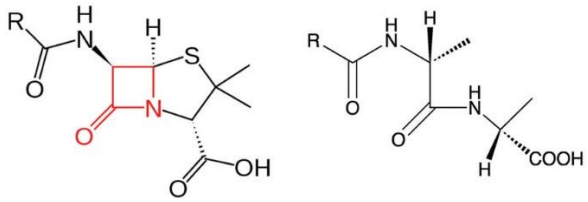
O peptidoglicano constitui uma molécula essencial para a síntese da nova parede celular, sendo importante para a sobrevivência da bactéria. A síntese do peptidoglicano envolve três fases: na primeira fase são sintetizados os precursores do peptidoglicano, que na segunda fase são incorporados na molécula lípido II, responsável pelo seu transporte do citoplasma para a parede celular. Na terceira fase, os percursores são integrados na rede de peptidoglicano já existente. Este mecanismo funciona através da ação das enzimas de ligação à penicilina (PLPs), essencialmente transglicosilases e transpeptidases, que são responsáveis pela adição de monómeros às cadeias de peptidoglicano e pela ligação cruzada

entre as várias cadeias imaturas (Sarkar *et al*., 2017). Alguns antibióticos, especialmente os glicopeptídeos, inibem a síntese da cadeia de peptidoglicano ligando-se aos monómeros e bloqueando a ação das enzimas PLP (Sarkar *et al*., 2017). Os β-lactâmicos também podem atuar ativando uma autolisina endógena da bactéria que irá degradar o peptidoglicano (Suárez & Gudiol, 2009).

2.1.1. Antibióticos β-lactâmicos

Os antibióticos β-lactâmicos foram descobertos na década de 30 e vieram revolucionar por completo a luta contra as infeções bacterianas. Estes constituem a classe de antibióticos que é mais prescrita na atualidade e apresentam na sua estrutura um anel β-lactâmico, que é um anel heterocíclico, constituído por três átomos de carbono e um átomo de nitrogénio, tornando estes altamente reativos (Lima *et al*., 2020).

Os β-lactâmicos possuem uma ação bactericida, atuando ao nível da síntese da parede celular. Estes antibióticos possuem uma estrutura que mimetiza o terminal D-Ala-D-Ala do peptidoglicano (Figura I.2), ligando-se covalentemente às proteínas de ligação à penicilina (PLPs), enzimas que são importantes para a ligação cruzada entre as cadeias de peptidoglicano, um dos constituintes fundamentais da parede celular, levando à morte da bactéria (Guimarães *et al*., 2010).

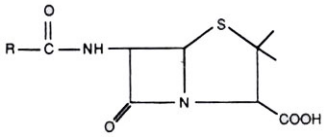


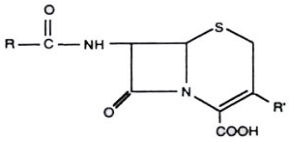
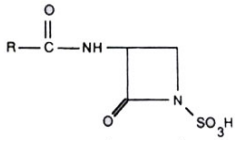
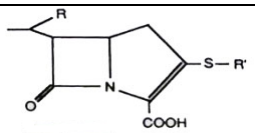
Penicilina **D-Ala-D-Alanina**

Figura I.2. Semelhança estrutural entre a penicilina e o terminal D-Ala-D-Alanina do peptidoglicano (Adaptado de Zeng *et al*., 2013)

Alguns exemplos desta classe de antibióticos são as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactames e os carbapenemes (Tabela I.1).

Tabela I.1. Classes de antibióticos β-lactâmicos, subclasses, exemplos e estrutura química

Classe	Subclasse	Exemplo	Estrutura química (Classe)
Penicilinas	Penicilinas	Penicilina	
	Aminopenicilinas	Amoxicilina, Ampicilina	
	Ureidopenicilinas	Piperacilina	
	Carboxipenicilinas	Ticarcilina	
	Penicilinas resistentes às penicilinases	Cloxacilina, Meticilina, Oxacilina	
	Amidinopenicilina	Meciliname	
Cefemes	Cefalosporinas 1ªgeração	Cefalotina, Cefazolina	

Classe	Subclasse	Exemplo	Estrutura química (Classe)
	Cefalosporinas 2ªgeração	Cefuroxima	
	Cefalosporinas 3ªgeração	Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftriaxona	
	Cefalosporinas 4ªgeração	Cefepima	
	Cefamicina	Cefoxitina	
Monobactames	-	Aztreonam	
Carbapenemes	Carbapenemes	Ertapeneme, Imipeneme, Meropeneme	

2.1.2. Penicilinas

A penicilina G foi o primeiro antibiótico a ser descoberto, em 1928, por Alexander Fleming, um bacteriologista inglês que obteve esta substância a partir do fungo *Penicillium notatum* que habita o solo (Miller, 2002). As penicilinas são constituídas por um anel β-lactâmico de ácido 6-amino-penicilânico, que se encontra ligado a um anel de tiazolidina que possui um grupo amina livre (Tabela I.1). O anel β-lactâmico possui uma cadeia lateral que varia consoante o tipo de penicilina (Marin & Gudiol, 2003). As penicilinas encontram-se divididas em 4 categorias: as penicilinas naturais, as penicilinas resistentes à penicilinase, as aminopenicilinas, que possuem um grupo amina, e as penicilinas de espetro alargado (King *et al*, 2017). As penicilinas naturais são principalmente eficazes contra bactérias aeróbias de Gram positivo, tais como, as pertencentes ao género *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. As penicilinas mais recentes, como as penicilinas resistentes à penicilinase e as de espetro alargado, possuem um espetro de ação mais amplo, sendo também eficazes no tratamento de infeções causadas por algumas espécies de bactérias de Gram negativo (Miller, 2002).

2.1.3. Cefalosporinas

A primeira cefalosporina a ser descoberta foi a cefalosporina C, que foi isolada de fungos do género *Acremonium*. No entanto, as cefalosporinas que se encontram em uso na clínica são de origem semi-sintética (Page, 2012). As cefalosporinas apresentam uma estrutura muito semelhante à apresentada pelas penicilinas, possuindo no núcleo um anel de ácido 7-amino-cefalosporânico ligado a um anel de dihidrotiazina (Tabela I.1). As cefalosporinas encontram-se subdivididas em 5 gerações de acordo com o seu espetro de ação (Demain & Elander, 1999).

A primeira geração de cefalosporinas é predominantemente ativa contra bactérias de Gram positivo, detendo um espetro de ação muito curto. A segunda geração de cefalosporinas tem algumas vantagens em relação à primeira geração, possuindo um espetro de ação que também já inclui algumas bactérias de Gram negativo, com exceção de bactérias anaeróbias, sendo também mais resistente à ação das β-lactamases. As cefalosporinas de terceira geração já são eficazes contra a maioria das bactérias de Gram negativo, são mais resistentes à ação das β-lactamases, e mais eficazes relativamente às gerações anteriores. As cefalosporinas de quarta geração são as que apresentam um espetro de ação mais alargado,

sendo bastante eficazes no tratamento de infeções causadas tanto por bactérias de Gram positivo como de Gram negativo, possuindo também uma maior resistência à ação das β-lactamases que a terceira geração (Mehta & Sharma, 2016; Van Hoek *et al*., 2011).

2.1.4. Monobactames

Os monobactames foram descobertos na bactéria *Chromobacterium violaceum* e são β-lactâmicos monocíclicos, pois estes não apresentam nenhum anel ligado ao anel β-lactâmico (Tabela I.1), sendo resistentes à ação de algumas β-lactamases (Etebu & Arikekpar, 2016). Esta subclasse é apenas ativa contra bactérias de Gram negativo, não sendo ativa contra bactérias de Gram positivo e anaeróbias. O único exemplar desta subclasse que está comercialmente disponível é o aztreoname (Page, 2011).

2.1.5. Carbapenemes

Os carbapenemes são a classe de β-lactâmicos mais eficaz, possuindo um espetro de ação mais alargado, sendo eficazes tanto contra bactérias de Gram negativo como de Gram positivo. Este espetro de ação alargado está relacionado com um grupo trans-α-1-hidroxietil na posição 6 (Tabela I.1), o que os torna intrinsecamente resistentes à maioria das β-lactamases (Zhanel *et al*., 2007). Estes são considerados antibióticos de último recurso, sendo apenas utilizados no tratamento de infeções graves ou quando há a suspeita do paciente ser portador de uma bactéria multirresistente (Wallace *et al*., 2011). Os carbapenemes diferem na sua estrutura dos outros β-lactâmicos havendo a substituição de um dos carbonos do anel secundário por um átomo de enxofre e uma ligação insaturada entre os carbonos 2 e 3 do anel secundário. Esta classe de β-lactâmicos, ao contrário das restantes é estável à ação das β-lactamases de espetro alargado (ESBLs) e do tipo AmpC (Nicolau, 2007).

2.1.6. Glicopeptídeos

Esta classe de antibióticos foi descoberta nos anos 50, com a vancomicina, produzida pelo actinomicete *Streptomyces orientalis,* a ser o primeiro introduzido na clínica (Kang & Park, 2015). Após 30 anos, foi descoberto um outro glicopeptídeo, a teicoplanina (Van Hoek *et al*., 2011).

Os glicopeptídeos podem ser naturais ou semissintéticos; possuem no núcleo um heptapéptido tricíclico ou tetracíclico, que normalmente se encontra glicosilado, e ao qual, estão ligados 2 açucares, no caso dos naturais, e cadeias de ácidos gordos, átomos de cloro ou açucares, no caso dos semissintéticos (Butler *et al*., 2014). Estes antibióticos intervêm nas últimas fases da síntese do peptidoglicano, sendo o seu principal alvo as extremidades D-alanil-D-Alanina dos pentapéptidos precursores do peptidoglicano da parede celular. Os glicopeptídeos ligam-se a esta extremidade através de 5 pontes de hidrogénio, impedindo que as transpeptidases e transglicosilases, enzimas importantes para a síntese do peptidoglicano, consigam atuar (Bambeke *et al*., 2004).

Os glicopeptídeos são considerados antibióticos de último recurso para tratar infeções causadas por bactérias de Gram positivo, sendo pouco eficazes contra bactérias de Gram negativo, devido à existência da membrana externa que as torna mais impermeáveis (Binda *et al*., 2014).

2.2. Inibidores da membrana celular

As bactérias de Gram negativo são mais resistentes à ação dos antibióticos, pois apresentam uma membrana externa na parede celular, ao contrário das bactérias de Gram positivo, tornando-as mais impermeáveis a estes agentes (Denyer & Maillard, 2002) (Figura I.3). Vários antibióticos, especialmente os polipeptídicos (por exemplo, a colistina), promovem alterações na permeabilidade da membrana externa.

A membrana externa, devido à assimetria na sua constituição, constitui uma barreira à entrada de antibióticos e detergentes. Devido à presença de lípidos com cadeias acil saturadas, a camada externa da membrana é extremamente hidrofóbica. As porções lipídicas e sacarídicas do lipopolissacarídeo (LPS) e dos fosfolípidos possuem cargas negativas, o que permite que se estabeleçam ligações intermoleculares através de ligação de catiões divalentes, que tornam a membrana impenetrável (May & Grabowicz, 2018). A membrana externa é mais permeável à passagem de moléculas do que a membrana citoplasmática devido à existência de numerosas proteínas membranares, como as porinas, que permitem a entrada para o interior da célula de pequenas moléculas, possuindo recetores para várias moléculas (Delcour, 2009).

Algumas classes de antibióticos, como as polimixinas e os lipopeptídeos (por exemplo, a daptomicina), atuam ao nível da membrana celular levando a alterações ao nível da sua permeabilidade e à consequente desintegração. Estes antibióticos são normalmente constituídos por grupos básicos (NH_3^+) e por uma cadeia lateral de ácidos gordos. Quando atingem a membrana, a sua parte lipídica de ácidos gordos é inserida no interior da membrana, enquanto a parte básica permanece na superfície. A intercalação destas moléculas irá desestabilizar a membrana, levando à saída dos componentes celulares e à morte da bactéria (Hancock, 2005).

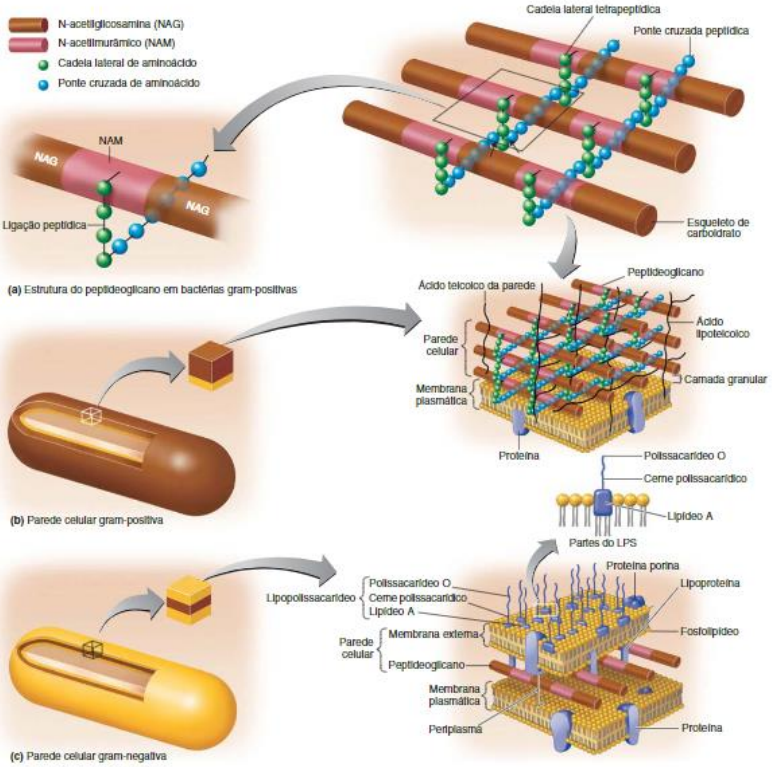


Figura I.3. Estrutura da membrana celular das bactérias de Gram negativo e de Gram positivo (Tortora *et al*., 2017)

2.2.1. Polimixinas

As polimixinas foram descobertas nos anos 40 do século XX e são derivados de várias espécies do género *Bacillus* (Vaara, 2010; Falagas *et al*., 2010; Landman *et al*., 2008). São antibióticos polipeptídicos catiónicos com uma longa cauda hidrofóbica (Arnold *et al.*, 2007). São bactericidas, seletivamente tóxicos para bactérias de Gram negativo, devido à sua especificidade para as moléculas de lipopolissacarídeo (LPS) que existem nas suas membranas externas, neutralizando assim a toxicidade da bactéria e causando morte celular bacteriana. Resumidamente, a ocorrência de uma interação eletrostática entre o resíduo de ácido diaminobutírico (Dab) das polimixinas, que possui carga positiva, e o lípido A, um dos constituintes do LPS da membrana, que tem carga negativa, leva à remoção dos iões Ca^{2+} e Mg^{2+} que se encontram ligados ao lípido A e que são importantes para a estabilidade da membrana. Dá-se uma desestabilização do LPS, levando a um aumento da permeabilidade da membrana, o que tem como consequência a saída do conteúdo citoplasmático, culminando na morte da bactéria (Li & Velkov, 2019; Poirel *et al*., 2017).

As bactérias de Gram positivo apresentam assim uma resistência natural contra esta classe de antibióticos, devido ao facto de não possuírem membrana externa (Vaara, 2010). Assim, exercem a sua ação apenas ao nível da membrana externa das bactérias de Gram negativo, apresentando um espetro de atividade curto (Velkov *et al*., 2013). De facto, algumas bactérias de Gram negativo também são intrinsecamente resistentes, devido a modificações no lipopolissacarídeo, que levam a que haja uma menor afinidade para as polimixinas devido ao aumento da carga do LPS; por exemplo em *Proteus mirabilis* e *Serratia marcescens* a resistência natural à colistina deve-se à expressão do operão *arnBCADTEF* e do gene *eptB*, respetivamente, o que leva à adição de 4-amino-4-deoxi-L-arabinose (L-Ara4N) e fosfoetanolamina (pEtN) ao lipopolissacarídeo (LPS)(moléculas com carga positiva), o que leva a um aumento da carga do LPS e a uma diminuição da afinidade das polimixinas para este (Kaye *et al*., 2016; Aghapour *et al*., 2019).

A colistina e a polimixina B são os únicos antibióticos da classe das polimixinas que estão atualmente em uso. São constituídas por um heptapéptido cíclico ao qual está ligada uma cadeia lateral (tripéptido) que está acilada por ácidos gordos; diferem apenas no aminoácido presente na posição 6 do heptapéptido: uma D-fenilalanina na polimixina B, e uma D-leucina na colistina. Apresentam uma natureza anfipática por possuírem regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, o que contribui para a sua ação bactericida (Yu *et al*., 2015). São consideradas antibióticos de último recurso devido à sua elevada nefrotoxicidade. Deixaram de ser utilizadas nos anos 70, no entanto, o surgimento de bactérias resistentes à maioria dos antibióticos disponíveis levou a um novo interesse nas polimixinas, muitas vezes os únicos antibióticos eficazes no tratamento de algumas infeções, especialmente as causadas por bactérias multirresistentes de Gram negativo (Poirel *et al*., 2017; Olaitan *et al.*, 2014; Kelesidis & Falagas, 2015).

2.2.2. Lipopeptídeos

Os lipopeptídeos são constituídos por uma cadeia peptídica linear ou cíclica com uma carga global negativa ou positiva, à qual estão ligados covalentemente ácidos gordos no terminal amina (Straus & Hancock, 2006).

A daptomicina foi o primeiro membro da classe dos lipopeptídeos cíclicos a ser aprovada para uso clínico. É um antibiótico semissintético, descoberto nos anos 80 ao adicionar ácido decanóico ao meio de crescimento de *Streptomyces roseosporus*, sendo produzido por um processo fermentativo (Vilhena & Bettencourt, 2012). Este antibiótico é altamente solúvel em água devido à sua natureza acídica e

carga negativa em pH neutro; a presença de caudas lipídicas e de alguns aminoácidos hidrofóbicos também conferem a estes antibióticos propriedades anfipáticas, as quais favorecem a interação com os fosfolípidos da membrana plasmática, potenciando a sua atividade bactericida (Vilhena & Bettencourt, 2012).

A daptomicina é bastante eficaz no tratamento de infeções causadas por bactérias de Gram positivo, atuando na membrana plasmática, sendo que as bactérias de Gram negativo são intrinsecamente resistentes devido à incapacidade da daptomicina de atravessar a membrana externa (Baltz *et al*., 2005; Baltz, 2009). Este antibiótico atua em vários níveis na célula bacteriana, afetando a síntese da parede celular, proteínas, DNA, RNA e do ácido lipoteicóico, além de causar a dissipação do potencial de membrana, o que leva à sua despolarização (Bionda *et al*., 2013; Straus & Hancock, 2006). Apesar do mecanismo de ação da daptomicina ainda não estar completamente elucidado, pensa-se que ocorre uma interação eletrostática entre a daptomicina e o fosfatidilglicerol, um dos fosfolípidos da membrana plasmática. Há a inserção deste antibiótico na membrana plasmática e a sua oligomerização, num mecanismo que é dependente de iões cálcio, levando à formação de poros, o que afeta a integridade da membrana ocorrendo a despolarização da membrana devido à saída de iões potássio, magnésio, ATP e outros componentes intracelulares, culminando na morte da bactéria (Vilhena & Bettencourt, 2012; Baltz, 2009; Heidary *et al*., 2017).

2.3. Inibição da síntese proteica

A síntese proteica é um processo essencial para que sejam produzidas todas as proteínas que constituem um organismo. Este processo ocorre ao nível dos ribossomas que são organelos constituídos por 2 subunidades (Lin *et al*., 2018). Os ribossomas bacterianos são do tipo 70S, sendo constituídos pelas subunidades 30S e 50S. A subunidade 30S (subunidade pequena) é constituída por RNA ribossomal 16S e por 20 proteínas diferentes, enquanto, a subunidade 50S (subunidade grande) é constituída por RNA ribossomal 23S e 5S e por 34 proteínas diferentes (Poehlsgaard & Douthwaite, 2005).

No ribossoma existem 4 locais de ligação: um local onde se liga o RNA mensageiro que irá ser traduzido, o local A onde se ligam os RNAs de transferência (tRNAs) que carregam os aminoácidos que serão adicionados à cadeia polipeptídica, o local P onde está ligado o tRNA que carrega a cadeia polipeptídica nascente e o local E (local de saída) onde saem do ribossoma os tRNAs que já não carregam aminoácidos. O processo de síntese de proteínas está dividido em 3 fases: a iniciação, a elongação e a terminação (Arenz & Wilson, 2016).

Os antibióticos que atuam ao nível da síntese proteica podem ser divididos em duas categorias, de acordo com a subunidade ribossomal que é inibida: inibidores 30S e inibidores 50S (Sutcliffe, 2005). Os inibidores da subunidade 50S do ribossoma exercem a sua ação bloqueando as fases de iniciação e elongação da síntese proteica. Como exemplos, temos a classe das oxazolidinonas, que bloqueiam a fase de iniciação; os macrólidos, que bloqueiam a fase de elongação; e os fenicóis que bloqueiam tanto a fase de iniciação bem como a fase de elongação. Os inibidores da subunidade 30S ribossomal bloqueiam o acesso dos tRNAs, que carregam os aminoácidos que irão ser adicionados à cadeia polipeptídica, no ribossoma; como exemplos, temos as classes dos aminoglicosídeos e das tetraciclinas (Etebu & Arikekpar, 2016).

2.3.1. Fenicóis

Os fenicóis são derivados do ácido dicloroacético, sendo constituídos por um núcleo aromático, ao qual está ligado um grupo alquilo e uma cadeia lateral de aminopropanediol (García *et al*., 2007). O cloranfenicol é o principal representante desta classe, tendo sido isolado a partir da bactéria *Streptomyces venezuelae*. Devido à sua estrutura química simples, este foi o primeiro antibiótico a ser produzido através de síntese química em larga escala (Roberts & Schwarz, 2016). O cloranfenicol liga-se à região peptidil-transferase da subunidade 50S ribossomal, competindo com a terminação 3' do aminoacil tRNA pelo local A, inibindo a formação da ligação peptídica entre os aminoácidos, comprometendo as fases de elongação e terminação da síntese proteica (García *et al*., 2007; Schwarz & White, 2014). Estes antibióticos têm essencialmente um efeito bacterioestático, embora em algumas espécies como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis* apresente uma ação bactericida (Wareham & Wilson, 2002).

Possuem um espetro de ação amplo, exercendo atividade contra bactérias de Gram negativo, de Gram positivo, bactérias anaeróbias, aeróbias, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Rickettsia*, entre outras. No entanto, devido a alguns efeitos adversos, como, por exemplo, anemia aplásica e supressão da medula óssea, e a disponibilidade de outros antibióticos menos tóxicos e com um espetro de atividade semelhante, levou a que este antibiótico seja apenas utilizado no tratamento de infeções graves (Schwarz *et al*., 2016). Esta toxicidade deve-se à presença de um grupo nitro na estrutura química do cloranfenicol, sendo que a substituição deste grupo por um grupo metilsulfonil deu origem a um derivado do cloranfenicol, o tianfenicol (Epaulard & Brion, 2010).

2.3.2. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são uma classe de antibióticos naturais e semissintéticos, que surgiram nos anos 40, são antibióticos de largo espetro e atuam através da inibição da síntese proteica, ligando-se à subunidade 30S do ribossoma bacteriano. Os aminoglicosídeos foram inicialmente obtidos a partir de bactérias do género *Streptomyces* e *Micromonospora*, sendo que o primeiro elemento deste grupo a ser descoberto foi a estreptomicina em 1943, a partir de culturas de *Streptomyces griseus* (Fosso *et al*., 2014).

Os compostos deste grupo de antibióticos são constituídos por um anel aminociclitol, que, na maioria dos casos, é a streptamina ou a 2-deoxistreptamina, ao qual estão ligados radicais amina ou hidroxilo; são classificados em 4 subclasses de acordo com o tipo de anel aminociclitol presente na sua estrutura. O núcleo aminociclitol encontra-se conectado por ligações glicosídicas a vários açucares aminados, apresentando uma natureza policatiónica (Shakil *et al*., 2007; Krause *et al*., 2016).

Os aminoglicosídeos inibem a síntese proteica, na fase de elongação, ligando-se ao local A da subunidade ribossomal 30S. Esta ligação causa uma alteração da conformação, levando a uma leitura incorreta dos codões do RNA mensageiro; assim, os tRNAs irão carregar os aminoácidos incorretos a serem integrados na cadeia polipeptídica nascente. A cadeia polipeptídica deficiente formada irá ser integrada na membrana plasmática formando canais, alterando a permeabilidade da membrana e favorecendo a entrada de mais antibiótico, além de estimular a formação de radicais livres, potenciando a atividade bactericida. Além deste mecanismo, os aminoglicosídeos também se podem ligar à subunidade 50S, interferindo na transferência dos tRNAs do local A para o local P do ribossoma e na reciclagem dos ribossomas (Serio *et al*., 2017; Jackson *et al*., 2013; Fosso *et al*., 2014).

Estes antibióticos apresentam um espetro de ação alargado, apresentando eficácia tanto contra bactérias de Gram negativo como de Gram positivo, sendo particularmente importantes no combate a bactérias da família *Enterobacteriaceae* (Jackson *et al*., 2013; Krause *et al*., 2016).

2.3.3. Oxazolidinonas

As oxazolidinonas são antibióticos totalmente sintéticos, apresentando uma estrutura única. São bastante ativos contra bactérias multirresistentes de Gram positivo, tendo uma ação limitada no combate a bactérias de Gram negativo devido à presença de bombas transmembranares que bombeiam estes antibióticos para fora da célula antes que estes consigam atingir o seu alvo (Diekema & Jones, 2001; Barbachyn & Ford, 2003; Pandit *et al*., 2012).

O linezolide foi o primeiro antibiótico desta classe a ser aprovado para uso na clínica, em 2000, sendo constituído por 3 anéis aromáticos e por uma cauda acetamidometil (Wilson *et al*., 2008; Bozdogan & Appelbaum, 2004). Estes antibióticos têm uma ação bacteriostática e afetam um dos passos iniciais da síntese proteica: na fase de iniciação, ligam-se ao local A do centro peptidil transferase da subunidade ribossomal 50S, bloqueando a ligação do tRNA que carrega o primeiro aminoácido que irá iniciar a síntese da cadeia polipeptídica, a formilmetionina, ao local P do centro peptidil transferase do ribossoma, impedindo que se forme um complexo de iniciação 70S funcional. Se o complexo 70S já estiver formado, as oxazolidinonas irão impedir a translocação da cadeia peptídica do local P para o local A do ribossoma (Diekema & Jones, 2001; Leach *et al*., 2011; Bozdogan & Appelbaum, 2004; Phillips & Sharaf, 2016).

2.3.4. Tetraciclinas

As tetraciclinas são uma classe de antibióticos que foi descoberta nos anos 40, sendo inicialmente isoladas de bactérias do género *Streptomyces* (Bahrami *et al*., 2012). A estrutura das tetraciclinas é constituída por um sistema de 4 anéis de hidrocarbonetos, numerados de A a D, aos quais estão ligados vários grupos funcionais, sendo que os anéis A, B e C têm centros de carbono saturados e o anel D é aromático (Thaker *et al*., 2009). Encontram-se divididas em 3 gerações: a primeira inclui as tetraciclinas naturais que foram isoladas de bactérias, a segunda e terceira são constituídas por tetraciclinas com uma origem semissintética, sendo que as de terceira geração são apelidadas de glicilciclinas (Chopra & Roberts, 2001; Roberts, 2019). As glicilciclinas apresentam um mecanismo de ação semelhante ao das tetraciclinas, mas apresentam modificações na sua estrutura que permitem contornar a maioria dos mecanismos de resistência associados às tetraciclinas (Castillo, 2013).

As tetraciclinas são antibióticos bacteriostáticos e possuem um espetro de ação bastante alargado incluindo bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, bem como outros microrganismos menos comuns como micoplasma, *Chlamydia*, *Rickettsia* e protozoários parasitas (Dahgrir & Drogi, 2013). As tetraciclinas inibem a síntese proteica, interagindo com a extremidade 3' do RNA ribossomal 16S associado à subunidade 30S; associadas com proteínas acessórias e iões magnésio, ligam-se ao local A do centro peptidil transferase, impedindo que os tRNAs que carregam os aminoácidos que serão adicionados à cadeia polipeptídica se consigam ligar ao local A (Nelson & Levi, 2011; Bahrami *et al*., 2012).

2.3.5. Macrólidos

A classe dos macrólidos foi descoberta nos anos 50, sendo constituída por elementos naturais que são metabolitos secundários de bactérias da família *Actinomycete* e por antibióticos semissintéticos que resultam da substituição de alguns grupos nos constituintes naturais. O primeiro macrólido a ser descoberto foi a pikromicina, no entanto, a eritromicina foi o primeiro antibiótico desta classe a ser utilizado na vertente clínica (Katz & Ashley, 2005; Lohsen & Stephens, 2019).

Os macrólidos são constituídos por um anel macrocíclico de lactona, que pode ter entre 12 e 16 átomos de carbono, ao qual estão ligados através de ligações glicosídicas um ou mais deoxi-açucares que normalmente são a L-cladinose e a D-desosamina; ao anel de lactona podem ainda estar ligados vários grupos funcionais. (Lohsen & Stephens, 2019; Gaynor & Mankin, 2003). Os cetólidos são a geração mais recente de macrólidos, em que há a substituição da L-cladinose por um grupo ceto, apresentando uma maior afinidade para o ribossoma do que as primeiras gerações e são mais eficazes contra as estirpes que apresentam alguma resistência (Gaynor & Mankin, 2003). Estes antibióticos têm um espetro de ação alargado, sendo ativos tanto contra bactérias de Gram positivo bem como de Gram negativo (Zhanel *et al*., 2001).

Os macrólidos exercem a sua ação na fase de elongação da síntese proteica, ligando-se ao rRNA 23S na subunidade ribossomal 50S e a várias proteínas ribossomais, bloqueando a translocação do peptidil-tRNA, e levando à dissociação do péptido do ribossoma, fazendo com que haja uma terminação precoce da síntese da cadeia polipeptídica. Em alguns organismos como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, os macrólidos também inibem a formação do ribossoma 70S (Mazzei *et al*., 1993; Katz & Ashley, 2005; Retsema & Fu, 2001).

2.4. Inibição da síntese dos ácidos nucleicos

A transcrição e a replicação do DNA são dois processos essenciais à sobrevivência e ao crescimento bacteriano. Durante estes processos, as cadeias de dupla hélice da molécula de DNA separam-se para permitir o emparelhamento das partes internas das bases, com as bases dos nucleótidos que vão ser polimerizadas em novas cadeias polinucleotídicas. A transcrição é essencial para que haja a descodificação da informação genética, havendo a síntese do RNA mensageiro através de complementaridade com as cadeias de DNA (Yoneyama & Katsumata, 2006).

Vários antibióticos interferem com a síntese dos ácidos nucleicos bloqueando a replicação do DNA ou a sua transcrição. A DNA girase (2 subunidades GyrA e outras 2 subunidades GyrB) e a topoisomerase IV (2 subunidades ParC e 2 subunidades ParE) são duas enzimas que são essenciais para a ocorrência destes processos e, portanto, constituem alvos preferenciais para algumas classes de antibióticos como por exemplo as quinolonas (Fàbrega *et al*., 2008). A DNA girase é a responsável por induzir ou remover superenrolamentos negativos no DNA à frente da forquilha de replicação, e contribuir para resolver nós que podem ocorrer no DNA; a topoisomerase IV, tem a função de separar os cromossomas formados na replicação do DNA, permitindo a divisão da célula em duas células filhas, além de também contribuir para a remoção do superenrolamento da molécula de DNA (Bearden & Danziger, 2001; Hooper & Jacoby, 2016; Redgrave, *et al*., 2014).

2.4.1. Quinolonas

Em 1962, durante o processo de síntese e purificação da cloroquina, um agente antimalárico, foi descoberto o ácido nalidíxico, o primeiro exemplar da classe das quinolonas, que foi utilizado para o tratamento de infeções do trato urinário (Naeem *et al*., 2016; Emmerson & Jones, 2003).

A classe das quinolonas é constituída por antibióticos totalmente sintéticos e encontra-se dividida em 4 gerações de acordo com o seu espetro de ação (Banbeke *et al*., 2005). A estrutura básica desta classe de antibióticos é constituída por um anel de ácido piridinocarboxílico que está fundido a um anel aromático constituído por 5 ou 6 carbonos (Emami *et al*., 2005).

O ácido nalidíxico, precursor da primeira geração de quinolonas, possui apenas atividade contra bactérias de Gram negativo, sendo que todas as outras quinolonas são derivadas da estrutura básica deste antibiótico através de substituição dos grupos ligados aos vários carbonos dos 2 anéis, de forma a melhorar as suas propriedades farmacocinéticas e reduzir a sua toxicidade (Sárközy, 2001; Fàbrega *et al*., 2008). A adição de um grupo flúor à estrutura normal das quinolonas levou ao surgimento das fluoroquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina), uma subclasse com bastante relevância clínica, conferindo uma maior potência contra bactérias de Gram negativo e uma atividade limitada contra bactérias de Gram positivo (Doorslaer *et al*., 2014; Hooper & Jacoby, 2016). A maioria dos constituintes deste grupo apresenta uma estrutura constituída por 2 anéis, no entanto as gerações mais recentes apresentam um terceiro anel por forma a alargar o seu espetro de atividade: terceira geração (levofloxacina e moxifloxacina), ambas com um espetro que abrange tanto bactérias de Gram negativo como de Gram positivo (Cheng *et al*., 2013); e a quarta geração (gemifloxacina e trovafloxacina) que exerce também a sua ação sobre bactérias anaeróbicas (Emami *et al*., 2005).

As quinolonas exercem a sua ação inibindo a síntese de DNA, impedindo a re-ligação do DNA nos cortes em dupla cadeia, nos complexos formados entre o DNA e as enzimas DNA girase e topoisomerase IV ("cleaved complexes"), bloqueando a progressão da forquilha de replicação, resultando numa potente atividade bactericida. Em geral, nas bactérias de Gram negativo a DNA girase é mais suscetível à inibição pelas quinolonas do que a topoisomerase IV; nas bactérias de Gram positivo, ocorre o inverso (Redgrave *et al*., 2014; Drlica *et al*., 2009; Tomé & Filipe, 2011). A morte celular induzida pelas quinolonas está associada com a ocorrência de quebras no DNA em dupla cadeia e com um aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Cheng *et al*., 2013).

2.5. Inibição de vias metabólicas essenciais

As bactérias têm obrigatoriamente de sintetizar ácido fólico, ao contrário dos humanos que obtêm este componente através da dieta (Masters *et al*., 2003). O tetrahidrofolato, a forma ativa do ácido fólico, é um cofator essencial para a síntese de uma grande variedade de moléculas, como a timidina, as purinas do DNA e do RNA, e alguns aminoácidos (Hawser *et al*., 2006).

Na via metabólica de síntese do tetrahidrofolato (THF) estão envolvidas várias enzimas sendo as principais a dihidropteroato synthase, responsável pela condensação da 7-8-dihidro-6-hidroximetilpteridina-pirofosfato e do ácido paraminobenzóico para formar o dihidropteroato; a dihidrofolato synthase que transforma o dihidropteroato em dihidrofolato; e a dihidrofolato redutase, que reduz o dihidrofolato a tetrahidrofolato (Bermingham & Derrick, 2002). Alguns antibióticos têm a capacidade de mimetizar substratos destas enzimas, levando a que estas se liguem ao antibiótico em vez de se ligarem ao seu substrato natural (Masters *et al*., 2003).

2.5.1. Sulfonamidas

As sulfonamidas são uma classe de antibióticos sintéticos que foi descoberta nos anos 30 do século XX, sendo os primeiros antibióticos com uma ação seletiva a serem introduzidos na vertente clínica. Estes antibióticos apresentam um espetro de atividade alargado sendo eficazes no combate a bactérias de Gram negativo e de Gram positivo bem como *Chlamydia* e alguns protozoários (Smith & Powell, 2000; Lavanya, 2017; Sköld, 2000). Estes antibióticos, hoje em dia, não são muito utilizados devido aos seus efeitos secundários ao nível da pele e do sistema hematopoiético, que são bastante comuns (Sköld, 2001; Sköld, 2010).

A estrutura básica das sulfonamidas é constituída por um átomo de enxofre que está conectado por ligações duplas a 2 átomos de oxigénio e por ligações simples a um átomo de azoto e a um grupo funcional, em 2 estruturas importantes: um grupo arilamina e um anel constituído por 5 ou 6 átomos de carbono que são importantes para a sua função (Dorn *et al*., 2018). As sulfonamidas inibem competitivamente a dihidropteroato synthase por terem uma estrutura análoga do seu substrato, o ácido paraminobenzóico, competindo com este pela ligação à enzima, levando a uma deficiência em ácido fólico que irá afetar o crescimento bacteriano e a divisão celular (Dowling, 2017; Prescott, 2013).

2.5.2. Trimetoprim

O trimetoprim é um antibiótico sintético pertencente à família das diaminopiridinas, exercendo a sua ação inibindo a enzima dihidrofolato redutase que é responsável por reduzir o ácido dihidrofólico a ácido tetrahidrofólico, a forma ativa do ácido fólico, por este ser um análogo estrutural da porção pteridina do ácido dihidrofólico, apresentando um espetro de ação alargado (Quinlivan *et al*., 2000; Masters *et al*., 2003; Huovinen *et al*., 1995). Muitas vezes o trimetoprim é administrado em combinação com uma sulfonamida, o Sulfamethoxazol, ocorrendo um efeito sinergístico entre estes dois antibióticos devido ao facto de inibirem duas reações sequenciais na via de síntese do ácido fólico (Smith & Powell, 2000; MacDougall *et al*., 2018).

3. Resistência aos antibióticos

A resistência aos antibióticos, ou seja, a capacidade que um organismo tem de sobreviver e de se reproduzir na presença de um determinado antibiótico (Sabtu *et al*., 2015), é um problema emergente e com consequências graves em termos de Saúde Pública (Caniça *et al*., 2019). Estima-se que ocorram cerca de 700 000 mortes mundialmente, por ano, devido a bactérias resistentes a antibióticos, chegando aos 10 milhões de mortes em 2050 (Caniça *et al*., 2019; Manageiro *et al*., 2017). De realçar, a resistência aos antibióticos foi considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma das principais ameaças à saúde mundial do século XXI (Munita & Arias, 2016; Yadav & Kapley, 2021).

Atualmente mais de 70% das bactérias patogénicas são resistentes à maioria dos antibióticos disponíveis no mercado (Bérdy, 2012). Para que a resistência se desenvolva é necessário que haja a conjugação de dois fatores: a presença de um antibiótico capaz de inibir a maior parte das bactérias presentes num determinado tecido, órgão, entre outros.; e a existência de pelo menos uma bactéria que possua um determinante genético responsável por conferir resistência a um antibiótico. Quando estes dois fatores estão presentes, as bactérias suscetíveis irão ser eliminadas, enquanto, as bactérias que possuem o determinante de resistência irão sobreviver, ocorrendo a seleção das bactérias resistentes, que poderão transferir o determinante de resistência para outras bactérias (Alanis, 2015).

A etiologia da resistência aos antibióticos é complexa, estando envolvidos vários fatores associados a diferentes áreas: o uso excessivo de antibióticos na agricultura, aquacultura, na clínica, a contaminação das águas associada à indústria farmacêutica, o uso de antibióticos como promotores de crescimento e como profilaxia na indústria de produção animal, a falta de condições sanitárias e de higiene, o aumento do tráfego internacional e o aumento da população mundial (Aslam *et al.*, 2018). De facto, o uso excessivo de antibióticos tem vindo a acelerar a incidência da resistência aos antibióticos, com particular importância nos países em desenvolvimento devido ao livre acesso a estes fármacos, sem qualquer prescrição médica, às condições higiénicas deficitárias e à pobreza que condiciona o acesso a antibióticos eficazes (Aslam *et al*., 2018; Robinson *et al*., 2016).

A disseminação de estirpes bacterianas com fenótipos de resistência a várias classes de antibióticos tem dificultado o tratamento de muitas infeções. Inicialmente, pensava-se que apenas os genes de resistência presentes em bactérias com interesse clínico eram relevantes. No entanto, tem-se confirmado que tanto as bactérias comensais e ambientais, como os elementos genéticos móveis nelas presentes, constituem reservatórios de genes de resistência aos antibióticos, que podem ser adquiridos, através de transferência genética horizontal, por bactérias patogénicas (Frieri *et al*., 2017).

Clones bacterianos multirresistentes são, por vezes, bem-sucedidos, contribuindo para a disseminação alargada da resistência aos antibióticos entre humanos, animais (cadeia alimentar e selvagens) e reservatórios ambientais (solo e água) (Caniça *et al*., 2015). Atualmente, entre as bactérias de Gram positivo, as que têm um maior impacto em termos de resistência aos antibióticos são: *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE), *Clostridium difficile* e *S. pneumoniae*. No caso das bactérias de Gram negativo, a situação é muito mais complexa, devido ao surgimento de clones multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, e algumas espécies da família *Enterobacteriaceae*, nas quais se tem verificado um aumento da resistência aos carbapenemes devido à disseminação de carbapenemases das famílias KPC, OXA-48, NDM e VIM (Rossolini *et al*., 2014; MacGowan & Macnaughton, 2017; Fair & Tor, 2014).

3.1. Resistência intrínseca e adquirida

A resistência bacteriana a um determinado grupo de antibióticos pode surgir por mecanismos intrínsecos ou adquiridos. A resistência intrínseca ou natural, deve-se a características estruturais de um determinado grupo de bactérias, sendo independente de uma exposição prévia ao antibiótico: ausência da estrutura alvo em que o antibiótico exerce a sua ação ou uma baixa permeabilidade do antibiótico na membrana. Como exemplo, temos a resistência aos glicopeptídeos nas bactérias de Gram negativo que se deve à impermeabilidade da membrana externa (Reygaert, 2018; Byarugaba, 2009).

A resistência aos antibióticos pode também ser adquirida, que ocorre quando uma bactéria que é suscetível a uma dada classe de antibióticos, se torna resistente devido à ocorrência de alterações ao nível do DNA (mutações pontuais, inserções ou deleções), ou à aquisição de novo material genético proveniente de fontes exógenas através de processos de transferência genética horizontal (conjugação, transformação e transdução). A existência de elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposões e integrões) também pode facilitar a transferência do material genético para o genoma do hospedeiro ou para plasmídeos (Christaki *et al*., 2019; Acar & Röstel, 2001; Normark & Normark, 2002).

Existe ainda um outro tipo de resistência, a resistência adaptativa, que é induzida por sinais ambientais específicos, como, por exemplo, alterações de PH, alterações ao nível da concentração de iões, concentrações sub-inibitórias de um determinado antibiótico, disponibilidade de nutrientes, que tem

como resultado alterações na expressão génica ou na síntese de proteínas. Esta resistência é transiente, voltando ao normal quando o sinal indutor desaparece (Motta & Aldana, 2016).

3.2. Processos de transferência genética horizontal

3.2.1. Conjugação

A conjugação é o tipo de transferência genética horizontal mais importante. Neste processo há a transferência de material genético, através de um contacto direto entre duas células bacterianas que é promovido pela formação de *pilus*, uma estrutura tubular oca, que se forma quando as bactérias estão muito próximas, conectando-as temporariamente, permitindo a passagem de fragmentos de DNA (Figura I.4). O DNA a ser transferido é normalmente processado na célula dadora para ficar em cadeia simples e é depois convertido em dupla cadeia pela maquinaria de replicação da célula recetora. Esta transferência, da célula dadora para a célula recetora, é normalmente mediada por plasmídeos ou transposões. A maioria dos plasmídeos contém vários genes de resistência devido à ação de outros elementos genéticos móveis como os transposões, integrões e sequências de inserção, ocorrendo um fenómeno de co-resistência; num único evento de conjugação pode ser adquirido um fenótipo de multirresistência (Christaki *et al*., 2019; Alanis, 2005; Wozniak & Waldor, 2010).

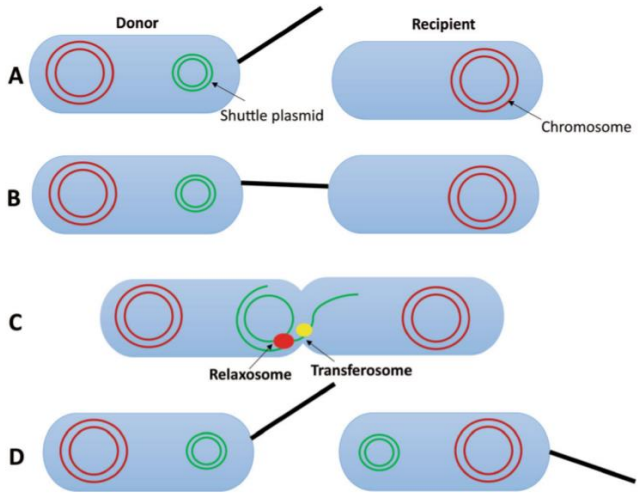


Figura I.4. Esquema representativo do processo de conjugação (Deng *et al*. 2017)

3.2.2. Transdução

Na transdução, a transferência de DNA é mediada por um bacteriófago (ou simplesmente fagos), ou seja, um vírus que infeta bactérias. O seu genoma pode ser constituído por DNA ou RNA em cadeia simples ou dupla, contendo alguns componentes essenciais, tais como genes que codificam para uma replicase, genes que permitem a apropriação da maquinaria da célula hospedeira, e genes que codificam proteínas que permitem a fusão do DNA da célula hospedeira na cápside. Os fagos podem ser virulentos, quando seguem, obrigatoriamente, um ciclo lítico caracterizado por multiplicação viral no hospedeiro e subsequente libertação dos seus descendentes recorrendo à morte do hospedeiro; ou temperados, em que o genoma fágico é integrado no cromossoma bacteriano sob a forma de profago (ciclo lisogénico) (Figura I.5). Quando ocorre um estímulo ambiental, os fagos temperados tornam-se virulentos, excisando-se do cromossoma bacteriano e causando a lise da bactéria. Este vírus irá infetar a célula dadora, replicar, incorporar algum DNA desta célula, ocorrendo, de seguida, a lise da bactéria e

consequente libertação de múltiplas partículas fágicas. Estas partículas fágicas irão infetar outras bactérias havendo a libertação do DNA capturado, que poderá ser incorporado no cromossoma da bactéria recetora através de recombinação homóloga (Holmes *et al*., 2016; Alanis, 2005; Thierauf *et al*., 2009; Frost *et al*., 2005).

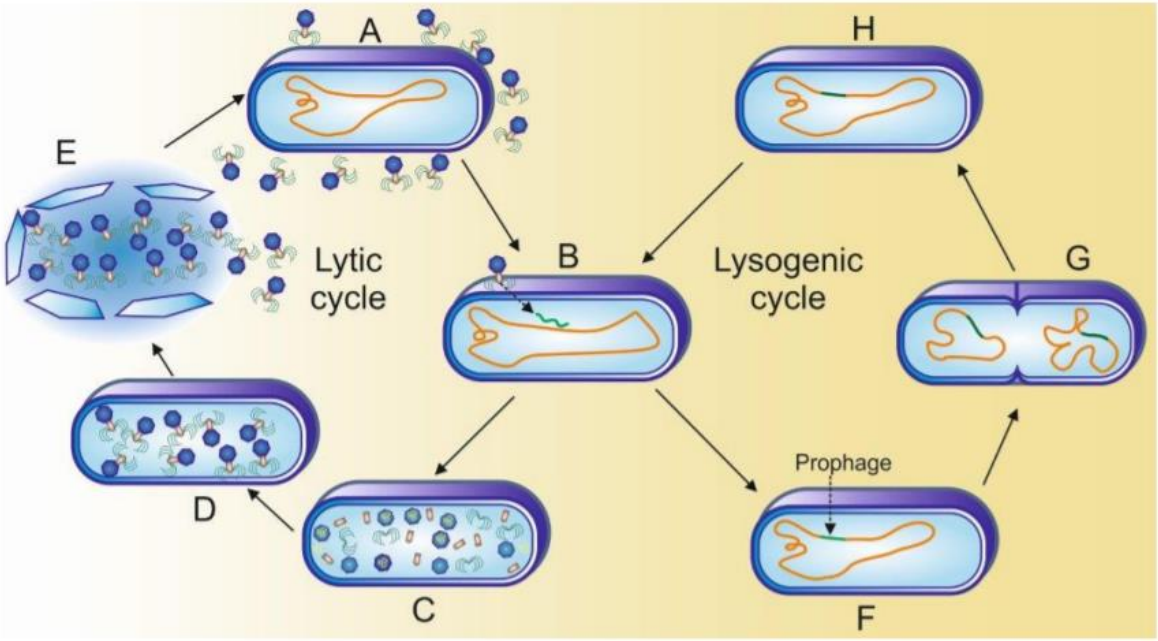


Figura I.5. Esquema representativo do processo de transdução (Pyzik *et al*. 2020)

3.2.3. Transformação

Um último processo é a transformação, em que as bactérias adquirem DNA que se encontra livre no ambiente, proveniente de bactérias que sofreram lise ou desintegração num local próximo, introduzindo-o no seu citoplasma e incorporando-o no seu próprio DNA através de recombinação homóloga ou transposição (Figura I.6). Para que este DNA possa ser adquirido as bactérias têm de ser naturalmente competentes (Pallasch, 2003).

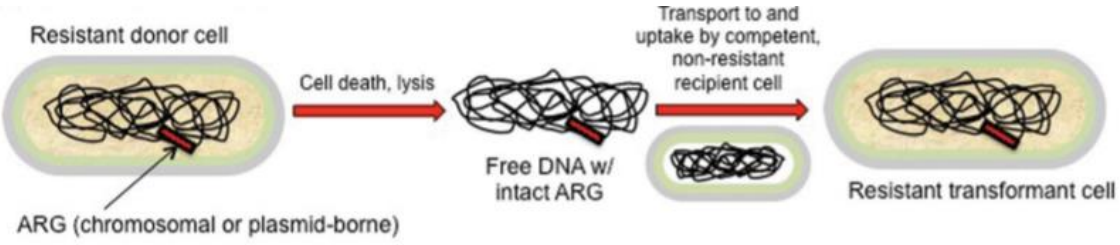


Figura I.6. Esquema representativo do processo de transformação (Adaptado de Dodd, 2012)

3.3. Mecanismos gerais de resistência aos antibióticos

Os principais mecanismos de resistência aos antibióticos podem ser divididos em 4 categorias: alteração da permeabilidade da membrana, bombas de efluxo, alteração do alvo do antibiótico e inativação do antibiótico (Abusaiba & Harmoosh, 2020).

3.3.1. Alteração da permeabilidade da membrana

Vários antibióticos têm alvos intracelulares e, portanto, para conseguirem atingir o seu alvo têm de atravessar a membrana externa e/ou citoplasmática, as quais constituem uma barreira à entrada dos antibióticos. Por exemplo, os antibióticos β-lactâmicos e as tetraciclinas, sendo moléculas hidrofílicas têm dificuldade em atravessar a membrana externa das bactérias de Gram negativo e, por isso, passam a membrana através de proteínas membranares (porinas) (Munita & Arias, 2016). A alteração da permeabilidade da membrana é, assim, um mecanismo de resistência que está relacionado com alterações ao nível da expressão das porinas, podendo ocorrer uma alteração do tipo de porinas expressas, uma diminuição da sua expressão ou uma deficiência na sua função devido à ocorrência de mutações nos genes que codificam para estas proteínas (Pagès *et al*., 2008). Este mecanismo normalmente confere um baixo nível de resistência e surge associado a outros mecanismos de resistência como o aumento da expressão de bombas de efluxo (Munita & Arias, 2016).

3.3.2. Bombas de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas transportadoras, dependentes de energia, que se encontram localizadas na membrana celular bacteriana, tendo como função expulsar moléculas tóxicas para a célula, em particular os antibióticos, antes que estes consigam atingir o seu alvo (Chitsaz & Brown, 2017).

As bactérias normalmente possuem no seu cromossoma genes que codificam para proteínas de efluxo, os quais podem ser expressos constitutivamente, induzidos ou sobreexpressos na presença de um estímulo ambiental (por exemplo, pela presença de antibiótico) (Reygaert, 2018). A redução da concentração de antibiótico no interior da célula pode ser conseguida pela ação de bombas de efluxo que transportam ativamente os antibióticos para fora da célula. Estas bombas de efluxo podem ser específicas para um determinado substrato ou podem transportar uma grande variedade de substratos designando-se *multidrug resistance* (MDR) *efflux pumps*, conferindo um fenótipo de multirresistência (Blair *et al*., 2014B; Webber, 2002). Este é um dos mecanismos mais importantes em bactérias com relevância clínica.

As proteínas de efluxo podem ser agrupadas em 5 superfamílias de acordo com o número de componentes que as constituem, número de regiões transmembranares, fonte de energia e substratos que exportam: MFS (*major facilitator superfamily*), SMR (*super multidrug resistance family*), RND (*resistance nodulation cell division family*), ABC (*ATP-binding cassette family*) e MATE (*multidrug and toxic compound extrusion family*) (Piddock, 2006).

3.3.3. Modificação do alvo do antibiótico

Os antibióticos ligam-se especificamente ao seu alvo. A alteração do local-alvo onde atua determinado antibiótico constitui um dos mais importantes mecanismos de resistência (Munita & Arias, 2016). As alterações que ocorrem ao nível do alvo do antibiótico, com consequência no fenótipo de resistência incluem a proteção e modificação do alvo.

A proteção do alvo é um mecanismo que envolve a ligação de uma proteína de proteção ao alvo do antibiótico, libertando-o da inibição causada pelo antibiótico: pela remoção do antibiótico, indução de alterações conformacionais que causam a dissociação do antibiótico, ou indução de alterações estruturais

no alvo permitindo que este se mantenha funcional apesar de o antibiótico se encontrar ligado (Wilson *et al*., 2020). Como exemplo, temos o gene *tetM*, resistência às tetraciclinas, que codifica para uma proteína de proteção ribossomal (Connell *et al*., 2003).

A ocorrência de mutações nos genes que codificam para o alvo do antibiótico é um dos mecanismos de resistência mais comuns, resultando numa menor afinidade do antibiótico para o seu alvo. Como exemplo, temos a resistência às quinolonas que ocorre devido a mutações nos genes que codificam para as subunidades da DNA girase e da topoisomerase IV (Martinez, 2014; Hooper, 2002). A resistência aos antibióticos também pode ser causada por alterações enzimáticas ao nível do alvo do antibiótico, nomeadamente a adição de grupos metilo promovido pela ação de metiltransferases, como no caso da resistência aos macrólidos, aminoglicosídeos e oxazolidinonas devido à metilação do RNA ribossomal (Schaenzer & Wright, 2020). Um outro exemplo, é a resistência à meticilina em *S. aureus* que se deve à produção de uma proteína de ligação à penicilina alternativa, a PBP2a que possui uma baixa afinidade para as penicilinas (Lim & Strynadka, 2002).

3.3.4. Inativação do antibiótico

A degradação dos antibióticos por enzimas é o mecanismo de resistência mais comum e está presente desde a primeira vez em que os antibióticos foram utilizados (Pascale and Wright, 2010). Até aos dias de hoje já foram descobertas enzimas que degradam antibióticos de várias classes, essencialmente os β-lactâmicos, aminoglicosídeos e os macrólidos (Blair *et al*., 2014A).

A inativação enzimática dos antibióticos é essencialmente mediada pela ação de β-lactamases, que são enzimas especializadas na degradação das ligações amida dos antibióticos β-lactâmicos como as penicilinas, cefalosporinas, monobactames e carbapenemes, causando a hidrólise do anel β-lactâmico, impedindo que este consiga interagir com as proteínas de ligação à penicilina, sendo este mecanismo de resistência especialmente prevalente em bactérias de Gram negativo (Reygaert, 2018). Em relação aos aminoglicosídeos, a resistência está na maior parte dos casos relacionada com a presença de enzimas modificadoras, que reduzem a capacidade destes antibióticos de se ligarem ao seu alvo (Krause *et al*., 2016). Alguns macrólidos também podem ser inativados devido à ação de enzimas nomeadamente fosfotransferases ou esterases que levam à abertura do anel de lactona enquanto alguns grupos funcionais também são suscetíveis à fosforilação ou glicosilação (Zhanel *et al*., 2001).

3.4. Mecanismos de resistência por classe de antibióticos

Dada a importância para o presente trabalho, destacam-se as seguintes classes de antibióticos:

3.4.1. β-lactâmicos

O principal mecanismo associado à resistência aos antibióticos β-lactâmicos é a produção de enzimas, designadas β-lactamases, que catalisam a hidrólise do anel β-lactâmico, impedindo que o antibiótico atinja as proteínas de ligação à penicilina; estas enzimas podem ser cromossómicas ou podem estar codificadas em elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos ou transposões (Balsalobre *et al*., 2019). Devido à ação das β-lactamases muitas das vezes os antibióticos β-lactâmicos são administrados em combinação com inibidores destas enzimas como, por exemplo, o ácido clavulânico, com exceção das metalo-β-lactamases (Worthington & Melander, 2013).

Segundo a classificação de Ambler existem 4 classes de β-lactamases (A, B, C, D), de acordo com a sua sequência aminoacídica, sendo que as da classe B são dependentes de metais e contêm zinco no seu

centro catalítico, enquanto, as pertencentes às classes A, C e D contém uma serina no seu centro ativo (Poole, 2004).

Na classe A, estão incluídas as carbapenemases do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), capazes de degradar a classe mais recente de β-lactâmicos, os carbapenemes, bem como a maioria das β-lactamases de espetro alargado (ESBLs), as quais têm a capacidade de hidrolisar as penicilinas, as cefalosporinas de terceira e quarta geração, e os monobactames. Este tipo de β-lactamases encontra-se maioritariamente codificado em elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, e são principalmente produzidas por bactérias da família *Enterobacteriaceae* (Marsik & Nambiar, 2011).

Nesta classe estão representadas principalmente 3 famílias de ESBLs: SHV, TEM e CTX-M. As ESBLs da família TEM derivam das β-lactamases TEM-1 e TEM-2 devido à ocorrência de mutações que levaram a uma extensão do seu espetro de ação. A família SHV é a família de ESBLs mais frequentemente detetada e derivam da β-lactamase SHV-1 (Paterson & Bonomo, 2005). A família CTX-M é a família mais recente de ESBLs e encontra-se bastante disseminada na família *Enterobacteriaceae*. Estas β-lactamases tiveram origem numa cefalosporinase cromossómica de *Kluyvera* spp. devido à captura dos genes que codificam esta enzima por plasmídeos conjugativos o que contribuiu para a sua disseminação (Rossolini *et al*., 2008).

A classe B é constituída pelas metalo-β-lactamases (MBL), que possuem um ião zinco no seu centro catalítico. As MBL têm a capacidade de degradar os carbapenemes, apresentando, no entanto, uma baixa capacidade hidrolítica para degradar os monobactames (Bush & Jacoby, 2009).

Na classe C estão incluídas as β-lactamases do tipo AmpC, que são resistentes à maioria dos inibidores (por exemplo, o ácido clavulânico), sendo, na sua maioria, de origem cromossómica. Estas enzimas são normalmente indutíveis, havendo em condições normais uma expressão basal, e na presença de um antibiótico β-lactâmico irá haver um aumento da sua produção. As β-lactamases desta classe são ativas contra as cefalosporinas e por isso são muitas vezes chamadas cefalosporinases (Kong *et al*., 2010). Nesta classe estão ainda incluídas as β-lactamases do tipo AmpC com origem plasmídica (PMAB), as quais derivam das β-lactamases cromossómicas de algumas espécies como *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*. Foram inicialmente detetadas em espécies que não possuem β-lactamases do tipo AmpC cromossómicas, ou em que estas têm uma baixa expressão como *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, etc. Entre estas encontram-se as pertencentes às famílias CIT, DHA, CMY, MIR e MOX (Rensing *et al*., 2019).

Por último, na classe D, estão incluídas as β-lactamases do tipo OXA, normalmente chamadas de oxacilinases. Possuem este nome porque degradam facilmente a oxacilina, uma penicilina semissintética, estando frequentemente presentes no cromossoma de espécies ambientais (Leonard *et al*., 2013). A classe D é bastante heterogénea incluindo β-lactamases de largo espetro, ESBLs e ainda algumas carbapenemases, com principal destaque para a família OXA-48 (Poirel *et al*., 2010).

3.4.2. Polimixinas

A resistência às polimixinas deve-se à modificação dos grupos fosfato presentes no lípido A do lipopolissacarídeo (LPS), que constitui o folheto externo da membrana externa, nomeadamente a adição de grupos com uma carga positiva como a 4-amino-4-deoxi-L-arabinose ou a fosfoetanolamina, levando a que haja um aumento da carga do LPS, o que diminui a afinidade para com as polimixinas que têm uma carga positiva. A adição dos resíduos é mediada pelos sistemas de 2 componentes, PmrAB e PhoPQ, que estão presentes na maioria das enterobactérias, regulando uma grande quantidade de genes

em resposta a estímulos ambientais (Hamel *et al*., 2021; Gogry *et al*., 2021). Nas espécies do *Enterobacter cloacae* complex, a resistência cromossómica à colistina é normalmente mediada pelo sistema PhoPQ que leva à adição de 4-amino-4-deoxi-L-arabinose ao lípido A. O sistema PmrAB, apesar de também estar presente nestas espécies, não tem um papel preponderante na resistência a este antibiótico, como em outras espécies (*E. coli*, *Salmonella enterica e K. pneumoniae*) onde é dos principais reguladores da modificação do lípido A. Este sistema é ativado na presença de estímulos ambientais como a diminuição dos níveis de Mg^{2+} ou Ca^{2+}, do PH e na presença de péptidos antimicrobianos catiónicos como é o caso da colistina. A ativação deste sistema leva à expressão do operão *arnBCADTEF* que é responsável pela síntese da 4-amino-4-deoxi-L-arabinose e pela sua adição ao lípido A. A ocorrência de mutações nos genes que constituem o sistema PhoPQ (*phoP* e *phoQ*), podem levar a uma ativação constitutiva do operão *arnBCADTEF*, ocorrendo uma repulsão electroestática que impede que a colistina consiga interagir com este. O sistema PhoPQ também é regulado por *feedback* negativo pelo repressor *MgrB*: a inativação deste gene leva a uma ativação constitutiva deste sistema, e, consequentemente, à expressão do operão *arnBCADTEF* (Wand & Sutton, 2020; Baron *et al*., 2016; Huang *et al*., 2020; Kang *et al*., 2019). Um outro mecanismo associado à resistência cromossómica às polimixinas está associado a alterações da expressão de proteínas membranares como, por exemplo, bombas de efluxo (Olaitan *et al*., 2014; Velkov *et al*., 2013; Falagas *et al*., 2010).

A resistência plasmídica à colistina (PMCR, *plasmid-mediated colistin resistance*) está relacionada com os genes *mcr* (*mobile colistin resistance*) que codificam uma fosfoetanolamina lípido A transferase que catalisa a adição de fosfoetanolamina ao componente lípido A do lipopolissacarídeo (LPS), utilizando como molécula dadora a fosfatidiletanolamina, aumentando a carga deste componente e assim impedindo que a colistina se consiga ligar. Devido à baixa proporção de amostras positivas para MCR isoladas em humanos, em comparação com amostras animais, é provável que a resistência à colistina mediada pelo gene *mcr* tenha tido origem em espécies bacterianas isoladas de animais e, posteriormente, tenha sido transferida para o homem (Aghapour *et al*., 2019; Ahmed *et al*., 2020).

3.4.3. Quinolonas

A resistência às quinolonas pode estar codificada no cromossoma ou em plasmídeos. A resistência codificada pelo cromossoma pode dever-se a mutações nos genes *gyrA* e *gyrB* (DNA girase) e nos genes *parC* e *parE* (Topoisomerase IV), numa região que é chamada região determinante de resistência às quinolonas (QRDR, *quinolone resistance-determining region*), que originam subunidades enzimáticas com alterações estruturais que irão diminuir a afinidade das quinolonas para os complexos formados entre as enzimas e o DNA (Jacoby, 2005). Para atravessar a membrana externa das bactérias de Gram negativo, as quinolonas têm de passar através de proteínas membranares (porinas); assim, um dos mecanismos de resistência às quinolonas é a diminuição da expressão destas proteínas, impedindo a entrada das quinolonas dentro da célula. O aumento da expressão de sistemas de efluxo que bombeiam esta classe de antibióticos para fora da célula é também um conhecido mecanismo de resistência, tanto em bactérias de Gram negativo como de Gram positivo (Bearden & Danziger, 2001).

Na resistência codificada em plasmídeos (PMQR, *plasmid-mediated quinolone resistance*) destacam-se 3 mecanismos: 1) o determinante *qnr* que codifica uma proteína que protege a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição causada pelas quinolonas; 2) uma variante do gene *aac(6')-Ib-cr* que tem uma substituição de 2 aminoácidos que codifica para uma aminoglicosil-acetiltransferase que é capaz de acetilar a ciprofloxacina resultando numa diminuição da sua atividade; 3) o gene *qepA* e o gene *oqxAB*

que codificam bombas de efluxo que têm a capacidade de fazer a extrusão de fluoroquinolonas hidrofílicas (Fàbrega *et al*., 2008; Bambeke *et al*., 2005; Naeem *et al*., 2016; Van Hoek *et al*., 2011).

3.5. Importância dos elementos genéticos móveis (EGM) na disseminação da resistência

A co-circulação de bactérias comensais e patogénicas nos vários reservatórios (cadeia alimentar, intestino humano e animal, ambiente, água, solo, etc.) possibilita a troca de material genético entre estas, o que culmina no aparecimento de clones bacterianos, que são resistentes a várias classes de antibióticos (Caniça *et al*., 2019).

Os elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposões, fagos, sequências de inserção, ilhas genómicas e integrões), são segmentos de DNA que codificam enzimas e outras proteínas que promovem a mobilidade intracelular (do cromossoma para plasmídeos, ou de plasmídeo para plasmídeo), e intercelular do DNA; ao conjunto destes elementos genéticos móveis dá-se o nome de mobiloma (Partridge *et al*., 2018; Frost *et al*., 2005; Carr *et al*., 2021). Em muitos casos, os genes de resistência estão presentes em elementos genéticos móveis que são responsáveis pela captura, acumulação e disseminação de genes de resistência, entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes, através de processos de transferência genética horizontal, frequentemente associados ao desenvolvimento de resistência a antibióticos (Caniça *et al*., 2015; Munita & Arias, 2016). A transferência genética horizontal normalmente ocorre numa população mista em que existem bactérias suscetíveis e bactérias resistentes. A transferência de material genético, incluindo genes de resistência a antibióticos, ocorre por contacto próximo, sendo os ecossistemas ambientais e o microbioma intestinal humano e animal locais privilegiados para este fenómeno (Acar & Moulin, 2012).

3.5.1. Plasmídeos

Os plasmídeos são fragmentos de DNA circular, com replicação independente do cromossoma; podendo replicar em um ou vários hospedeiros. Muitas vezes possuem também uma origem de transferência e alguns genes que codificam componentes que são essenciais para a sua transferência para um novo hospedeiro através de conjugação; não contêm genes essenciais para as funções celulares. Fundamentalmente, existem dois tipos de plasmídeos: os conjugativos, que possuem genes de conjugação e que conseguem promover a sua própria transferência e a de outros plasmídeos; e os mobilizáveis, que possuem uma origem de transferência, mas não possuem genes de conjugação e, portanto, não conseguem promover a sua própria transferência (Van Hoek *et al*., 2011; Bennett, 2008).

3.5.2. Transposões

Os transposões são elementos genéticos móveis de DNA que codificam uma transposase sitio-específica que permite a sua integração e excisão em locais específicos do DNA, podendo transitar de um plasmídeo para outro, ou de um plasmídeo para o cromossoma e vice-versa. Os transposões além de serem portadores de genes essenciais para a sua transposição, podem ainda transportar uma grande variedade de genes, tais como, de resistência a antibióticos e a metais pesados, para a síntese de vitaminas, para fixação de azoto, entre outros (Normark & Normark, 2002; Streips &Yasbin, 2010; Sefton, 2002). Os transposões podem ser compostos ou não-compostos, quando possuem, ou não, sequências de inserção nas suas extremidades, respetivamente. Podem também ser classificados em conjugativos, quando são capazes de promover a sua transferência para outra bactéria através de

conjugação, ou mobilizáveis, quando necessitam de outros elementos genéticos para que ocorra a sua transferência (Babakhani & Oloomi, 2018; Whittle & Salyers, 2010).

3.5.3. Sequências de inserção

As sequências de inserção (IS) são o elemento genético móvel mais pequeno, com um comprimento inferior a 2500 pares de bases. São constituídas apenas por um gene que codifica para uma transposase e por repetições invertidas nas extremidades (IR, *inverted repeat*), sendo consideradas um elemento transponível simples. A enzima transposase permite a mobilização das IS ligando-se às repetições invertidas nas extremidades. Diferem dos transposões pois não contêm genes acessórios, tais como genes de resistência a antibióticos. As IS podem ser inseridas em plasmídeos, bacteriófagos ou transposões e, portanto, podem ser transferidas para outra bactéria (Babakhani & Oloomi, 2018; Van Hoek *et al*., 2011).

3.5.4. Integrões

Os integrões são elementos genéticos que promovem a aquisição e expressão de genes incorporados em cassetes; estes recrutam e inserem as cassetes de genes na estrutura de um operão, utilizando um mecanismo de recombinação sítio-específica, sendo este processo catalisado por uma integrase. Os integrões não têm a capacidade de autotransferência, sendo mobilizados, associados a plasmídeos e transposões, que funcionam como veículos para a sua transmissão. Estes são normalmente constituídos por um gene que codifica para uma integrase (*intI*), que pertence à família das recombinases de tirosina, um local onde são inseridas as cassetes génicas (attachment site- *attI*) e um promotor *Pc*. Estas cassetes de genes podem ser encontradas numa forma linear, inseridas num integrão, ou numa forma intermediária circular fechada (ORF- *open reading frame*) à qual não está associado nenhum promotor, e que se encontra covalentemente ligada a um local de recombinação *att*C, necessitando do promotor Pc do integrão para haver a sua expressão. A recombinação poderá ocorrer entre o local *att*I do integrão e o local *att*C da cassete génica levando à sua integração ou entre 2 locais *attC* ocorrendo a excisão das cassetes génicas. Estes constituintes do mobiloma, que normalmente codificam genes de resistência a antibióticos e a acumulação de várias cassetes génicas num único integrão, têm contribuído para a disseminação de multirresistência, tanto em bactérias de Gram negativo como de Gram positivo (Whittle & Salyers, 2010; Stalder *et al*., 2012; Byarugaba, 2009; Magnus & Mazel, 2002; Ploy *et al*., 2000).

4. <u>One Health</u>

O termo *One Health* (Uma só Saúde) foi criado em 2003/2004 e surgiu associado à epidemia de SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) e à gripe aviária causada pelo vírus H5N1, levando ao reconhecimento de que poderia haver uma ligação entre a Saúde Humana e Saúde Animal, e que, a qualquer momento, poderia surgir nos animais um patogénico, que poderia ameaçar a Saúde Humana e a economia global (Mackenzie & Jeggo, 2019).

One Health consiste numa abordagem colaborativa e multidisciplinar, que trabalha a nível local, regional, nacional e internacional, com o objetivo de alcançar uma melhoria das condições de saúde, reconhecendo que a Saúde Humana se encontra intimamente ligada com a Saúde Animal e com o ambiente (CDC, 2018). Permite a implementação de programas, políticas, legislação e investigação de forma a promover a comunicação entre os diferentes sectores por forma a obter uma melhoria da Saúde

Pública (Figura I.7). A comunicação entre as várias áreas é de extrema importância, pois algumas doenças que afetam o homem são transmitidas por animais (por exemplo, a gripe das aves e a brucelose) e doenças que são transmitidas entre humanos também circulam em animais, funcionando alguns animais como reservatórios destes patogénicos e que têm potencial para causar epidemias (por exemplo, o vírus Ébola). Portanto, ao atuarmos apenas numa das áreas não tornará possível a eliminação do problema (WHO, 2017; OIE, 2017; Garzón *et al*., 2018).

Esta abordagem é frequentemente utilizada em problemáticas que afetam as 3 partes intervenientes (Animal, Homem e Ambiente), nomeadamente na resistência aos antibióticos (WHO/Europe, 2020; One Health Comission, 2020). Requer a colaboração entre especialistas de Saúde Humana (médicos, enfermeiros e epidemiologistas, etc.), de Saúde Animal (veterinários e trabalhadores agrícolas) e Saúde Ambiental (ecologistas) e pressupõe uma monitorização constante de possíveis ameaças à saúde pública, permitindo estudar como as doenças circulam entre os diferentes reservatórios (CDC,2018; WHO,2017).

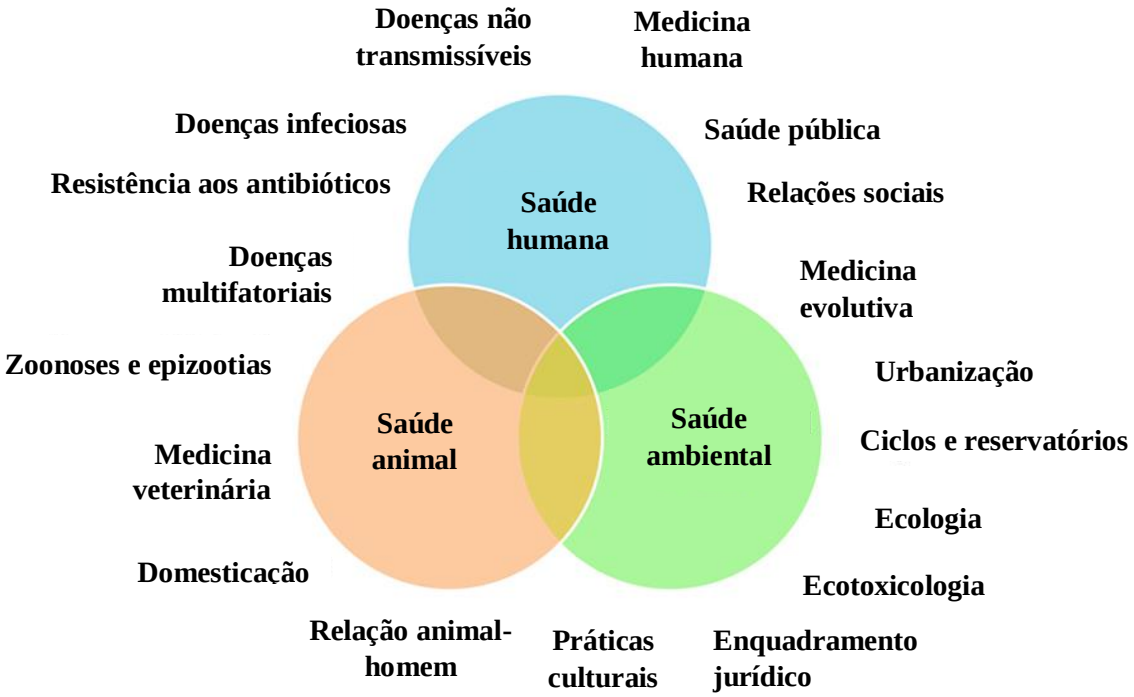


Figura I.7. Áreas de abrangência do conceito *One Health* (Adaptado de Garzón *et al*., 2018)

5. Reservatórios de genes de resistência aos antibióticos

Os reservatórios de genes de resistência aos antibióticos compreendem as populações bacterianas, que estão constantemente expostas à pressão seletiva que é exercida pela presença de antibióticos, destacando-se, em particular, o Homem, os animais e o meio ambiente, os 3 pilares da *One Health* (Figura I.8).

A grande maioria das classes de antibióticos são utilizadas tanto no Homem, como nos animais e nas plantas, estando apenas uma pequena parte dos antibióticos disponíveis só para os humanos (por exemplo, os carbapenemes). O resistoma corresponde a todos os genes de resistência a antibióticos que existem nas bactérias, quer sejam patogénicas, produtoras de antibióticos, comensais de outros

organismos, ou que vivem livremente no meio ambiente (Wright, 2010). Sendo que a maioria das bactérias tem a possibilidade de colonizar/contaminar tanto o Homem, como os animais e as plantas, há uma grande possibilidade de haver trocas de genes de resistência entre hospedeiros ou entre estes e o ambiente (Acar & Röstel, 2001; Collignon & McEwen, 2019).

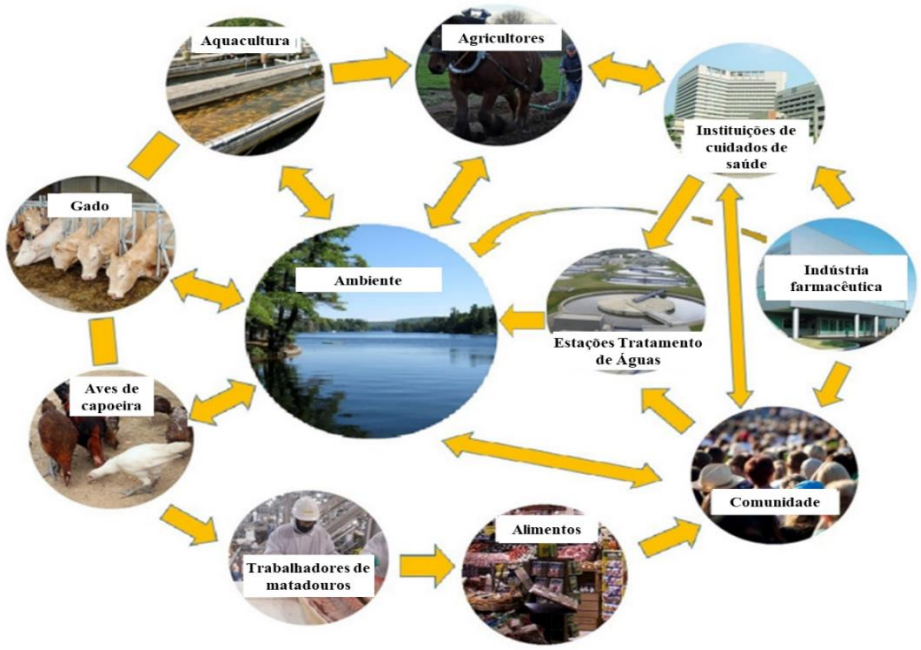


Figura I.8. Reservatórios de genes de resistência aos antibióticos (Adaptado de Max, 2021)

5.1. Humano

Os antibióticos são atualmente uma das classes de fármacos mais utilizados em Saúde Humana. No entanto, cerca de 50% das prescrições são consideradas inapropriadas devido a um diagnóstico incorreto, sendo por vezes utilizados para o tratamento de infeções virais; em alguns países, estes podem ser adquiridos sem qualquer prescrição médica. Consequentemente, o uso incorreto ou o uso excessivo de antibióticos por parte do Homem tem sido um grande contributo para o aumento da resistência (Holmes *et al*., 2016; Aslam *et al*., 2018; Gross, 2013; English & Gaur, 2009). Além disso, tem ocorrido um aumento do uso de antibióticos de espetro alargado, em substituição de um diagnóstico preciso, o que leva à seleção de microrganismos resistentes presentes na flora intestinal, onde os genes de resistência poderão ser transferidos para bactérias patogénicas quando ocorre uma infeção (Cars & Nordberg, 2005). Idealmente deveriam ser utilizados antibióticos com um espetro de ação curto, pois estes apenas atingem maioritariamente os microrganismos causadores de infeção, sem desestabilizar as bactérias comensais que habitam no Homem (Smith *et al*., 2014).

O microbioma intestinal humano é considerado um dos reservatórios de genes de resistência a antibióticos: é um local onde pode ocorrer a transferência de genes entre diferentes bactérias que coabitam neste local e/ou com bactérias que atravessam o intestino e que são provenientes dos alimentos e água ingeridos que podem estar contaminados (Hu *et al*., 2014; Salyers & Shoemaker, 2006). De facto, o consumo de antibióticos tanto nos humanos como nos animais, causa não só um aumento da resistência em bactérias patogénicas, mas também na flora endógena, havendo um potencial para a transferência da resistência entre as bactérias que habitam a flora intestinal humana e animal. Estas bactérias da flora

intestinal humana podem transferir os seus genes de resistência para bactérias patogénicas que podem contaminar o ambiente (Bogaard & Stobberingh, 2000; Salyers *et al*., 2004).

As infeções nosocomiais são das principais fontes de bactérias resistentes a antibióticos. Nos hospitais, os antibióticos são utilizados não só para o tratamento de infeções bacterianas, mas também como um meio profilático para prevenir infeções que podem decorrer de procedimentos médicos e cirúrgicos. O uso excessivo de antibióticos e a proximidade do contacto entre pacientes aliado à falta de assepsia e de saneamento em meio hospitalar fornece condições para a seleção e transmissão de bactérias resistentes a antibióticos (Chokshi *et al*., 2019). Outro fator que faz do Homem um importante reservatório de genes de resistência é o aumento da mobilidade de pessoas, que leva à propagação internacional de agentes infeciosos, tais como as bactérias resistentes a antibióticos, estimando-se que, por exemplo, as companhias aéreas transportam mais de 2 mil milhões de passageiros anualmente. A distribuição internacional dos alimentos e o transporte de animais também contribui para o alastrar da disseminação de microrganismos resistentes (Cars *et al*., 2008). Por outro lado, os trabalhadores agrícolas e de matadouros, devido ao contacto próximo com os animais, fazem parte do grupo de risco, que tem uma maior propensão para serem colonizados pelos microrganismos que habitam nos animais. Estes indivíduos podem funcionar como uma porta de entrada destes microrganismos na comunidade e no ambiente hospitalar (Marshall & Levy, 2011).

5.2. Animais (cadeia alimentar e selvagens)

Globalmente, estima-se que mais de 63 toneladas de antibióticos são utilizados anualmente na pecuária criando um *hotspot* de bactérias resistentes que podem ser transmitidas ao Homem através da exposição ocupacional, do processo de produção alimentar, dos produtos alimentares e através do ambiente devido ao solo e água contaminados (WHO, 2017). Estima-se que, na União Europeia, cerca de 50% dos antibióticos produzidos são utilizados em veterinária (Teuber, 2001). Em 2013 aproximadamente 131000 toneladas de antibióticos foram administrados em animais na pecuária e é esperado que esse número aumente para 200000 toneladas em 2030 (Vikesland *et al*., 2019).

Como já foi referido, a maioria dos antibióticos utilizados nos animais são pertencentes às mesmas classes de antibióticos utilizadas nos humanos, apresentando uma estrutura e mecanismo de ação semelhantes, exercendo assim uma pressão seletiva nas bactérias comensais e patogénicas para o Homem (Berendonk *et al*., 2015).

Nos animais, os antibióticos podem ser utilizados para o tratamento de infeções podendo ser administrados apenas nos animais com sintomas de infeção, como profilaxia, ou podem ser utilizados em todo o grupo (metafilaxia), dissolvidos na água, no alimento ou através de injeção, mesmo que a maioria dos indivíduos não apresente sinais de infeção. De facto, a criação animal intensiva, principalmente a aquacultura, permite obter uma maior rentabilidade e eficiência, não obstante, nestas condições, milhares de animais são criados num espaço muito limitado, o que favorece a disseminação de doenças infeciosas, impulsionando um aumento do uso de antibióticos. Nestes casos, existe a administração de antibiótico a todo o grupo e, assim, mesmo os indivíduos que não estão infetados são expostos à pressão seletiva exercida pelos antibióticos levando à seleção de bactérias resistentes que habitam o seu trato intestinal (McEwen, 2011; Woolhouse *et al*., 2015).

Existe ainda a utilização de antibióticos como promotores de crescimento, os quais são administrados em todo o grupo, em concentrações sub-terapêuticas, por um longo período de tempo, uma prática controversa devido à administração de antibióticos a animais saudáveis, que está comprovado traduzir-se em poucos benefícios se os animais forem criados em boas condições, e que é utilizada para

compensar as condições deficitárias de higiene e para substituir uma boa gestão da saúde animal (McEwen & Collignon, 2018). A utilização de antibióticos como promotores de crescimento é uma prática comum na produção animal intensiva, em particular na pecuária e na aquacultura, e que permite que os animais sejam utilizados para consumo num menor período de tempo. Muitos dos antibióticos utilizados pertencem a classes de elevada importância na saúde humana como os glicopeptídeos, o que tem contribuído para a seleção de bactérias portadoras de genes de resistência no intestino dos animais (Cars & Nordberg, 2005). Dois exemplos das consequências desta prática estão relacionados com o desenvolvimento de resistência, (1) às quinolonas em *Campylobacter, Salmonella* e *E. coli* isolados de animais de produção industrial e, (2) a resistência à vancomicina em *Enterococcus* (VRE) (Aarestrup, 2005; Nilsson, 2012).

A aquacultura funciona como uma porta de entrada para a resistência aos antibióticos nos ambientes aquáticos. Uma grande quantidade de antibióticos é utilizada nesta atividade, acabando muitos deles como resíduos que persistem nos ecossistemas aquáticos. De facto, estima-se que entre 30% e 90% dos antibióticos que são administrados oralmente nos animais são excretados intactos para o ambiente contribuindo para seleção de bactérias resistentes que residem nos compartimentos ambientais (Sanford *et al.*, 2011). As águas residuais resultantes da aquacultura, e produção animal, são sujeitas a tratamentos que não removem a totalidade dos resíduos de antibióticos, e são muitas vezes utilizadas para irrigação das culturas, além de as lamas resultantes serem aplicadas como fertilizante, promovendo uma via de transmissão dos genes de resistência dos animais para os solos e para as culturas, o que pode causar um grande impacto no Homem, que consome esses produtos hortícolas (Zhao *et al*., 2020).

Os animais selvagens constituem um outro reservatório de bactérias portadoras de genes de resistência a antibióticos, podendo contribuir para transferência de genes de resistência entre animais e humanos. Funcionam muitas vezes como sentinelas para detetar a contaminação ambiental por resíduos de antibióticos provenientes da atividade humana ou da pecuária (White & Hughes, 2019). Vários estudos indicam que os animais selvagens, que vivem próximo do homem, apresentam um maior número de bactérias portadoras de genes de resistência no seu trato intestinal do que os animais que vivem em locais remotos sem qualquer atividade humana (Allen *et al.*, 2010). Adicionalmente, as aves migratórias, devido às grandes distâncias percorridas e por muitas vezes, serem portadoras de bactérias resistentes, contribuem para a difusão da resistência aos antibióticos por vários pontos do planeta (Bonnedahl & Järhult, 2014).

5.3. Meio ambiente (água e solos)

A maioria dos antibióticos têm uma origem natural, ou seja, são produzidos por fungos ou bactérias que habitam o solo desde há milhões de anos e que, intrinsecamente, possuem mecanismos de resistência para sobreviverem (Acar & Moulin, 2012). Como exemplo, temos a produção de β-lactamases, que conferem resistência aos antibióticos β-lactâmicos; as β-lactamases de espetro alargado da família CTX-M, que têm grande importância clínica, apresentam uma elevada semelhança com uma β-lactamase cromossómica produzida pela bactéria ambiental *Kluyvera* (Collignon, 2015; Wright, 2010). Apesar disto, o Homem tem tido um grande impacto na quantidade de genes de resistência aos antibióticos presentes no ambiente: parte dos antibióticos produzidos são libertados para os ecossistemas naturais devido às águas residuais não tratadas de origem humana, hospitalar e provenientes da pecuária, da agricultura e da aquacultura e aos resíduos da indústria farmacêutica que são libertados para as águas superficiais (McEwen & Collignon, 2018; Queenan *et al.*, 2016). Num estudo realizado no rio Ave, no Norte de Portugal, foram isolados 4 exemplares de *E. coli* produtoras das carbapenemases VIM-1, VIM-

34 e IMP-8 (Kieffer *et al*., 2016). O gene bla_{KPC-2} também foi identificado numa estirpe de *E. coli* que foi isolada num rio próximo de Santo Tirso (Poirel *et al*., 2011).

Os antibióticos são excretados pelo homem e pelos animais (utilização de estrume de origem animal como fertilizante para os solos agrícolas), na maioria das vezes numa forma não metabolizada, sendo libertados para as águas residuais, diretamente libertadas num rio ou encaminhadas para uma estação de tratamento de águas residuais (ETAR). A contaminação dos rios pode causar uma reintrodução de bactérias resistentes no Homem, pois a sua água é utilizada para consumo humano e para irrigação das culturas (Kim & Cha, 2021). Um outro fator que contribui também para a contaminação dos solos com antibióticos é a aplicação das lamas resultantes do tratamento das águas residuais como fertilizantes nas plantações agrícolas, dado que o tratamento a que as águas são sujeitas não permite remover por completo os resíduos de antibiótico (Kahn, 2017).

No entanto, muitas vezes, o tratamento é insuficiente para que haja a remoção dos resíduos de antibióticos, funcionando estes locais como *hotspots* para a proliferação de bactérias resistentes e para a ocorrência de transferência genética horizontal entre bactérias (Acar & Moulin, 2012; Kim & Cha, 2021). De facto, estes antibióticos irão exercer uma pressão seletiva no ambiente levando à seleção de bactérias resistentes que podem ser transferidas para os produtos hortícolas, contaminando o homem que consome esses produtos (Lammie & Hughes, 2016).

Por outro lado, alguns antibióticos, tais como as tetraciclinas e a estreptomicina, são pulverizados em árvores de fruto para o tratamento e profilaxia de infeções causadas pela bactéria *Erwinia amylovora* que afeta frutos (maçãs e peras) contaminando o ambiente (Collignon & McEwen, 2019; Ventola, 2015). Em alguns locais, as plantas são irrigadas com água proveniente de resíduos animais sem que haja a remoção da contaminação bacteriana, levando à contaminação dos solos e das próprias plantas que podem servir para consumo humano, especialmente os vegetais que podem ser consumidos crus (Salyers & Shoemaker, 2006). Além disso, está comprovado que a aplicação de outras substâncias como metais (cobre, zinco, níquel e mercúrio), biocidas, herbicidas e pesticidas que trazem benefícios para as plantações, ao mesmo tempo promovem a co-seleção de genes de resistência a antibióticos (Magouras *et al*., 2017; Vikesland *et al*., 2019).

6. Objetivos:

Este trabalho teve como objetivo geral a caracterização da resistência aos antibióticos em estirpes isoladas de diferentes reservatórios ambientais aquáticos (afluente, água superficial, lamas e efluente de lagoa de estabilização; água subterrânea de um furo; água de canal de rega; água potável e água de rio). Quanto aos objetivos específicos, pretendem-se:

1. Isolar e identificar as estirpes bacterianas presentes nos diferentes reservatórios/compartimentos ambientais;
2. Caracterizar o fenótipo de resistência dessas estirpes;
3. Identificar quais os genes de resistência (resistoma) que estão associados ao fenótipo de resistência e quais os elementos genéticos móveis (mobiloma) responsáveis pela sua disseminação;
4. Comparar o resistoma e o mobiloma das estirpes bacterianas entre reservatórios;
5. Verificar se existe sazonalidade nas bactérias presentes nos vários compartimentos comparando as amostras recolhidas em diferentes estações do ano;
6. Selecionar e caracterizar estirpes de interesse através de sequenciação total do genoma, por forma a identificar genes de resistência aos antibióticos, fatores de virulência, elementos genéticos móveis, entre outros.

II. Metodologia

1. Amostragem e identificação bacteriana

Para a concretização deste trabalho experimental foram estudadas 8 amostras de águas de diferentes reservatórios ambientais aquáticos (afluente, água superficial, lamas e efluente de lagoa de estabilização; água subterrânea de um furo; água de canal de rega; água potável e água de rio) recolhidas numa estação experimental de produção agropecuária e agroalimentar em Portugal (Anexo I, Figura VII.1). A colheita das amostras de águas foi realizada no Verão de 2020. Por forma a permitir a comparação de resultados em diferentes estações do ano, foram adicionadas a este estudo 2 estirpes de *E. cloacae* complex isoladas de amostras colhidas no Outono do mesmo ano (no mesmo local e utilizando os mesmos métodos de colheita).

As amostras de água foram inicialmente enriquecidas em água peptonada (diluição 1/10). Após incubação em estufa durante 18 h, a 37ºC, foram semeadas em meio seletivo e diferencial recorrendo a ansas de 10 µL (meio MacConkey e/ou UriSelect™ 4 agar, com e sem antibiótico cefotaxima 2 mg/L e colistina 0,5 mg/L). O meio MacConkey permite apenas o crescimento de bactérias de Gram negativo, enquanto o meio UriSelect™ 4 agar é um meio que possui na sua composição diferentes substratos cromogénicos, possibilitando a identificação de bactérias patogénicas em culturas mistas (por exemplo, *E. cloacae* apresenta uma coloração azul e *E. coli* apresenta uma coloração rosa). As amostras de água foram também semeadas em meios não seletivos como o agar R2A (um meio pouco rico em nutrientes, utilizado para realizar contagens de bactérias em águas) e o Nutrient agar (um meio rico em nutrientes que permite o crescimento de uma grande variedade de microrganismos presentes em águas, esgotos, urina e fezes) com e sem antibiótico cefotaxima 2 mg/L ou colistina 0,5 mg/L.

Após incubação (37ºC, 18 h), foram selecionadas as colónias com morfologia distinta, com o objetivo de minimizar a duplicação de estirpes referentes à mesma amostra, que foram, posteriormente, re-inoculadas em meio de gelose simples (meio não seletivo) para a obtenção de culturas puras. As culturas puras foram conservadas em tubos de TSB (*Trypticase soy broth*) com 10% de glicerol a uma temperatura de -20ºC.

A identificação dos isolados bacterianos foi realizada recorrendo ao espectrómetro de massa VITEK® MS (BioMérieux), um sistema automatizado que utiliza a tecnologia MALDI-TOF (Dessorção Ionização Assistida por Matriz - Tempo de Voo), permitindo uma identificação precisa ao nível da espécie, género e família.

As espécies pertencentes ao *E. cloacae* complex (por exemplo, *E. cloacae e E. hormaechei)* têm grande interesse em termos de Saúde Pública. Estando presentes em vários dos compartimentos ambientais estudados, foram selecionadas para as etapas seguintes do presente trabalho.

2. Caracterização fenotípica da suscetibilidade aos antibióticos

2.1. Teste de suscetibilidade aos antibióticos por difusão em disco (TSA)

A determinação fenotípica da suscetibilidade aos antibióticos foi realizada recorrendo ao teste de suscetibilidade aos antibióticos (TSA) por difusão em disco, um método qualitativo que se encontra acreditado no Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infeções Associadas

aos Cuidados de Saúde (LNR-RA/IACS) pelo IPAC (Instituto Português de Acreditação) e que permitiu avaliar a suscetibilidade a diversas classes de antibióticos.

Este ensaio foi executado numa câmara de fluxo laminar Scanlaf Mars (Labogene) e para cada amostra foram realizados 2 TSA diferentes (Anexo II, Figuras VII.2 e VII.3), sendo que no total foram utilizados 20 antibióticos diferentes, pertencentes a diferentes classes (Tabela II.1).

Tabela II.1. Características dos discos de antibióticos utilizados e respetivos diâmetros críticos.

Classe	Antibiótico	Sigla	Carga do disco (µg)	Diâmetros críticos de halos de inibição (mm)	
				S	R
Aminoglicosídeos					
	Gentamicina	GEN	10	≥17	<17
	Estreptomicina	SMN	10	≥15	≤11
β-lactâmicos					
	Temocilina	TEM	30	≥50	<17
	Amoxicilina/Ácido clavulânico	AMC	20+10	≥19	<19
	Cefotaxima	COX	5	≥20	<17
	Cefepima	FEP	30	≥27	<24
	Meropeneme	MEM	10	≥22	<16
	Imipeneme	IPM	10	≥22	<19
	Ceftazidima	CZD	10	≥22	<19
	Piperacilina+tazobactame	PTZ	36	≥20	<20
	Aztreoname	ATM	30	≥26	<21
	Ertapeneme	ERT	10	≥25	<25
	Cefoxitina	FOX	30	≥19	<19
	Ampicilina	AMP	10	≥14	<14
	Ceftiofur	XNL	30	≥21	<17
Quinolonas					
	Ciprofloxacina	CIP	5	≥25	<22
	Enrofloxacina	ENR	5	≥23	≤16
Fenicóis					
	Cloranfenicol	CHL	30	≥17	<17
Sulfonamidas/Trimetoprim					
	Trimetoprim/sulfametoxazol	SXT	25	≥14	<11
Tetraciclinas					
	Tetraciclina	TET	30	≥15	≤11

Para tal, a partir de culturas puras obtidas em meio de gelose simples, foram preparados inóculos (0,5 McFarland) que foram posteriormente inoculados em meio Mueller-Hinton agar. Os discos de antibiótico (Biorad) foram colocados recorrendo a um dispensador (16 discos por placa, Biorad) ou adicionados manualmente recorrendo a uma pinça estéril e dispostos de acordo com o esquema do Anexo II (Figuras VII.2 e VII.3).

Com o objetivo de pesquisar e predizer mecanismos de resistência específicos (presença de β-lactamases pertencentes às classes A, B, C e/ou D), foram realizados testes de sinergia do disco duplo e aproximação de discos utilizando os seguintes discos: ácido borónico (300 µg), cloxacilina (500 µg), temocilina (30 µg), amoxicilina (20 µg)/ácido clavulânico (10 µg) e amoxicilina (20 µg)/ácido clavulânico (10

µg)/cloxacilina (500 µg), meropeneme (10 µg)/ácido dipicolínico (1000 µg), cefotaxima (30 µg) e cefotaxima (30 µg)/ácido clavulânico (10 µg).

Para o teste por aproximação de discos foram utilizados discos de antibiótico (cefotaxima, meropeneme e amoxicilina) e discos com os mesmos antibióticos em combinação com inibidores das diferentes classes de β-lactamases: ácido clavulânico (inibidor de β-lactamases de classe A), ácido dipicolínico (inibidor de β-lactamases de classe B) e cloxacilina (inibidor de β-lactamases de classe C), possibilitando a deteção de ESBLs (*extended spectrum β-lactamases*), MBLs (*metallo-β-lactamases*) e AmpCs (Tabela II.2).

Nos testes de sinergia do disco duplo, discos contendo antibióticos β-lactâmicos são colocados na proximidade (20 mm) de discos contendo um determinado inibidor das β-lactamases, ácido borónico (inibidor de β-lactamases de classe A) e cloxacilina (inibidor de β-lactamases de classe C). Assim, uma convergência dos halos de inibição entre os discos de antibiótico β-lactâmico e os discos com inibidores poderá ser indicativo da presença de um determinado tipo de β-lactamases (Tabela II.2).

O disco de faropeneme (Mast) foi utilizado para a pesquisa de carbapenemases. Os resultados foram interpretados de acordo com o esquema que se apresenta na Tabela II.2.

Tabela II.2. Testes fenotípicos complementares realizados para a deteção de β-lactamases.

Método	Antibiótico	Positivo se:	Interpretação[1]
Teste de sinergia por aproximação de discos			
	cefotaxima (30 µg) +/- ácido clavulânico (10 µg)	diferença de halos ≥ 5mm	ESBL
	meropeneme +/- ácido dipicolínico	diferença de halos ≥ 5mm	MBL
	amoxicilina/ácido clavulânico +/- cloxacilina	diferença de halos ≥ 5mm	AmpC (cromossómica ou plasmídica), na presença de ESBL
Teste de sinergia do disco duplo			
	meropeneme, ácido borónico	sinergia	Carbapenemases de Classe A
	cloxacilina, cefoxitina e ceftazidima	sinergia	AmpC (cromossómica ou plasmídica)
	meropeneme, ácido borónico e cloxacilina	sinergia	AmpC (cromossómica ou plasmídica) com perda de porinas
Outros			
	temocilina (ausência simultânea de sinergias com o meropeneme)	halo de inibição ≤11mm	Carbapenemases de Classe D (OXA-48-tipo)
		halo de inibição >11mm	ESBL com perda de porinas
	faropeneme	halo de inibição = 6mm	carbapenemase

[1] **Abreviaturas:** ESBL – *Extended spectrum β-lactamases*; MBL- *Metallo-β-lactamases*

As placas foram incubadas numa estufa por um período de 18 horas, a uma temperatura de 37ºC. No dia seguinte, procedeu-se à leitura dos halos de inibição, utilizando o sistema automatizado Adagio (Bio-Rad), que permite a leitura do diâmetro dos halos de inibição para os discos dos diferentes antibióticos, e a deteção da presença de sinergia e/ou antagonismo. Os diâmetros medidos pelo equipamento Adagio foram ajustados manualmente e verificados com recurso a uma régua graduada. Os resultados obtidos (categorização num fenótipo suscetível, suscetível com aumento da exposição ou resistente), foram

interpretados de acordo com os diâmetros críticos definidos pelo EUCAST v.2021 (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*; EUCAST, 2021), com exceção dos antibióticos estreptomicina/tetraciclina e ceftiofur/enrofloxacina cuja interpretação foi realizada tendo em conta os valores definidos pelo CLSI M100 v.2021 (CLSI, 2021) e CLSI VET08 v.2018 (CLSI, 2021), respetivamente (Tabela II.1).

2.2. Determinação da concentração inibitória mínima por microdiluição

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada pelo método de microdiluição, estando este método acreditado no Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde (LNR-RA/IACS) pelo IPAC (Instituto Português de Acreditação). Esta técnica foi apenas utilizada para o antibiótico colistina. Como estirpes de referência foram utilizadas a estirpe *E. coli* ATCC 25922 (*American Type Culture Collection*) como controlo de suscetibilidade e a estirpe *E. coli* NCTC 13846 (*National Collection of Type Strains*) como controlo de resistência.

Para a realização deste teste, efetuou-se uma suspensão bacteriana 0,5 McFarland (tal como referido em 2.1.), que foi posteriormente diluída a 1:20 em meio de Mueller-Hinton. A distribuição do inóculo numa microplaca com o antibiótico colistina, previamente preparada de acordo com a instrução de trabalho DDI URRA-IT02_01 (LNR-RA/IACS, 2020A), foi realizada seguindo as instruções do procedimento DDI URRA-PE01_07 (LNR-RA/IACS, 2020B). Resumidamente, com uma pipeta de Pasteur, pipetou-se a cultura bacteriana diluída por forma a encher os primeiros 3 poços de cada série de uma microplaca estéril (Microplaca 1). Seguidamente, pipetou-se 50 µL de meio de Mueller-Hinton para os poços de uma nova microplaca estéril (Microplaca 3), aos quais foi adicionado 50 µL da cultura bacteriana diluída. Por fim, com uma micropipeta multicanal distribuíram-se 50 µL dos primeiros 3 poços de cada série da microplaca estéril pelas primeiras 11 colunas da microplaca com o antibiótico colistina (Microplaca 2); a última coluna funcionará como controlo negativo, no qual não deverá ocorrer crescimento. A microplaca de antibiótico em cada série possui concentrações crescentes de antibiótico, numa gama de 0,125 mg/L a 128 mg/L (Figura II.1).

Para o controlo de esterilidade pipetou-se 100 µL do meio de Mueller-Hinton utilizado, para uma placa quadrada de meio Mueller-Hinton agar, onde se semeou por espalhamento, utilizando um espalhador estéril. O controlo de inóculo foi efetuado fazendo uma diluição de 1:1000 da estirpe *E. coli* ATCC 25922 (do poço da microplaca 2 correspondente) em soro fisiológico (10 µL de suspensão bacteriana + 9990 µL de soro fisiológico); depois de homogeneizado, pipetou-se 100 µL para uma placa quadrada de meio Mueller-Hinton agar e semeou-se com o auxílio de um espalhador estéril.

As microplacas (antibiótico inoculado, controlo de esterilidade e controlo de inóculo) foram incubadas em atmosfera de aerobiose a 35 ±1ºC durante 16 a 20 horas. No dia seguinte procedeu-se à leitura das microplacas, determinação da CIM e à contagem das colónias nas 2 placas de controlo, sendo expectável que no controlo de esterilidade não se obtenha crescimento bacteriano, enquanto no controlo de inóculo se espera entre 20 e 80 colónias. As estirpes foram classificadas em suscetíveis ou resistentes à colistina de acordo com as concentrações críticas definidas pelo EUCAST v.2021 (suscetível ≤2 mg/L; resistente >2 mg/L).

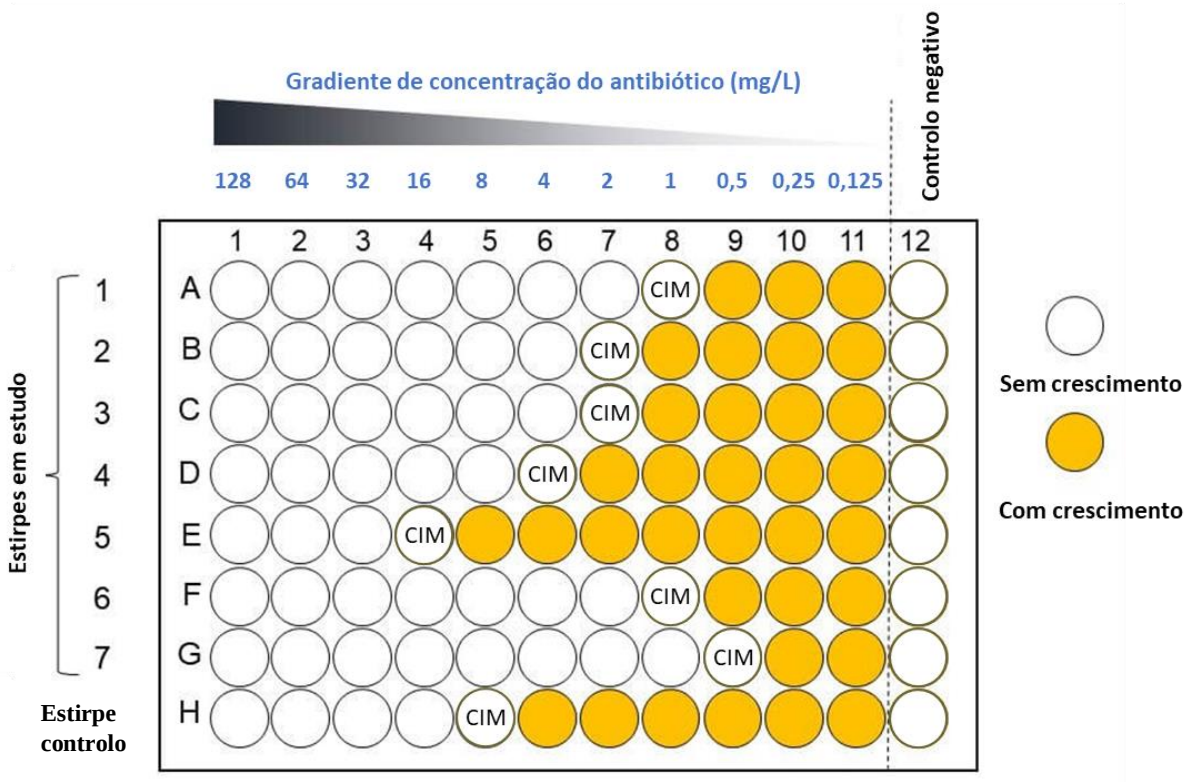


Figura II.1. Esquema e interpretação da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição.

3. Caracterização genotípica da suscetibilidade aos antibióticos

3.1. Extração de DNA

A extração do DNA bacteriano foi realizada recorrendo ao equipamento MagNA Pure 96 System (Roche) de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante para o kit *MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit* (Roche). Os isolados foram semeados em meio gelose simples e incubados a uma temperatura de 37ºC por um período de 18 h. No caso das bactérias de Gram negativo foram ressuspendidas várias colónias da cultura pura em 800 µL de água bidestilada estéril. Para as bactérias de Gram positivo, 3 a 5 colónias cultivadas em meio de gelose simples foram incubadas em meio líquido BHI (*Brain heart Infusion*) a uma temperatura de 37ºC por um período de 24 horas. Seguidamente, 2 mL da cultura foram centrifugados num *eppendorf*, durante 5 minutos, a uma velocidade de 15.7 RCF (*relative centrifugal force*). Após centrifugação, foi removido o sobrenadante recorrendo a uma pipeta de Pasteur, sem perturbar o *pellet*, e foram adicionados 300 µL do tampão de lise *MagNA Pure 96 External Lysis Buffer* (Roche). Em ambos os casos, 200 µL das suspensões foram pipetados para uma microplaca *MagNA Pure 96 Processing Cartridge*. Após extração, foi obtido um eluído de 100 µL (microplaca *MagNA Pure 96 Output Plate*).

3.2. Deteção de genes de resistência aos antibióticos

Os fenótipos observados nos testes de suscetibilidade aos antibióticos por difusão em disco e na determinação da CIM por microdiluição, permitiram orientar a análise genotípica, por PCR (*polymerase chain reaction*. Foram pesquisados genes de resistência aos antibióticos β-lactâmicos, colistina e

fluoroquinolonas, e foi efetuada a deteção de elementos genéticos móveis, tais como integrões. Foram utilizados *primers* específicos para cada um dos genes (Tabelas II.3 a II.12), de acordo com a sua sequência nucleotídica e em todas as reações foram utilizados controlos negativos e controlos positivos.

A mistura de reação foi preparada numa câmara de fluxo laminar (Holten Laminair) e consistiu em tampão 10x, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (100 mM, Roche), $MgCl_2$ (25 mM) (Qiagen), Q Solution 5x (Qiagen), *primers* específicos para cada gene (*forward* e *reverse*), Taq polimerase (5U/µL) (Qiagen) e água bidestilada estéril para um volume final de 25 µL. O DNA foi o último constituinte da mistura de pré-PCR a ser adicionado, iniciando-se de imediato a amplificação no termociclador MasterCycler Pro (Eppendorf). Os programas das reações de PCR multiplex e de PCR simples diferiam entre si (Figuras II.2 a II.9).

Para a pesquisa de β-lactamases das classes A e D realizou-se um PCR multiplex, que inclui a deteção dos genes *bla*$_{\text{OXA-48-tipo}}$, *bla*$_{\text{GES-tipo}}$, *bla*$_{\text{KPC-tipo}}$ e *bla*$_{\text{SME-tipo}}$ utilizando os *primers* adequados (Tabela II.3).

Tabela II.3. Características dos *primers* usados para a amplificação dos genes que codificam carbapenemases das classes A e D.

***Primers*[1]**	**Sequência nucleotídica 5'- 3'**	**Gene**	**Fragmento (pb)**
KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCTAG	*bla*$_{\text{KPC-tipo}}$	882
KPC-R	AGAGCCTTACTGCCCGTTG		
GES-Fi	AAAGCAGCTCAGATCGGTGT	*bla*$_{\text{GES-tipo}}$	583
GES-R2i	TCTCTCCAACAACCCAATC		
OXA-48-F2	TTGGTGGCATCGATTATCGG	*bla*$_{\text{OXA-48-tipo}}$	713
OXA-48-R	CCTAAACCATCCGATGTG		
SME-F	CAGATGAGCGGTTCCCTTTA	*bla*$_{\text{SME-tipo}}$	509
SME-R	AACCCAATCAGCAGGAACAC		

[1]*Primers* numa concentração de 20 µM

Para a pesquisa de carbapenemases da classe B e de genes de resistência à colistina realizou-se um PCR multiplex para a deteção dos genes *bla*$_{\text{VIM-tipo}}$, *bla*$_{\text{IMP-tipo}}$, *bla*$_{\text{NDM-tipo}}$ e *mcr-1/2*-tipo utilizando os *primers* adequados (Tabela II.4).

Tabela II.4. Características dos *primers* usados para a amplificação dos genes que codificam carbapenemases da classe B e os genes de resistência à colistina (*mcr-1/2*).

***Primers*[1]**	**Sequência nucleotídica 5'- 3'**	**Gene**	**Fragmento (pb)**
MCR-Fi2	ACTTATGGCACGGTCTATG	*mcr-1/2*	730
MCR-Ri2	CTTATCCATCACGCCTTTTG		
VIMF	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	*bla*$_{\text{VIM-tipo}}$	556
VIMR	GGAATGACGAACTGTGCTTC		
IMP-F	TCGTTTGAAGAAGTTAACGG	*bla*$_{\text{IMP-tipo}}$	587
IMP-Rold	GTAMGTTTCAAGAGTGATGC		
NDM-F	GTTTGATCGTCAGGGATGGC	*bla*$_{\text{NDM-tipo}}$	359
NDM-R	AACGGTGATATTGTCACTGGT		

[1]*Primers* numa concentração de 20 µM

Realizaram-se ainda PCRs simples para confirmação dos resultados obtido no multiplex para a deteção de carbapenemases das famílias VIM e IMP, grupos 1 e 2, utilizando os *primers* adequados (Tabela II.5).

Tabela II.5. Características dos *primers* usados para a amplificação dos genes que codificam para as carbapenemases da classe B VIM dos grupos I e II e IMP.

***Primers*[1]**	**Sequência nucleotídica 5'- 3'**	**Gene**	**Fragmento (pb)**
VIM_G1Fext	TCGCCCTAAAACAAAGTTAT	$bla_{\text{VIM-1-tipo}}$	871
VIM_G1Rext	CAACGATTTGTTATGCCGC		
VIM_2F	CAAAGTTATGCCGCACTCACC	$bla_{\text{VIM-2-tipo}}$	871
VIM_2R	GAGCGCAGCGGAGTGATG		
IMP-Fext	GCCCTAAAACAAAGTTAG	$bla_{\text{IMP1/2-tipo}}$	786
IMP-Rext	CGMCTTGTTAGAAATTTAG		

[1]*Primers* numa concentração de 20 µM

Para a deteção de genes de resistência à colistina (PMCR, *plasmid-mediated colistin resistance*), realizou-se um PCR multiplex para a amplificação dos genes *mcr-1, mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4 e mcr-5*, além disso foram ainda realizados PCRs simples para a deteção dos genes *mcr-9* e *mcr-10* utilizando os *primers* adequados (Tabela II.6).

Tabela II.6. Características dos *primers* usados para a amplificação dos genes de resistência à colistina.

***Primers*[1]**	**Sequência nucleotídica 5'- 3'**	**Gene**	**Fragmento (pb)**
mcr1_fw	AGTCCGTTTGTTCTTGTGGC	*mcr-1*	320
mcr1_rev	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG		
mcr2_fw	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	*mcr-2*	715
mcr2_rev	TCTAGCCCGACAAGCATACC		
mcr3_fw	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	*mcr-3*	929
mcr3_rev	AATGGAGATCCCCGTTTTT		
mcr4_fw	TCACTTTCATCACTGCGTTG	*mcr-4*	1116
mcr4_rev	TTGGTCCATGACTACCAATG		
mcr5_fw	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	*mcr-5*	1644
mcr5_rev	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG		
MCR9F	TTCCCTTTGTTCTGGTTG	*mcr-9*	1438
MCR9R	GGATTATAGACGCTGGTG		
MCR10F	TGTGGAAAGAAAACGATGG	*mcr-10*	322
MCR10R	GTGTGGCGAATGGTATTG		

[1]Primers numa concentração de 20 µM

Para a deteção de β-lactamases de espetro alargado (ESBL) das famílias TEM, SHV, AmpC e OXA-1 realizou-se um PCR multiplex para amplificação dos genes $bla_{\text{TEM-tipo}}$, $bla_{\text{AmpC-tipo}}$, $bla_{\text{SHV-tipo}}$, $bla_{\text{OXA-1-tipo}}$ utilizando os *primers* adequados (Tabela II.7).

Tabela II.7. Características dos *primers* usados para a amplificação dos genes que codificam β-lactamases de espetro alargado.

***Primers*[1]**	**Sequência nucleotídica 5'- 3'**	**Gene**	**Fragmento (pb)**
P1	TACGATACGGGAGGGCTTAC	$bla_{\text{TEM-tipo}}$	716
P2	TTCCTGTTTTTGCTCACCCA		
SHV F	TCAGCGAAAAACACCTTG	$bla_{\text{SHV-tipo}}$	471
SHV R	TCCCGCAGATAAATCACCA		
AmpC F	CCCCGCTTATAGAGCAACAA	$bla_{\text{AmpC-tipo}}$	634
AmpC R	TCAATGGTCGACTTCACACC		

Primers[1]	Sequência nucleotídica 5'- 3'	Gene	Fragmento (pb)
OXA F	TATCTACAGCAGCGCCAGTG	*bla*$_{\text{OXA-1-tipo}}$	199
OXA R	CGCATCAAATGCCATAAGTG		

[1]*Primers* numa concentração de 20 µM

Para a deteção de ESBL da família CTX-M, grupos 1,2 e 9, realizou-se um PCR multiplex para a deteção dos genes *bla*$_{\text{CTX-M-G1-tipo}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-G2-tipo}}$ e *bla*$_{\text{CTX-M-G9-tipo}}$, além disso realizou-se ainda um PCR simples para a deteção de β-lactamases da família CTX-M, grupo 8/25, para amplificação do gene *bla*$_{\text{CTX-M-G8/25-tipo}}$ utilizando os *primers* adequados (Tabela II.8).

Tabela II.8. Características dos *primers* usados para a amplificação dos genes que codificam β-lactamases de espetro alargado do tipo CTX-M.

Primers[1]	Sequência nucleotídica 5'- 3'	Gene	Fragmento (pb)
MultiCTXMGp1_for	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	*bla*$_{\text{CTX-M-G1}}$	688
MultiCTXMG1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
MultiCTXMGp2_for	CGTTAACGGCACGATGAC	*bla*$_{\text{CTX-M-G2}}$	404
MultiCTXMGp1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
MultiCTXMGp9_for	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	*bla*$_{\text{CTX-M-G9}}$	561
MultiCTXMGp9_rev	TGATTCTCGCCGCTGAAG		
CTXMg8/25_for	AACRCRCAGACGCTCTAC	*bla*$_{\text{CTX-M-G8/25}}$	326
CTXMg8/25_rev	TCGAGCCGGAASGTGTYAT		

[1]*Primers* numa concentração de 20 µM para os genes *bla*$_{\text{CTX-M-G1}}$, *bla*$_{\text{CTX-M-G2}}$ e *bla*$_{\text{CTX-M-G9}}$ e numa concentração de 50 µM para o gene *bla*$_{\text{CTX-M-G8/25.}}$

Para a deteção de β-lactamases de classe C, do tipo AmpC, foi realizado um PCR multiplex para a amplificação dos genes PMAB (*plasmid-mediated AmpC β-lactamases*): *bla*$_{\text{FOX-tipo}}$, *bla*$_{\text{ACC-tipo}}$, *bla*$_{\text{DHA-tipo,}}$ *bla*$_{\text{CIT-tipo}}$, *bla*$_{\text{MOX-tipo}}$ e *bla*$_{\text{MIR-tipo}}$. Foi ainda realizado um PCR simples para amplificação parcial do gene *bla*$_{\text{ACT-tipo}}$, um gene que codifica uma β-lactamase de espetro alargado do tipo AmpC que é ubiquitária nas espécies pertencentes ao *E. cloacae* complex, utilizando os *primers* adequados (Tabela II.9).

Tabela II.9. Características dos *primers* usados para a amplificação dos genes que codificam β-lactamases do tipo AmpC

Primers[1]	Sequência nucleotídica 5'- 3'	Gene	Fragmento (pb)
MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	*bla*$_{\text{MOX-tipo}}$	520
MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGGTGC		
CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	*bla*$_{\text{CIT-tipo}}$	462
CITMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		
DHAMF	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	*bla*$_{\text{DHA-tipo}}$	405
DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		
ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	*bla*$_{\text{ACC-tipo}}$	346
ACCMR	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC		
EBCMF2	CAGTTCTGCATTCGCCGCAC	*bla*$_{\text{MIR-tipo}}$	882
EBCMR2	CACCTTGTTATCACTGCCTCCGAC		
FOXMF2	GGACTCATCGCCAGTATTCCAACC	*bla*$_{\text{FOX-tipo}}$	286
FOXMR2	AACTTCAGCAGATCCGCCGAAC		
ACTF	GATGATGACTAAATCCCTTTGCTG	*bla*$_{\text{ACT-tipo}}$	1127
ACTR	AAATACGGTATGCCGCCTC		

[1]*Primers* numa concentração de 10 µM para todos os genes exceto para o gene *bla*$_{\text{ACT}}$ em que a concentração é 25 µM

Para a pesquisa de genes de resistência às quinolonas (PMQR, *plasmid-mediated quinolone resistance*) realizou-se um PCR multiplex para amplificação dos genes *qnrA*-tipo, *qnrB*-tipo, *qnrC*-tipo, *qnrD*-tipo, *qnrS*-tipo, *aac(6')-Ib-cr*-tipo e *qepA*-tipo. Foi ainda realizado um PCR simples para deteção do gene

oqxAB-tipo que codifica uma bomba de efluxo da família RND, constituída por 2 subunidades e que confere resistência às quinolonas e a outros antibióticos. Para ambos os PCR's foram utilizados os *primers* adequados (Tabela II.10).

Tabela II.10 Características dos *primers* usados para amplificar os genes que codificam para resistência às quinolonas

***Primers*[1]**	**Sequência nucleotídica 5'- 3'**	**Gene**	**Fragmento (pb)**
QnrA	GGGTATGGATATTATTGATAAAG	*qnrA*$_{\text{-tipo}}$	661
QnrB	CTAATCCGGCAGCACTATTA		
qnrBF-Tw	CCTGAGCGGCACTGAATTTAT	*qnrB*$_{\text{-tipo}}$	409
qnrBR-Tw	GTTTGCTGCTCGCCAGTCGA		
qnrCF2	AACGTACGATCAAATTG	*qnrC*$_{\text{-tipo}}$	560
qnrCR	TCCACTTTACGAGGTTCT		
qnrD-F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	*qnrD*$_{\text{-tipo}}$	582
qnrD-R	AACAAGCTGAAGCGCCTG		
QnrSJF	ACGACATTCGTCAACTGCAA	*qnrS*$_{\text{-tipo}}$	417
QnrSJR	TAAATTGGCACCCTGTAGGC		
aac6IB-5	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	*aac*$_{\text{-tipo}}$	482
aac6IB-6	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		
qepA_fwd	GAACCGATGACGAAGCACAG	*qepA*$_{\text{-tipo}}$	1013
qepA_rev	CGTCGTTAAAGCATTCTTGTCC		
oqxA-F	AGAGTTCAAAGCCACGCTG	*oqxAB*$_{\text{-tipo}}$	921
oqxB-R	CTCCTGCATCGCCGTCACCA		

[1]*Primers* numa concentração de 25µM para todos os genes exceto para o gene *oqxAB* em que a concentração é 20µM

Por fim foram ainda realizados PCRs simples para a pesquisa de integrases das classes 1, 2 e 3 codificadas pelos genes *Int1*-tipo, *Int2*-tipo e *Int3*-tipo e que são indicativas da presença de integrões, um dos elementos genéticos móveis responsáveis pela disseminação da resistência aos antibióticos, utilizando os *primers* adequados (Tabela II.11).

Tabela II.11. Características dos *primers* usados para a amplificação dos genes que codificam integrases das classes I, II e III

***Primers*[1]**	**Sequência nucleotídica 5'- 3'**	**Gene**	**Fragmento (pb)**
Int1F	TCTCGGGTAACATCAAGG	*Int1*	243
Int1R	AGGAGATCGGAAGACCTC		
Int2-F	CTTACCTGCACTGGATTAAG	*Int2*	289
Int2-R	TTGCGAGTATCCATAACCTG		
Int3-F	CTGAAGTCGAGGGTTTTCTG	*Int3*	687
Int3-R	GCAAGTGGGTGGCGAATG		

[1]*Primers* numa concentração de 20 µM

Para confirmação de alguns resultados obtidos nos PCRs multiplex e para obter uma sequência completa do gene *bla*$_{\text{ACT}}$, foram realizados PCRs simples para os genes *bla*$_{\text{ACC-tipo}}$, *bla*$_{\text{DHA-tipo}}$, *bla*$_{\text{ACT-tipo}}$ externo, *qnrB*-tipo e *qepA*-tipo utilizando os *primers* adequados (Tabela II.12).

Tabela II.12. Características dos *primers* usados para a confirmação de alguns resultados obtidos em PCR's anteriores e para obter uma sequência mais completa no caso do gene *bla*$_{\text{ACT-tipo}}$.

***Primers*[1]**	**Sequência nucleotídica 5'- 3'**	**Gene**	**Fragmento (pb)**
ACTF2	CTTGAACTGCTATTACGG	*bla*$_{\text{ACT-tipo}}$	1182
ACTR2	GGCAATGTTTACTACAGC		
ACC-Fext	ATGCAGAACACATTGAAG	*bla*$_{\text{ACC-tipo}}$	1161
ACC-Rext	CTACTTATTCCCTTCCAAT		
DHA-1A	CTGATGAAAAAATCGTTATC	*bla*$_{\text{DHA-tipo}}$	1143
DHA-1B	ATTCCAGTGCACTCAAAATA		
QnrBF2	ATGACGCCATTACTGTATAA	*qnrB*-tipo	697
QnrBR2	CTAACCAATCACCGCGATGC		
qepA2_fwd	ATGTCCGCCACGCTCCACG	*qepA*-tipo	1013
qepA2_rev	TCAACCAGATGCGAGCGCTG		

[1]*Primers* numa concentração de 25 µM para todos os genes exceto para o gene *bla*$_{\text{ACC}}$ em que a concentração é 20 µM

Para a amplificação dos diferentes genes foram utilizados diferentes programas de PCR que se encontram representados no Anexo III (Figuras VII.4. a VII.11.)

3.3. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR foram avaliados por migração em gel de agarose a 1% (Lonza), em tampão TBE 1X (Tris-Borato-EDTA) com 5 µL de corante SYBR™ Safe DNA Gel Stain (ThermoFisher) para permitir a observação das bandas que foram amplificadas.

Foram aplicados no gel 6 µL de produto de PCR, adicionados de 2µL de azul de bromofenol [composto por 0,25% Xileno de cianol FF (Sigma), 0,25% de azul de bromefenol (Merck), 69% água destilada e 30% glicerol] e efetuada uma corrida durante 30 minutos, a 150V. Os géis foram visualizados recorrendo a um transiluminador de luz ultravioleta Chemidoc XRS+ (Biorad) utilizando o software Quantity One versão 4.4.0. Os produtos de PCR foram identificados comparando o seu tamanho (pb) com o controlo positivo de cada gene (tamanho conhecido) ou com marcador de peso molecular (Hyperladder 1KB plus, Bioline).

3.4. Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR é um processo essencial que permite remover os produtos que não foram utilizados na reação de amplificação (por exemplo, *primers* e dNTPs) que podem inibir a reação de sequenciação.

Para a purificação dos produtos de PCR, obtidos previamente, utilizou-se um sistema de purificação - o Illustra™ ExoProStar™ 1-STEP Kit (Cytiva) - que se baseia na atividade de uma exonuclease I, que é responsável pela digestão do DNA em cadeia simples na direção 3'- 5' (*primers* e dNTPs) levando à libertação de desoxirribonucleósidos-5'-monofosfato (dNMPs), e de uma fosfatase alcalina, a qual catalisa a desfosforilação dos nucleótidos que não foram incorporados na reação de amplificação e dos dNTPs (GE Healthcare Life Sciences). A reação de purificação decorreu num termociclador MasterCycler Pro (Eppendorf) e consistiu num primeiro passo a 37ºC, com uma duração 15 minutos, que tem como função ativar as enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina, e um segundo passo a 80ºC, com uma duração de 15 minutos, que permite a inativação das mesmas. Os produtos resultantes da purificação foram migrados em gel de agarose para avaliação do resultado da reação de purificação nas condições descritas no ponto 3.3.

3.5. Sequenciação nucleotídica de Sanger

A confirmação dos genes de resistência detetados por PCR, *bla*$_{ACT}$ e *oqxAB*, e a identificação da respetiva variante, foi realizada através da sequenciação automática de Sanger.

Para a reação de sequenciação foi preparada uma mistura de pré-sequenciação constituída por 8,1µL de água bidestilada estéril, 1 µL de BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™), 0,4 µL dos *primers forward* ou *reverse* específicos de cada gene. Foi adicionado 0,5 µL do produto de PCR resultante da reação de purificação para perfazer um volume total de 10 µL. A mistura de reação foi colocada num termociclador MasterCycler Pro (Eppendorf) onde decorreu a reação de sequenciação, a qual consistiu numa primeira fase de desnaturação, por incubação a 96ºC, durante 30s, seguindo-se uma incubação a 56ºC, durante 5s e, por último, uma fase de extensão a 60ºC, durante 4min.

Após a reação de sequenciação, os DNAs sequenciados foram enviados à Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA para remoção dos terminadores por precipitação alcoólica, migração no sequenciador automático (ABI PRISM® 3100, Applied Biosystem) através de eletroforese capilar e registo da sequência nucleotídica em eletroferogramas. Os eletroferogramas foram enviados para o LNR-RA/IACS, onde foi feita a análise bioinformática e a interpretação das sequências obtidas recorrendo ao software Bionumerics© Applied Maths versão 3.5. Após a análise das sequências, por comparação com uma sequência padrão do gene em estudo, foi feito um BLAST no site do NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para a confirmação da identificação dos genes de resistência detetados por PCR e da respetiva variante de acordo com a percentagem de identidade e de cobertura.

4. Transferência de material genético por conjugação

A avaliação da transferência do gene *oqxAB* foi efetuada recorrendo à técnica de conjugação, utilizando como estirpes recetoras a *E. coli* C600 S^R e a *E. coli* C600 Rif ^{R}; a estreptomicina e a rifampicina foram utilizadas, respetivamente, como marcador de seleção, pois as estirpes em estudo eram suscetíveis a estes antibióticos. Foram utilizadas como dadoras, três estirpes de *E. cloacae* em estudo, em que foi detetado o gene *oqxAB*.

As estirpes dadoras e as recetoras foram semeadas em placas de meio MacConkey agar, nas quais foi colocado com o auxílio de uma pinça, um disco de ciprofloxacina (5 µg). Foram seguidamente incubadas a uma temperatura de 37ºC, durante 18h.

Para avaliar a suscetibilidade das estirpes dadoras e recetoras, foram preparadas placas de meio MacConkey agar com os antibióticos ciprofloxacina 0,125 mg/L, cloranfenicol 25 mg/L, estreptomicina 160 mg/L, rifampicina 250 mg/L, e combinações de ciprofloxacina 0,125 mg/L ou cloranfenicol 25 mg/L (antibióticos aos quais as estirpes recetoras eram suscetíveis) e rifampicina 250mg/L ou estreptomicina 160 mg/L (antibióticos aos quais as estirpes dadoras eram suscetíveis). As estirpes dadoras e recetoras foram então semeadas e incubadas a 37ºC, durante 18h.

Após avaliação dos resultados, foi inoculada uma colónia isolada das estirpes dadoras e recetoras em tubos de 5 mL de meio nutritivo BHI, os quais foram incubados durante 3 horas, a 37ºC, com agitação (Forma orbital shaker; (Thermocientific)) até atingir a fase de crescimento exponencial. De seguida, procedeu-se à transferência plasmídica por dois métodos em simultâneo: meio líquido e meio sólido.

Na conjugação em meio líquido adicionou-se, em ambiente estéril, 1 mL da estirpe dadora e 1 mL da estirpe recetora para um novo tubo com 5 mL de meio nutritivo BHI. Na conjugação em meio sólido transferiram-se 100 µL da estirpe recetora para uma placa de meio MacConkey agar e ao qual foi

sobreposto 100 µL da estirpe dadora. Colocaram-se as placas e os tubos a incubar a 37ºC, durante 24h, para que ocorresse a transferência plasmídica.

Para selecionar os transconjugantes com o plasmídeo da estirpe dadora foram utilizadas placas de MacConkey agar nas combinações atrás mencionadas. No caso do método em meio líquido, pipetou-se 100 µL da cultura de transconjugantes para o centro das placas de seleção, semeou-se a suspensão com o auxílio de um espalhador estéril. Para a seleção em meio sólido, pipetou-se 2 mL de água destilada estéril no qual foi ressuspendida uma porção da suspensão de transconjugantes. As placas foram incubadas a 37ºC, durante 24h.

No dia seguinte, as colónias obtidas foram selecionadas utilizando palitos estéreis, e inoculadas em 5 mL de meio nutritivo BHI, com as mesmas concentrações de antibiótico que foram utilizadas nas placas de seleção dos transconjugantes. Os tubos foram incubados com agitação, a 37ºC, durante 24h. As culturas bacterianas, dos tubos que apresentaram crescimento no meio BHI, foram semeadas em placas de meio seletivo MacConkey com as mesmas concentrações de antibióticos das placas de seleção dos transconjugantes. As placas foram incubadas a 37ºC, durante 24h.

Procedeu-se à extração do DNA dos transconjugantes obtidos (de acordo com o descrito em 3.1) e realizaram-se PCRs simples para a deteção do gene *oqxAB* com os *primers* adequados e nas condições anteriormente explicitadas [(Tabela II.10 / Figura II.6 (N)].

5. Determinação da clonalidade e diversidade genética

A determinação da clonalidade e da diversidade genética foi feita recorrendo à técnica de MLST (*MultiLocus Sequence Typing*), um método que é baseado na sequenciação do DNA e que permite a caracterização de isolados bacterianos recorrendo à amplificação e sequenciação de 7 genes *housekeeping*, ou seja, genes que são essenciais às funções metabólicas das células. À variação da sequência dos 7 genes é atribuído um número que corresponde a um alelo, e a combinação dos alelos dos 7 genes é utilizada para identificar o perfil alélico ou tipo de sequência (ST, *sequence type*). Os isolados que apresentam o mesmo perfil alélico são classificados como clones.

Na espécie *E. cloacae*, o MLST é constituído pelos genes *dnaA, fusA, gyrB, leuS, pyrG, rplB e rpoB*, que codificam uma proteína iniciadora da replicação cromossómica, um fator de elongação G, a subunidade B da DNA girase, uma leucina tRNA ligase, uma CTP sintetase, a proteína ribossomal L2 da subunidade ribossomal 50S e uma RNA polimerase, respetivamente (Akiyama *et al*., 2013)

Foram realizados PCRs simples para os 7 genes utilizando os *primers* adequados. A mistura de reação foi constituída por tampão 10x, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (100mM, Roche), $MgCl_2$ (25mM) (Qiagen), Q solution 5x (Qiagen), *primers* específicos para cada gene (Tabela II.13), Taq polimerase (5U/µL) (Qiagen) e água bidestilada estéril até perfazer um volume de 24 µL. Posteriormente adicionou-se 1 µL de DNA. A reação de amplificação decorreu num termociclador MasterCycler Pro (Eppendorf) com o programa adequado (Anexo IV, Figura VII.12). Os produtos de PCR foram migrados em gel de agarose (como descrito no ponto 3.3), purificados (como descrito no ponto 3.4) e sequenciados (como descrito no ponto 3.5).

As sequências obtidas, após a análise bioinformática e interpretação utilizando o programa Bionumerics© Applied Maths versão 3.5 foram submetidas na plataforma PubMLST (*Public databases for molecular typing and microbial genome diversity*, https://pubmlst.org/organisms/enterobacter-cloacae) específica para *E. cloacae*. Foi identificado o número correspondente a cada alelo dos 7 genes

e a combinação dos 7 alelos permite obter o ST. Os novos alelos identificados foram submetidos a curação na mesma página e foram atribuídos novos números de alelos e ST.

Tabela II.13. Características dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes pertencentes ao MLST de *Enterobacter* spp.

Primers[1]	**Sequence nucleotídica 5'- 3'**	**Gene**	**Fragmento (pb)**
dnaA-f2	AYAACCCGCTGTTCCTBTATGGCGGCAC	*dnaA*	442pb
dnaA-r	KGCCAGCGCCATCGCCATCTGACGCGG		
fusA-f2	TCGCGTTCGTTAACAAAATGGACCGTAT	*fusA*	646pb
fusA-r2	TCGCCAGACGGCCCAGAGCCAGACCCAT		
gyrB-f	TCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAA	*gyrB*	434pb
gyrB-r	GCAGAACCGCCCGCGGAGTCCCCTTCCA		
leuS-f2	GATCARCTSCCGGTKATCCTGCCGGAAG	*leuS*	578pb
leuS-r	ATAGCCGCAATTGCGGTATTGAAGGTCT		
pyrG-f	AYCCBGAYGTBATTGCRCAYMAGGCGAT	*pyrG*	259pb
pyrG-r	GCRCGRATYTCVCCCTSHTCGTCCCAGC		
rplB-f	GTAAACCGACATCTCCGGGTCGTCGCCA	*rplB*	607pb
rplB-r	ACCTTTGGTCTGAACGCCCCACGGAGTT		
rpoB-f	AAAAACGTATTCGTAAGGATTTTGGTAA	*rpoB*	545pb
rpoB-r2	CCAGCAGATCCAGGCTCAGCTCCATGTT		

[1]*Primers* com uma concentração de 20µM

6. Sequenciação Total do Genoma

A sequenciação total do genoma foi realizada, para algumas estirpes que apresentavam um fenótipo relevante (por exemplo, resistência aos carbapenemes e à colistina); para as quais não foi possível determinar, por PCR, qual o genótipo que justificava o fenótipo encontrado; estirpes pertencentes a STs diferentes; e estirpes com um fenótipo pouco comum. Este tipo de sequenciação foi realizada para identificar não só genes de resistência aos antibióticos, mas também fatores de virulência e elementos genéticos móveis (tais como plasmídeos, fagos ou transposões).

O DNA genómico, extraído como mencionado em 3.1, foi quantificado utilizando o fluorómetro Qubit 1.0 (Invitrogen). Após quantificação, os DNAs foram enviados à Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA onde foi feita a preparação das bibliotecas genómicas com o kit Nextera® XT DNA Sample Preparation (Illumina), utilizando 1ng de DNA genómico, de acordo com as instruções do fabricante. Seguidamente, foi realizada a sequenciação total do genoma utilizando fragmentos (*reads*) com 150 pares de bases, num equipamento MiSeq® System (Illumina). Após remoção dos adaptadores, os ficheiros fastQ contendo as *reads* foram enviados ao LNR-RA/IACS onde foi efetuada a restante análise bioinformática. As *reads* foram filtrados de acordo com critérios de qualidade e a assemblagem *de novo* (dos *reads* em *contigs*) foi realizada utilizando o software CLC Genomics Workbench 20.0 (QIAGEN). Os *contigs* obtidos foram depois submetidos a várias ferramentas bioinformáticas disponíveis online (Tabela II.14).

Tabela II.14. Ferramentas bioinformáticas utilizadas para a análise dos *contigs* obtidos na sequenciação total do genoma

Ferramenta bioinformática	**Função**	**Link**
Resfinder 4.1	Identificação de genes de resistência a antibióticos adquiridos	https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/
KmerResistance 2.2	Identificação de genes de resistência a antibióticos adquiridos utilizando Kmers	https://cge.cbs.dtu.dk/services/KmerResistance/
PathogenFinder 1.1	Prever a probabilidade de ser patogénico para o homem	https://cge.cbs.dtu.dk/services/PathogenFinder/
VirulenceFinder 2.0	Identificação de genes de virulência adquiridos	https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/
MLST 2.0	Identificação do *Multilocus sequence typing* (MLST)	https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/
PlasmidFinder 2.1	Identificação de plasmídeos	https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/
pMLST 2.0	Identificação do *Multilocus sequence typing* plasmídico	https://cge.cbs.dtu.dk/services/pMLST/
MGE 1.0.3	Identificação de elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposões, sequências de inserção, etc.	https://cge.cbs.dtu.dk/services/MobileElementFinder/
CSIPhylogeny 1.4	Construção de árvore filogenética de SNP (*single nucleotide polymorphisms*)	https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/
CARD 3.1.4 (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database)	Identificação de genes de resistência a antibióticos	https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi
PHASTER (Phage research tool enhanced release)	Identificação de regiões fágicas	https://phaster.ca/
RFPlasmid	Prever a natureza dos *contigs* (cromossómica ou plasmídica)	http://klif.uu.nl/rfplasmid/
StrainSeeker	Identificação de estirpes bacterianas	https://bioinfo.ut.ee/strainseeker/
Figtree 1.4.4	Visualizar e ajustar a árvore filogenética	https://github.com/rambaut/figtree/releases

III. Resultados

Este trabalho teve como objetivo identificar quais as espécies bacterianas que estavam presentes nos diferentes reservatórios ambientais, identificar quais os genes de resistência que estas possuem e quais os elementos genéticos móveis que podem ser responsáveis pela sua disseminação.

1. Identificação das espécies bacterianas presentes nos diferentes reservatórios

A utilização de meios seletivos e diferenciais permitiu o isolamento de um total de 143 estirpes bacterianas pertencentes a 45 espécies diferentes (73% de Gram negativo e 27% de Gram positivo), no conjunto dos 8 reservatórios (afluente, água superficial, lamas e efluente de lagoa de estabilização; água subterrânea de um furo; água de canal de rega; água potável e água de rio) (Tabela III.1).

Tabela III.1. Distribuição dos isolados por coloração de Gram, género/espécie e por reservatório.

Gram	Género/Espécie	água de canal de rega	água subterrânea furo	água de rio	Lagoa de estabilização				Total
					afluente	água superficial	lamas	efluente	
Negativo	*Acinetobacter spp.*				10				10
	Aeromonas spp.			5			2	9	16
	Alcaligenes faecalis						3		3
	Elizabethkingia spp.				1			3	4
	Enterobacter cloacae complex			11	4	5	2	7	29
	Moraxella osloensis		2		1				3
	Morganella morganii					2	2		4
	Myroides spp				1				1
	Providencia spp.			2			3		5
	Pseudomonas spp.	1	4	2	1	2	2	3	15
	Serratia marcescens	6		3	1			2	12
	Sphingomonas paucimobilis						2		2
	Stenotrophomonas maltophilia				1				1
	Total	**7**	**6**	**23**	**20**	**9**	**16**	**24**	**105**
Positivo	*Bacillus spp.*			1	1		11	1	14
	Cellulosimicrobium cellulans				1				1
	Enterococcus spp.				8	2	1	3	14
	Lactococcus spp.				3				3
	Micrococcus luteus		2		1				3
	Staphylococcus spp.							2	2
	Vagococcus fluvialis						1		1
	Total		**2**	**1**	**14**	**2**	**13**	**6**	**38**
Total Geral		**7**	**8**	**24**	**34**	**11**	**29**	**30**	**143**

Os reservatórios que apresentavam o maior número de estirpes bacterianas eram os pertencentes à lagoa de estabilização: em primeiro, o afluente (34/143; 23,8%), apresentando também uma maior diversidade

de espécies; em segundo, o efluente (30/143; 21,0%); seguido pelas lamas (29/143; 20,3%). Como era expectável, na água potável não foi detetada a presença de bactérias devido ao tratamento químico a que esta é sujeita por forma a ser própria para o consumo humano.

Os géneros/espécies que tinham uma maior representatividade no conjunto dos 8 reservatórios eram: *E. cloacae* complex (29/105; 27,6%), *Aeromonas* spp. (16/105; 15,2%) e *Pseudomonas* spp. (15/105; 14,3%), no caso das bactérias de Gram negativo; *Bacillus* spp. (14/38; 36,8%) e *Enterococcus* spp. (14/38; 36,8%), no caso das bactérias de Gram positivo. *Enterobacteriaceae* era a família predominante representando 47,6% (50/105) das estirpes bacterianas identificadas, considerando as bactérias de Gram negativo (35% do total de isolados). Alguns isolados desta família pertenciam ao *E. cloacae* complex (*E. cloacae* n= 22 e *E. hormaechei* n=7): 27 isolados obtidos no Verão e 2 isolados no Outono.

As espécies pertencentes ao *E. cloacae* complex têm uma grande importância em termos de saúde pública. Neste estudo, estas espécies estão presentes em 5 dos 8 reservatórios analisados, tendo sido decidido fazer a respetiva caracterização fenotípica e genotípica da suscetibilidade aos antibióticos. A distribuição dos isolados de *E. cloacae* complex pelos diferentes reservatórios pode ser visualizada na Figura III.1.

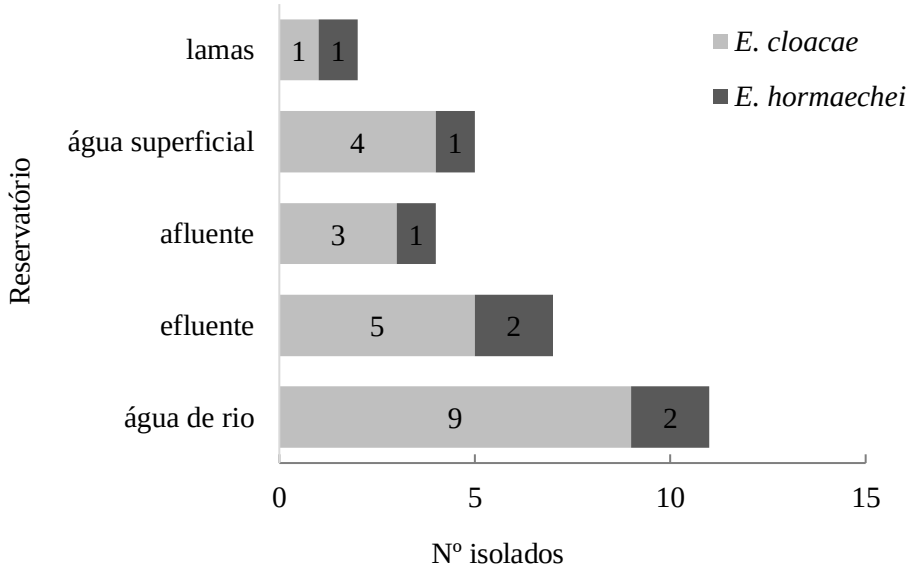


Figura III.1. Distribuição das estirpes de *E. cloacae* complex pelos diferentes reservatórios.

2. Caracterização fenotípica

A caracterização fenotípica das 29 estirpes (n=16 isoladas de meio de cultura suplementado com colistina; n=13 isoladas de meio de cultura sem antibiótico), realizada por TSA e CIM, permitiu avaliar a sua suscetibilidade a diferentes antibióticos (n=20). Foram utilizados antibióticos pertencentes a 7 classes diferentes: β-lactâmicos (n=12); fluoroquinolonas (n=2); aminoglicosídeos (n=2); fenicóis (n=1); sulfonamidas (n=1); tetraciclinas (n=1); e polimixinas (n=1) (Figura III.2).

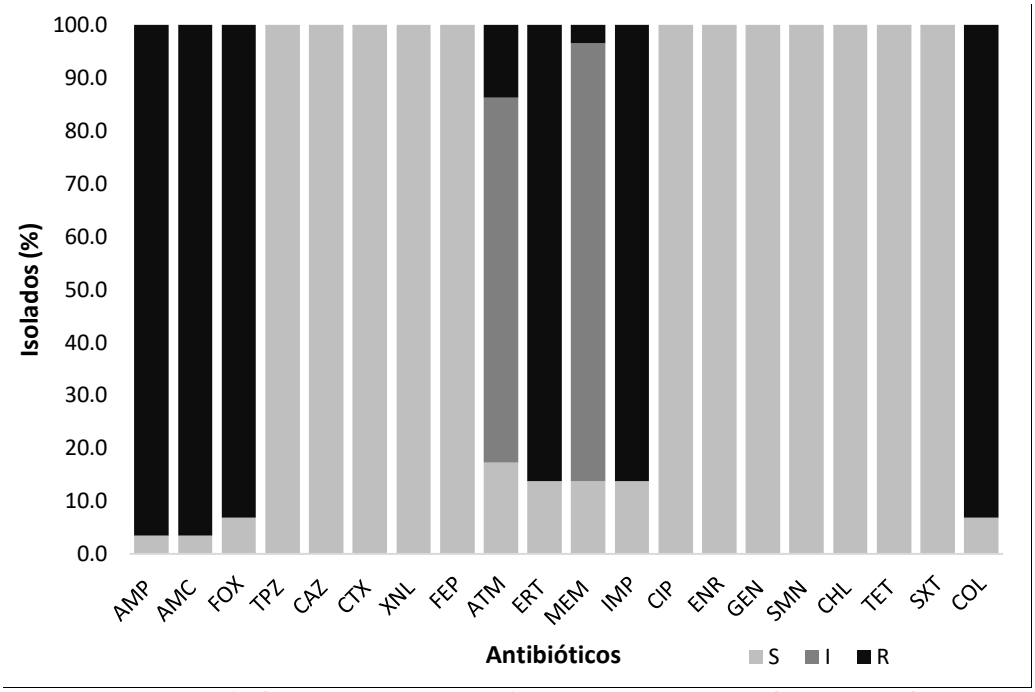


Figura III.2. Distribuição dos fenótipos observados nas diferentes estirpes. S: suscetível; I: suscetível com aumento da exposição; R: resistente. AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina+ácido clavulânico; FOX: cefoxitina; TZP: piperacilina+tazobactame; CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; XNL: ceftiofur; FEP: cefepime; ATM: aztreoname; ERT: ertapeneme; MEM: meropeneme; IMP: imipeneme; CIP: ciprofloxacina; ENR: enrofloxacina; GEN: gentamicina; SMN: estreptomicina; CHL: cloranfenicol; TET: tetraciclina; SXT: trimetoprim/sulfametoxazol; COL: colistina.

Um total de 96,6% (28/29) das estirpes apresentava um fenótipo de resistência à ampicilina e à combinação da amoxicilina com o inibidor ácido clavulânico; uma estirpe era suscetível. Em 4 dos reservatórios ambientais aquáticos (lamas, efluente, e água superficial da lagoa de estabilização, e água do rio), a percentagem de resistência às penicilinas (ampicilina e amoxicilina+ácido clavulânico) era de 100% (Tabela III.2). Todas as estirpes testadas eram suscetíveis à combinação piperacilina com o inibidor tazobactame. Os testes fenotípicos para a deteção de β-lactamases do tipo AmpC (diferença de halos ≥5mm entre os discos de amoxicilina+ácido clavulânico e amoxicilina+ácido clavulânico+cloxacilina; ocorrência de sinergia entre a cloxacilina e cefoxitina e/ou ceftazidima; sinergia entre o meropeneme e ácido borónico e cloxacilina) foram positivos para todas as amostras, indicando a presença de uma β-lactamase de classe C.

Noventa e três por cento (27/29) das estirpes apresentavam um fenótipo de resistência à cefoxitina, uma cefalosporina de segunda geração; as restantes duas (7%) eram suscetíveis. No reservatório afluente de lagoa de estabilização, 50% (2/4) das estirpes eram suscetíveis à cefoxitina. Em relação às cefalosporinas de terceira (ceftazidima, cefotaxima e ceftiofur) e quarta (cefepima) gerações, todas as estirpes foram suscetíveis. Os testes fenotípicos para a deteção de β-lactamases de espetro alargado (ESBL, diferença de halos ≥5mm entre os discos de cefotaxima e cefotaxima+ácido clavulânico) deram um resultado negativo para todas as amostras. Relativamente ao aztreoname, 13,8% (4/29) apresentavam uma resistência a este antibiótico, 69% das estirpes (20/29) apresentavam um fenótipo de suscetibilidade com aumento da exposição, e 17,2% (5/29) eram suscetíveis (incluindo todas as estirpes pertencentes ao reservatório afluente de lagoa de estabilização).

Tabela III.2. Suscetibilidade aos antibióticos das 29 estirpes de *E. cloacae* complex, por reservatório ambiental.

Classe	Antibiótico[1]	Lagoa de Estabilização												Água do rio (n=11)		
		Afluente (n=4)			Água superficial (n=5)			Lamas (n=2)			Efluente(n=7)					
		S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
B-lactâmicos	**AMP**	1 (25)	0	3 (75)	0	0	5 (100)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)
	AMC	1 (25)	0	3 (75)	0	0	5 (100)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)
	FOX	2 (50)	0	2 (50)	0	0	5 (100)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)
	TPZ	4 (100)	0	0	5 (100)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)	0	0
	CAZ	4 (100)	0	0	5 (100)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)	0	0
	CTX	4 (100)	0	0	5 (100)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)	0	0
	XNL	4 (100)	0	0	5 (100)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)	0	0
	FEP	4 (100)	0	0	5 (100)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)	0	0
	ATM	4 (100)	0	0	1 (20)	4 (80)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	7 (63,6)	4 (36,4)
	ERT	3 (75)	0	1 (25)	1 (20)	0	4 (80)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)
	MEM	3 (75)	0	1 (25)	1 (20)	4 (80)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)	0
	IMP	3 (75)	0	1 (25)	1 (20)	0	4 (80)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)
Quinolonas	**CIP**	4 (100)	0	0	5 (100)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)	0	0
	ENR	4 (100)	0	0	5 (100)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)	0	0
Aminoglicosídeos	**GEN**	4 (100)	0	0	5 (100)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)	0	0
	SMN	4 (100)	0	0	5 (100)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)	0	0
Fenicóis	**CHL**	4 (100)	0	0	5 (100)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)	0	0
Tetraciclinas	**TET**	4 (100)	0	0	5 (100)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)	0	0
Sulfonamidas/Trimetoprim	**SXT**	4 (100)	0	0	5 (100	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)	0	0
Polimixinas	**COL**	1 (25)	0	3 (75)	1 (20)	0	4 (80)	0	0	2 (100)	0	0	7 (100)	0	0	11 (100)

S: suscetível; I: suscetível com aumento da exposição; R: resistente.

[1.] AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina+ácido clavulânico; FOX: cefoxitina; TZP: piperacilina+tazobactame; CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; XNL: ceftiofur; FEP: cefepima; ATM: aztreoname; ERT: ertapeneme; MEM: meropeneme; IMP: imipeneme; CIP: ciprofloxacina; ENR: enrofloxacina; GEN: gentamicina; SMN: estreptomicina; CHL: cloranfenicol; TET: tetraciclina; SXT: trimetoprim/sulfametoxazol; COL: colistina.

Em relação aos carbapenemes, 86,2% (25/29) das estirpes apresentavam uma resistência ao imipeneme e ao ertapeneme; 13,8% (4/29) eram suscetíveis. No caso do meropeneme, 3,4% das estirpes (1/29) eram resistentes, 82,8% (24/29) tinham um fenótipo de suscetibilidade com aumento da exposição e 13,8% (4/29) eram suscetíveis. O teste fenotípico para a deteção de MBL (diferença de halos ≥5mm entre os discos de meropeneme e meropeneme+ácido dipicolínico) teve um resultado negativo para todas as estirpes. O teste de sinergia de duplo disco, para a deteção de carbapenemases de classe A (discos de meropeneme e ácido borónico), teve um resultado positivo para uma das estirpes (F544). A temocilina foi utilizada para a deteção de carbapenemases de classe D (OXA-48-tipo), tendo um resultado positivo em 10,3% (3/29) das amostras (halo de inibição ≤11mm e inexistência de sinergias com o meropeneme). Um total de 25/29 (86,2%) estirpes testou positivo para a presença de carbapenemases utilizando o teste do faropeneme.

Quando comparamos os reservatórios, todas as estirpes eram resistentes ao ertapeneme e ao imipeneme no efluente e lamas da lagoa de estabilização, e na água do rio. No afluente, 75% (3/4) das estirpes eram suscetíveis, enquanto 25% (1/4) eram resistentes; na água superficial, 20% (1/5) das estirpes eram suscetíveis e 80% (4/5) eram resistentes. No caso do meropeneme, todas as estirpes apresentavam um fenótipo de suscetibilidade com aumento da exposição no efluente e lamas da lagoa de estabilização, e na água do rio. No afluente 75% (3/4) das estirpes eram suscetíveis e 25% (1/4) eram resistentes a este antibiótico. Na água superficial, uma estirpe era suscetível ao meropeneme e 4 apresentavam um fenótipo de suscetibilidade com aumento da exposição.

Todas as estirpes eram suscetíveis às outras classes de antibióticos testadas: aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacina), fenicóis (cloranfenicol), tetraciclinas (tetraciclina) e sulfonamidas (trimetoprim-sulfametoxazol).

Em relação à colistina, 93,1% (27/29) das estirpes de *Enterobacter* apresentavam uma CIM>128 mg/L, sendo, portanto, resistentes a este antibiótico. No entanto, apenas 59,3% das estirpes de *E. cloacae* complex (16/27) foram isoladas em meios de cultura suplementados com colistina. As restantes 2 estirpes apresentavam uma CIM≤2 mg/L [0,25 mg/L e 0,5 mg/L, obtidas do afluente (F427) e água superficial (F1617) da lagoa de estabilização], classificando-as como suscetíveis (tendo sido isoladas de meio de cultura sem antibiótico).

3. Caracterização genotípica por PCR e sequenciação de Sanger

Os resultados obtidos na caracterização fenotípica por difusão em disco e na determinação da CIM por microdiluição permitiram identificar quais os possíveis mecanismos de resistência que poderiam estar associados aos fenótipos observados, direcionando a pesquisa dos genes de resistência por PCR (aos antibióticos β-lactâmicos, nomeadamente vários tipos de β-lactamases, genes plasmídicos de resistência à colistina, bombas de efluxo e elementos genéticos móveis como os integrões). Os genes de resistência às quinolonas também foram pesquisados por serem relativamente frequentes em estirpes ambientais. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela III.3.

Não foram detetados genes de resistência que codificassem para carbapenemases (classe A, B ou D), nem para nenhuma família de ESBL. Em relação à presença de β-lactamases de classe C, foi detetado o gene bla_{ACT} em todos as estirpes em estudo. O gene bla_{ACT} é um gene cromossómico, ubiquitário em *Enterobacter* spp., tendo sido, por isso, detetado em todas as estirpes. No entanto, foram identificadas por sequenciação 5 variantes deste gene: $bla_{\text{ACT-91,}}$ a variante predominante e que está presente em 83% (24/29) das estirpes estudadas (sendo a única variante presente nos reservatórios água do rio, efluente e lamas da lagoa de estabilização); $bla_{\text{ACT-92,}}$ identificada em 2 estirpes (F480 e F544); e as variantes

bla$_{ACT-17}$, *bla*$_{ACT-93}$ e *bla*$_{ACT-94}$ identificadas nas estirpes F427, F515 e F1617, respetivamente. As variantes *bla*$_{ACT-91}$, *bla*$_{ACT-92}$, *bla*$_{ACT-93}$, *bla*$_{ACT-94}$ foram identificadas pela primeira vez neste estudo e foram submetidas no GenBank[A] e obtidos os números de acesso: OL351615, OL351616, OL351618 e OL351619, respetivamente.

Tabela III.3. Genes de resistência identificados nas diferentes estirpes de *E. cloacae* complex, obtidos por PCR e sequenciação de Sanger.

Reservatório/ Estirpe	Perfil de resistência aos antibióticos[1]	Genótipo por PCR					
		CARBA[2]	ESBL[3]	AmpC/ PMAB[4]	PMQR[5]	PMCR[6]	Integrões[7]
Água do rio							
F418, F419, F431	AMP, AMC, FOX, ATM, ERT, MEM*, IMP, COL	(-)	(-)	*bla*$_{ACT-91}$	(-)	(-)	(-)
F487	AMP, AMC, FOX, ATM, ERT, MEM*, IMP, COL	(-)	(-)	*bla*$_{ACT-91}$	*oqxAB*	(-)	(-)
F485, F486, F488, F492, F504, F505, F506	AMP, AMC, FOX, ATM*, ERT, MEM*, IMP, COL	(-)	(-)	*bla*$_{ACT-91}$	*oqxAB*	(-)	(-)
Efluente							
F501, F503, F508, F509, F510, F511, F512	AMP, AMC, FOX, ATM*, ERT, MEM*, IMP, COL	(-)	(-)	*bla*$_{ACT-91}$	*oqxAB*	(-)	(-)
Afluente							
F427	AMP, AMC, FOX	(-)	(-)	*bla*$_{ACT-17}$	*oqxAB*	(-)	(-)
F480	COL	(-)	(-)	*bla*$_{ACT-92}$	*oqxAB*	(-)	(-)
F515	AMP, AMC, FOX, COL	(-)	(-)	*bla*$_{ACT-93}$	*oqxAB*	(-)	(-)
F544	AMP, AMC, ERT, MEM, IMP, COL	(-)	(-)	*bla*$_{ACT-92}$	*oqxAB*	(-)	(-)
Água de superfície							
F271, F449, F450, F1609	AMP, AMC, FOX, ATM*, ERT, MEM*, IMP, COL	(-)	(-)	*bla*$_{ACT-91}$	*oqxAB*	(-)	(-)
F1617	AMP, AMC, FOX	(-)	(-)	*bla*$_{ACT-94}$	*oqxAB*	(-)	(-)
Lamas							
F325, F478	AMP, AMC, FOX, ATM*, ERT, MEM*, IMP, COL	(-)	(-)	*bla*$_{ACT-91}$	*oqxAB*	(-)	(-)

1. AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina+ácido clavulânico; FOX: cefoxitina; ATM: aztreoname; ERT: ertapeneme; MEM: meropeneme; IMP: imipeneme; COL: colistina. * Indica um fenótipo de suscetibilidade com aumento da exposição (I)
2. CARBA: carbapenemases de classes A, B e D (*bla*$_{KPC}$, *bla*$_{GES}$, *bla*$_{OXA-48}$, *bla*$_{SME}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{NDM}$)
3. ESBL: *Extended-spectrum β-lactamase* (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{OXA}$)
4. PMAB: *Plasmid-mediated AmpC β-lactamase (bla*$_{MOX}$, *bla*$_{CIT}$, *bla*$_{DHA}$, *bla*$_{ACC}$, *bla*$_{MIR}$, *bla*$_{FOX}$, *bla*$_{ACT}$)
5. PMQR: *Plasmid-mediated quinolone resistance* (*qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS, aac(6')-Ib-cr, qepA, oqxAB*)
6. PMCR: *Plasmid-mediated colistin resistance* (*mcr1-10*)
7. Integrões de classe 1, 2 ou 3

(-). Não detetado

[A] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

Foi realizado o alinhamento destas proteínas relativamente a uma proteína de referência (NCBI *accession* no. EU427302) utilizando o programa CLC Genomics Workbench v.20.0 (Qiagen) e concluiu-se que as proteínas ACT-17 e ACT-94 eram as que apresentavam um maior número de substituições aminoacídicas, relativamente à proteína de referência; as proteínas ACT-92 e ACT-93 eram as mais semelhantes à proteína de referência com 10 substituições cada uma. A proteína ACT-92 apresenta uma substituição num local que é conservado na maioria das β-lactamases (posição 337, substituição de uma glicina por ácido aspártico) e que é importante para a interação com o substrato, podendo influenciar a sua atividade hidrolítica (Tabela III.4/ Anexo V, Figura VII.13).

Tabela III.4. Substituições aminoacídicas observadas nas diferentes variantes da proteína ACT relativamente à proteína de referência (EU427302).

Posições aminoacídicas	**3**	**7**	**13**	**14**	**15**	**16**	**18**	**21**	**23**	**33**	**34**	**44**	**45**	**57**	**61**	**68**	**73**	**106**	**111**	**115**
EU427302	T	C	S	T	S	C	V	A	M	E	R	A	I	Q	F	V	P	G	K	E
ACT-91	.	S	.	V	A	S	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.
ACT-92	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
ACT-93	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.
ACT-94	K	.	G	V	.	.	A	T	V	A	N	S	V	K	Y	I	.	D	R	Q
ACT-17	K	.	G	I	.	.	A	T	V	A	N	S	V	K	Y	I	.	D	R	Q

Posições aminoacídicas	**146**	**164**	**173**	**189**	**193**	**194**	**199**	**214**	**230**	**239**	**252**	**255**	**256**	**259**	**261**	**262**	**263**	**264**	**266**	**269**
EU427302	A	P	T	S	A	I	F	A	H	E	S	M	V	K	D	S	L	Q	N	R
ACT-91	T	.	A	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	P	T	.
ACT-92	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	N	I	.	.	.	.	.	.	.	.
ACT-93	T	.	A	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
ACT-94	T	S	A	P	A	M	L	A	R	Q	N	.	A	A	E	N	V	A	A	K
ACT-17	T	P	A	P	A	M	L	A	R	Q	N	.	A	A	E	N	V	A	A	K

Posições aminoacídicas	**270**	**272**	**273**	**282**	**284**	**299**	**301**	**305**	**309**	**317**	**318**	**319**	**329**	**337**	**354**	**362**	**375**	**378**
EU427302	Q	I	A	V	A	D	K	E	N	P	A	R	N	G	L	K	R	S
ACT-91	.	I	.	.	.	.	.	K	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
ACT-92	K	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**D**	.	.	.	.
ACT-93	K	L	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
ACT-94	.	.	.	I	S	E	N	.	S	.	V	V	K	.	I	T	H	E
ACT-17	.	.	.	I	S	E	N	.	S	.	V	A	K	.	I	T	H	E

Abreviaturas: A-Alanina; C-Cisteína; D- Ácido aspártico; E-Ácido glutâmico; F-Fenilalanina; G-Glicina; H-Histidina; I-Isoleucina; K-Lisina; L- Leucina; M-Metionina; N- Asparagina; P-Prolina; Q-Glutamina; R-Arginina; S-Serina; T-Treonina; V-Valina; Y-Tirosina. (.) aminoácido igual à referência. Numeração considerando a primeira metionina como o aminoácido 1; Letra a azul indica substituição aminoacídica em local conservado, de acordo com a numeração de Mack *et al* (Mack *et al.*, 2020).

No que diz respeito às bombas de efluxo, foi detetado o operão *oqxAB* em 90% das estirpes estudadas, estando apenas ausente nas estirpes F418, F419 e F431. O operão *oqxAB* codifica duas subunidades,

oqxA e *oqxB*, que constituem uma bomba de efluxo da família RND, e que confere uma diminuição da suscetibilidade não só às quinolonas, mas também ao cloranfenicol, tigeciclina e a outros antibióticos.

Não foram detetados genes que codificam PMQR, PMCR, nem integrões de classe 1, 2 e 3.

4. Conjugação

A redução da concentração de antibiótico no interior da célula, através de bombas de efluxo, é um mecanismo de resistência predominantemente codificado pelo genoma cromossómico, pode também ser mediado por plasmídeos, o que, é o caso da bomba de efluxo OqxAB. Assim, apesar de não ter sido observada nas estirpes em estudo uma diminuição da suscetibilidade às quinolonas, foi avaliada a localização plasmídica do operão *oqxAB*, pela técnica de conjugação.

Na conjugação foram utilizadas as estirpes F485, F486 e F487 como dadoras do gene *oqxAB*, e como recetoras as estirpes *E. coli* C600 S^R e *E. coli* C600 Rif ^{R}. Não houve crescimento de colónias nas placas de MacConkey com cloranfenicol. Nas placas de rifampicina + ciprofloxacina houve crescimento de 3 colónias; nas placas de estreptomicina + ciprofloxacina houve crescimento de 11 colónias. A identificação por VITEK® MS (BioMérieux) permitiu identificar 12 das 14 colónias como *E. coli* enquanto as restantes 2 pertenciam às espécies *E. cloacae* e *E. hormaechei*. Assim, estas últimas duas foram excluídas por pertencerem à espécie da estirpe dadora, sendo que apenas nos interessavam as colónias da espécie da estirpe recetora (*E. coli*), pois apenas estas poderiam ser transconjungantes.

Nos testes confirmatórios, o gene *oqxAB* não foi detetado em nenhum dos possíveis transconjugantes, o que poderá indicar que, possivelmente, este gene terá uma natureza cromossómica ou estará localizado num elemento genético que não permite a sua transferência, como, por exemplo, um plasmídeo não mobilizável.

5. *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

Nas estirpes de *E. cloacae* complex estudadas foram identificadas 5 sequências-tipo (ST, do inglês *sequence type*) diferentes (Tabela III.5). ST1688 é o ST predominante, estando presente em 83% (24/29) das estirpes estudadas, sendo o único representante em 3 reservatórios (água do rio, efluente e lamas da lagoa de estabilização).

Tabela III.5. Associação entre o ST e o respetivo perfil alélico para os 5 ST's identificados nas 29 estirpes de *E. cloacae* complex.

Sequence type	**Perfil alélico**						
(n)	***dnaA***	***fusA***	***gyrB***	***leuS***	***pyrG***	***rplB***	***rpoB***
ST170 (n=1)	62	4	4	6	39	4	44
ST1116 (n=1)	4	83	342	83	76	4	4
ST 1688 (n=24)	455	177	298	556	272	122	177
ST1727 (n=2)	229	14	235	574	98	11	16
ST1728 (n=1)	229	312	243	273	22	9	15

No reservatório afluente de lagoa de estabilização, estão presentes 3 ST diferentes: o ST170 (n=1), o ST1728 (n=1) e o ST1727 (n=2). Por último, o ST1116 está apenas presente numa estirpe que foi isolada

na água de superfície da lagoa de estabilização (Figura III.3). Os ST1727 e ST1728 de *E. cloacae* foram descritos pela primeira vez neste estudo e foram submetidos na plataforma PubMLST[B].

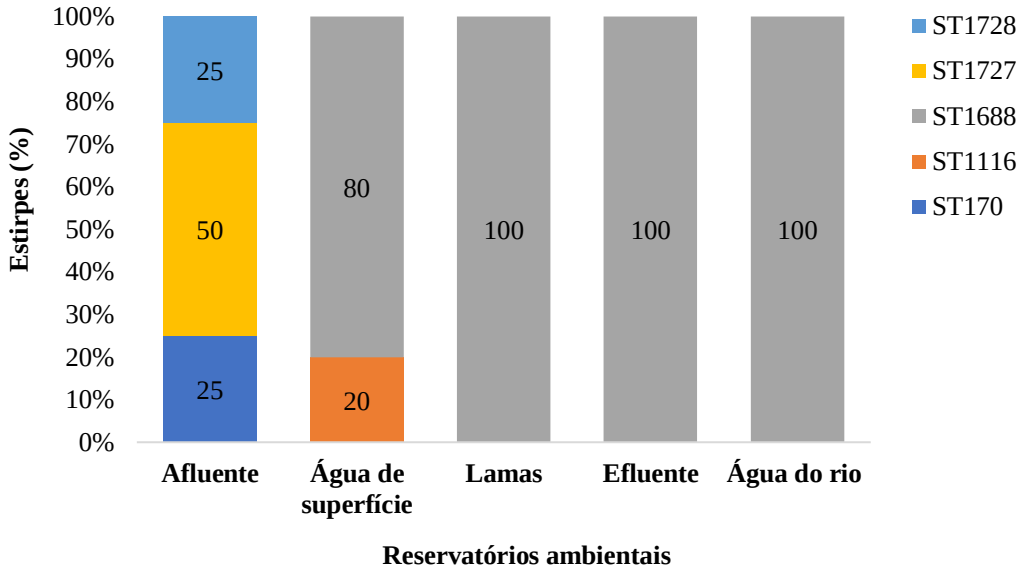


Figura III.3. Distribuição dos tipos de sequência (ST) identificados por reservatório ambiental

6. Sequenciação total do genoma (WGS)

A sequenciação total do genoma permitiu confirmar os resultados que foram obtidos por PCR e por sequenciação de Sanger, e identificar outros genes menos comuns e para os quais não foi realizado PCR (devido ao vasto número de genes de resistência existentes). Esta técnica permitiu identificar não só os genes de resistência aos antibióticos (cromossómicos e/ou plasmídicos), mas também genes de resistência a desinfetantes, fatores de virulência, elementos genéticos móveis (MGE: plasmídeos e o seu respetivo pMLST, sequências de inserção, transposões), além de permitir prever a probabilidade de as estirpes serem patogénicas para o Homem.

A sequenciação total do genoma foi apenas realizada para 12 estirpes (F271, F325, F427, F431, F480, F487, F504, F509, F515, F544, F1609, F1617) que foram selecionadas de acordo com os fenótipos obtidos e nos genes detetados por PCR e sequenciação de Sanger.

A estirpe F504 não foi incluída no estudo genómico, pois o DNA estava contaminado, o que foi comprovado pelo tamanho do genoma muito superior às restantes estirpes; adicionalmente, utilizando a ferramenta StrainSeeker[C] comprovou-se que 54% do genoma correspondia a *Aeromonas veronii*, enquanto apenas 46% pertenciam a *E. cloacae*.

A tabela III.6 resume os resultados obtidos na análise bioinformática:

[B] https://pubmlst.org/organisms/enterobacter-cloacae

[C] https://bioinfo.ut.ee/strainseeker/

Tabela III.6. Quadro resumo dos resultados obtidos na análise bioinformática da sequenciação total do genoma.

Reservatório	Estirpe	MLST	Genes de resistência a antibióticos[1]	Fatores de virulência (% identidade)	Plasmídeos (% identidade)	Outros MGE[2]	Número de regiões fágicas (i/q/inc)[3]	Patogénico para o homem (%)
Lagoa de estabilização – Água de superfície	F271	ST1688	***adeF*-tipo**, ***bla*$_{ampH}$-tipo**, ***baeR*-tipo**, *bla*$_{ACT-91}$, ***bla*$_{FRI-8}$**, ***CRP*-tipo**, ***EF-Tu*-tipo**, ***emrR*-tipo**, *fosA2*-tipo, ***H-NS*-tipo**, ***KpnE*-tipo**, ***KpnF*-tipo**, ***KpnH*-tipo**, ***mar*A-tipo**, ***marR*-tipo**, *mdf(A)*-tipo, ***msbA*-tipo**, *oqxAB*-tipo, ***PBP3*-tipo**, ***ramA*-tipo**, ***rsmA*-tipo**, ***UhpT*-tipo**	(-)	IncFII(Yp) (92,2%)	IS629, IS679, ISEc30, ISEc38, ISEcI1, ISEhe3, ISRaq1, ISSty2	8 (3/4/1)	77,6
	F1609					IS629, IS630, IS679, ISEc30, ISEc38, ISEcI1 ISEhe3, ISRaq1, ISSty2	9 (2/5/2)	77,3
	F1617	ST1116	***adeF*-tipo**, ***bla*$_{ampH}$-tipo**, ***baeR*-tipo**, *bla*$_{ACT-94}$, ***CRP*-tipo**, ***EF-Tu*-tipo**, ***emrB*-tipo**, ***emrR*-tipo**, *fosA2*-tipo, ***H-NS*-tipo**, ***KpnE*-tipo**, ***KpnF*-tipo**, ***marA*-tipo**, ***marR*-tipo**, *mdf(A)*-tipo, ***msbA*-tipo**, *oqxAB*-tipo, ***PBP3*-tipo**, ***rsmA*-tipo**, ***UhpT*-tipo**	*iroN* (99,4%)	(-)	(-)	2 (1/0/1)	74,8
Lamas	F325	ST1688	***adeF*-tipo**, ***bla*$_{ampH}$-tipo**, ***baeR*-tipo**, *bla*$_{ACT-91}$, ***bla*$_{FRI-8}$**, ***CRP*-tipo**, ***EF-Tu*-tipo**, ***emrR*-tipo**, *fosA2*-tipo, ***H-NS*-tipo**, ***KpnE*-tipo**, ***KpnF*-tipo**, ***KpnH*-tipo**, ***marA*-tipo**, ***marR*-tipo**, *mdf(A)*-tipo, ***msbA*-tipo**, *oqxAB*-tipo, ***PBP3*-tipo**, ***ramA*-tipo**, ***rsmA*-tipo**, ***UhpT*-tipo**	(-)	IncFII(Yp) (92,2%)	IS629, IS679, ISEc30, ISEc38, ISEcI1, ISEhe3, ISPeat2, ISRaq1	8 (2/5/1)	77,5
Afluente	F427	ST170	***adeF*-tipo**, ***bla*$_{ampH}$-tipo**, ***baeR*-tipo**, *bla*$_{ACT-17}$, ***CRP*-tipo**, ***EF-Tu*-tipo**, ***emrB*-tipo**, ***emrR*-tipo**, ***H-NS*-tipo**, ***KpnE*-tipo**, ***KpnF*-tipo**, ***marA*-tipo**, ***marR*-tipo**, *mdf(A)*-tipo, ***msbA*-tipo**, *oqxAB*-tipo, ***PBP3*-tipo**, ***PmrF*-tipo**, ***rsmA*-tipo**, ***UhpT*-tipo**	*iroN* (99,4%)	Col(MG828) (95,1%), Col(pHAD28) (96,12%)	IS5075, IS903, ISEam1, ISEcI1, ISEhe3, ISKox1, ISKpn14, ISKpn21, ISPeat2	7 (5/0/2)	77,8
	F480	ST1727	***adeF*-tipo**, ***bla*$_{ampH}$-tipo**, ***baeR*-tipo**, *bla*$_{ACT-92}$, ***CRP*-tipo**, ***EF-Tu*-tipo**, ***emrB*-tipo**, ***emrR*-tipo**, *fosA2*-tipo, ***H-NS*-tipo**, ***KpnE*-tipo**, ***KpnF*-tipo**, ***marA*-tipo**, ***marR*-tipo**, ***msbA*-tipo**, *oqxAB*-tipo, ***PBP3*-tipo**, ***ramA*-tipo**, ***rsmA*-tipo**, ***UhpT*-tipo**	(-)	IncFII(Yp) (99,1%)	ISEhe3, ISRaq1, ISRor2, ISSen7, MITEEc1, MITEYpe1	9 (4/2/3)	82,1

Reservatório	Estirpe	MLST	Genes de resistência a antibióticos[1]	Fatores de virulência (% identidade)	Plasmídeos (% identidade)	Outros MGE[2]	Número de regiões fágicas (i/q/inc)[3]	Patogénico para o homem (%)
	F515	ST1728	***adeF*-tipo**, ***bla*$_{ampH}$-tipo**, ***baeR*-tipo**, *bla*$_{ACT-93}$, ***CRP*-tipo**, ***EF-Tu*-tipo**, ***emrB*-tipo**, ***emrR*-tipo**, *fosA2*-tipo, ***H-NS*-tipo**, ***KpnE*-tipo**, ***KpnF*-tipo**, ***marA*-tipo**, ***marR*-tipo**, *mdf(A)*-tipo, ***msbA*-tipo**, *oqxAB*-tipo, ***PBP3*-tipo**, ***ramA*-tipo**, ***rsmA*-tipo**	(-)	IncFII(Yp) (94,8%)	IS629, ISAbo1, ISCfr14, ISEc36, ISEcI1, ISKpn34, ISRaq1, ISSba10, ISSpu2, MITEEc1, MITEYpe1	9 (4/2/3)	80,8
	F544	ST1727	***adeF*-tipo**, ***bla*$_{ampH}$-tipo**, ***baeR*-tipo**, *bla*$_{ACT-92}$, ***bla*$_{IMI-6}$**, ***CRP*-tipo**, ***EF-Tu*-tipo**, ***emrB*-tipo**, ***emrR*-tipo**, *fosA2*-tipo, ***H-NS*-tipo**, ***KpnE*-tipo**, ***KpnF*-tipo**, ***marA*-tipo**, ***marR*-tipo**, ***msbA*-tipo**, ***NmcR*-tipo**, *oqxAB*-tipo, ***PBP3*-tipo**, ***ramA*-tipo**, ***rsmA*-tipo**, ***UhtP*-tipo**	(-)	IncFII(Yp) (99,1%)	cn_11215_IS5, IS640, IS679, ISCfr14, ISCfr26, ISEcI1, ISEhe3, ISKpn38, ISPIge2, ISRaq1, ISSen3, MITEEc1, MITEYpe1, TN1000,	8 (2/2/4)	79,6
Efluente	F509	ST1688	***adeF*-tipo**, ***bla*$_{ampH}$-tipo**, ***baeR*-tipo**, *bla*$_{ACT-91}$, ***bla*$_{FRI-8}$**, ***CRP*-tipo**, ***EF-Tu*-tipo**, ***emrR*-tipo**, *fosA2*-tipo, ***H-NS*-tipo**, ***KpnE*-tipo**, ***KpnF*-tipo**, ***KpnH*-tipo**, ***marA*-tipo**, ***marR*-tipo**, *mdf (A)*-tipo, ***msbA*-tipo**, *oqxAB*-tipo, ***PBP3*-tipo**, ***ramA*-tipo**, ***rsmA*-tipo**, ***UhpT*-tipo**	(-)	IncFII(Yp) (92,2%)	IS629, IS630, IS679, ISEc30, ISEc38, ISEcI1, ISEhe3, ISPeat2, ISRaq1	8 (3/3/2)	77,1
Água do rio	F431	ST1688	***adeF*-tipo**, ***bla*$_{ampH}$-tipo**, ***baeR*-tipo**, *bla*$_{ACT-91}$, ***bla*$_{FRI-8}$**, ***CRP*-tipo**, ***EF-Tu*-tipo**, ***emrR*-tipo**, *fosA2*-tipo, ***H-NS*-tipo**, ***KpnE*-tipo**, ***KpnF*-tipo**, ***KpnH*-tipo**, ***marA*-tipo**, ***marR*-tipo**, *mdf(A)*-tipo, ***msbA*-tipo**, *oqxAB*-tipo, ***PBP3*-tipo**, ***ramA*-tipo**, ***rsmA*-tipo**, ***UhpT*-tipo**	(-)	IncFII(Yp) (92,2%)	IS629, IS630, IS679, ISEc30, ISEc38, ISEcI1, ISEhe3, ISRaq1, ISSty2	8 (3/4/1)	77,3
	F487					IS629, IS630, IS640 IS679, ISEc30, ISEc38, ISEcI1, ISEhe3, ISPeat2, ISRaq1, ISSen3, ISSgsp1		77,1

Abreviaturas: AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina+ácido clavulânico; FOX: cefoxitina; ATM: aztreoname; ERT: ertapeneme; MEM: meropeneme; IMP: imipeneme; COL: colistina.

[1] Os genes a negrito foram identificados da plataforma CARD (*The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*). Os restantes genes foram identificados recorrendo ao Resfinder 4.1 https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/);

[2] Todos os elementos genéticos móveis apresentam uma identidade inferior a 100% exceto a sequência de inserção 5 (IS5) na estirpe F544

[3] As regiões fágicas que apresentam uma identidade superior a 90% são classificadas como intactas (i), as que apresentam uma identidade entre 70 e 90% são classificadas como questionáveis (q), enquanto as que apresentam uma identidade a 70% são classificadas como incompletas (inc). (-) Não detetado

6.1. Resistoma, viruloma e mobiloma

A sequenciação total do genoma permitiu identificar 2 genes de resistência aos carbapenemes: o gene bla_{FRI-8} presente em 6/11 estirpes sequenciadas e os genes bla_{IMI-6} e o respetivo regulador *NmcR* encontrado em *E. cloacae*, apenas detetado na estirpe F544 (Tabela III.6). Foram ainda detetados genes que codificam para β-lactamases do tipo AmpC (bla_{ACT}, e bla_{AmpH}), e um gene responsável pela inativação da fosfomicina (*fosA2*). Utilizando a ferramenta online CARD, foram identificados vários genes de resistência descritos como cromossómicos, a maioria codificando bombas de efluxo [*emrR, KpnH, rsmA, crp, adeF, oqxAB, KpnF, KpnE, marA, msbA, baeR, H-NS, marR, emrB e mdf(A)*], as quais são responsáveis pelo efluxo de antibióticos pertencentes a várias classes como as quinolonas, macrólidos, tetraciclinas, β-lactâmicos e fenicóis.

Foi também detetado o gene *ramA*, que poderá ser responsável pela resistência à colistina nestas estirpes, dado que em outras espécies, como por exemplo *K. pneumoniae* já foi confirmado que a sobreexpressão deste gene estará relacionada com a resistência às polimixinas, assim este gene também poderá, nestas estirpes, desempenhar esse papel, apesar de estar pouco descrito na literatura. Foram ainda detetados genes relacionados com a alteração do alvo do antibiótico, descritos como conferindo resistência à fosfomicina (*uhpT)*, aos antibióticos β-lactâmicos (*pbp3*), pulvomicina (*EF-Tu*) e polimixinas (*pmrF*). Não foram detetados genes de resistência a detergentes (com identidade ≥60%). Relativamente aos fatores de virulência, foi identificado o fator de virulência *iroN* em 2 estirpes (F427 e F1617); nas restantes estirpes não foram identificados fatores de virulência com ≥90% de identidade.

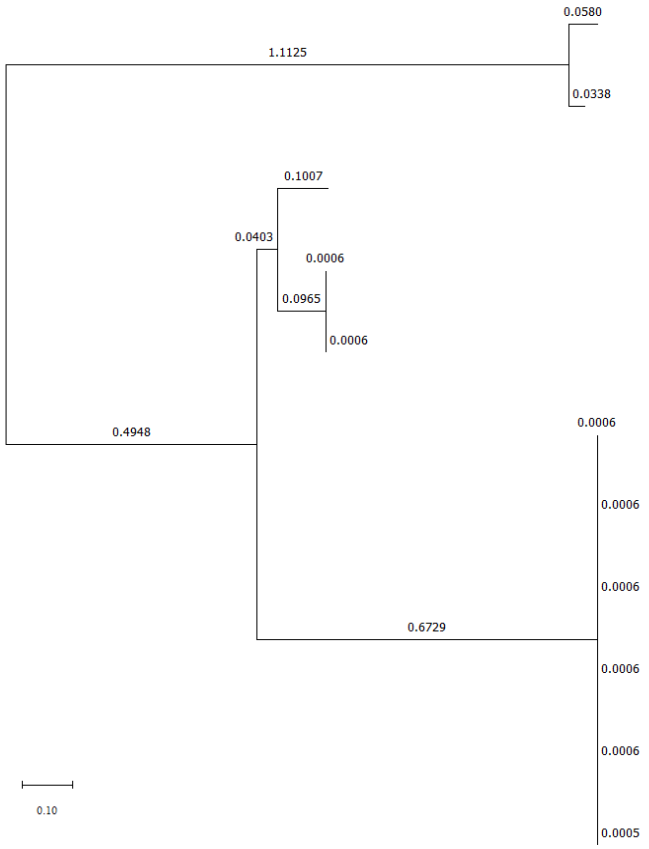
Foram identificados 3 plasmídeos diferentes: o plasmídeo IncFII(Yp), presente em 81,8% (9/11) das estirpes analisadas; e os plasmídeos Col(MG828) e Col(pHAD28), presentes apenas na estirpe F427. Na estirpe F1617 não foram detetados plasmídeos (≥95% de identidade). Relativamente ao pMLST (MLST plasmídico) foram identificados 3 STs diferentes do plasmídeo IncFII(Yp): ST Y10:A-:B- (66,7%); ST Y3:A-:B- (n=2, F480 e F544); e um novo ST (n=1, F515). A ferramenta pMLST 2.0 não permitiu a determinação do ST dos plasmídeos Col(MG828) e Col(pHAD28). Foram identificadas um total de 32 sequências de inserção distintas, dois MITEs (*Miniature Inverted-repeat Transposable Elements*: MITEEc1 e MITEYpe1), um transposão unitário (Tn1000) e um transposão composto (cn_11215_IS5) (Tabela III.6). O fago mais comum entre as 11 estirpes estudadas é o fago 500465-1 de *E. coli* que está presente em todas exceto uma (F1617). Outros fagos frequentes são: SUMU de *Haemophilus* (n=6), ESSI-2 de *Cronobacter* (n=6), SH2026Stx1 de *E. coli* (n=6) e o fago mEp237 de *Enterobacteriaceae* (n=5).

Em relação à probabilidade de serem patogénicas para o homem as estirpes apresentam probabilidades entre 74,8% (F1617) e 82,1% (F480).

6.2. Relação filogenética

A árvore filogenética das 11 estirpes estudadas por WGS foi construída com base nos SNPs (*Single Nucleotide Polimorphisms*) presentes nestas estirpes utilizando o software CSI Phylogeny 1.4 (Figura III.4), o qual permite inferir uma filogenia baseada no alinhamento concatenado de SNPs de alta qualidade. Como raiz da árvore foi utilizada a sequência de *E. cloacae* ASM77015v1 (NZ_CP009756.1), identificada como a sequência de referência no NCBI[4]. A árvore filogenética foi ajustada utilizando o software Figtree 1.4.4.

[4] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1219



Clade	Estirpe	Reservatório	ST	Perfil Fenotípico	Genes de Resistência: *bla*ACT	*oqxAB*	*bla*FRI-8	*bla*IMI-6	*ramA*	FV *iroN*	IncFII(Yp) pMLST
I	**F1617**	AS	1116	AMP, AMC, FOX	*bla*ACT-94						
	F427	AF	170	AMP, AMC, FOX	*bla*ACT-17						
	F515	AF	1728	AMP, AMC, FOX, COL	*bla*ACT-93						n.t.
II	**F480**	AF	1727	COL	*bla*ACT-92						Y3:A-:B-
	F544	AF	1727	AMP, AMC, ERT, MEM, IMP, COL							
III	**F1609**	AS	1688	AMP, AMC, FOX, ATM*, ERT, MEM*, IMP, COL	*bla*ACT-91						Y10:A-:B-
	F509	EF	1688								
	F325	L	1688								
	F487	AR	1688	AMP, AMC, FOX, ATM, ERT, MEM*, IMP, COL							
	F431	AR	1688								
	F271	AS	1688	AMP, AMC, FOX, ATM*, ERT, MEM*, IMP, COL							

Figura III.4. Árvore filogenética baseada em wgSNPs mostrando a relação entre os 11 genomas de *E. cloacae* complex obtidos por WGS. O genótipo apresentado foi obtido por análise bioinformática dos dados obtidos por WGS. As estirpes sublinhadas foram isoladas na colheita de Outono, enquanto as restantes foram isoladas no Verão. AS-Água de superfície da lagoa de estabilização, AF-Afluente da lagoa de estabilização, EF- Efluente de Lagoa de estabilização, AR- Água do rio, L- Lamas da lagoa de estabilização; R- Resistente, S- Suscetível; FV: Fator de Virulência; n.t. não-tipado (novo alelo). * Indica um fenótipo de suscetibilidade com aumento da exposição (I). A barra de escala indica a distância evolutiva determinada por 0,10 substituições por nucleotídeo nas posições variáveis.

As estirpes encontram-se agrupadas em três clades principais, designados por I, II e III (Figura III.4) e variam entre si entre 6 e 49517 SNPs (Tabela III.7).

Tabela III.7. Matriz de distâncias calculada utilizando os valores de SNPs.

	F1609	**F1617**	**F271**	**F325**	**F427**	**F431**	**F480**	**F487**	**F509**	**F515**	**F544**
F1609	0	49502	63	36	49382	55	32557	27	25	32677	32558
F1617	49502	0	49504	49508	5930	49502	49377	49517	49513	49460	49367
F271	63	49504	0	53	49380	62	32564	42	44	32694	32563
F325	36	49508	53	0	49386	39	32550	17	15	32670	32551
F427	49382	5930	49380	49386	0	49378	49193	49393	49391	49337	49183
F431	55	49502	62	39	49378	0	32556	32	34	32684	32557
F480	32557	49377	32564	32550	49193	32556	0	32549	32549	11738	64
F487	27	49517	42	17	49393	32	32549	0	6	32675	32550
F509	25	49513	44	15	49391	34	32549	6	0	32671	32550
F515	32677	49460	32694	32670	49337	32684	11738	32675	32671	0	11744
F544	32558	49367	32563	32551	49183	32557	64	32550	32550	11744	0

No clade I, estão agrupadas as estirpes F427 e F1617, apresentando, no entanto, uma diferença entre si de 5930 SNPs. As estirpes foram isoladas em reservatórios diferentes (afluente e água de superfície), partilham o mesmo fenótipo (resistência à ampicilina, amoxicilina+ácido clavulânico e cefoxitina), em ambas foi detetado o gene *oqxAB* e o fator de virulência *iroN;* o gene *ramA* está ausente nestas 2 estirpes, ao contrário do que acontece nas restantes estirpes dos clades II e III. No entanto, estas diferem no ST (ST170 na estirpe F427 e ST1116 na estirpe F1617) e na variante do gene bla_{ACT} ($bla_{\text{ACT-17}}$ na estirpe F427 e $bla_{\text{ACT-94}}$ na estirpe F1617), o que poderá justificar a diferença de SNPs entre estas.

No clade II, estão agrupadas as estirpes F480, F515 e F544, as quais foram isoladas do mesmo reservatório ambiental. No entanto, apresentam algumas diferenças, nomeadamente ao nível do perfil fenotípico, tendo em comum a resistência à colistina, e a presença dos genes *oqxAB* e *ramA*. As estirpes F480 e F544 (diferença de 64 SNPs entre si) apresentam o mesmo ST1727, variante do gene bla_{ACT} ($bla_{\text{ACT-92}}$) e plasmídeo IncFII(Yp) (Y3:A-:B-), apesar de o perfil fenotípico ser bastante diferente: a estirpe F480 apenas é resistente à colistina, enquanto a F544 é resistente às penicilinas (ampicilina e amoxicilina+ácido clavulânico) e aos carbapenemes (ertapeneme, meropeneme e imipeneme), justificado pela presença do gene $bla_{\text{IMI-6}}$. A *E. cloacae* F515 apresenta um ST (ST1728) e uma variante do gene bla_{ACT} ($bla_{\text{ACT-93}}$) únicos; partilha com a estirpe F544 a resistência às penicilinas, no entanto é a única estirpe presente no clade II que é resistente à cefoxitina. Apresenta uma diferença de 11744 SNPs relativamente à estirpe F544 e 11738 relativamente à estirpe F480.

No clade III, estão agrupadas as restantes estirpes (F1609, F509, F325, F487, F431, F271), as quais distam entre si entre 6 SNPs (estirpes F487 e F509) e 63 SNPs (estirpes F271 e F1609), indicando que estão mais próximas filogeneticamente. Apesar de estas estirpes terem sido isoladas em 4 reservatórios ambientais diferentes (água do rio, água de superfície, lamas e efluente de uma lagoa de estabilização) apresentam muitas semelhanças, nomeadamente, pertencem ao mesmo ST (ST1688), partilham a mesma variante do gene bla_{ACT} ($bla_{\text{ACT-91}}$), os genes $bla_{\text{FRI-8}}$, *oqxAB* e *ramA*, e o plasmídeo IncFII(Yp) Y10:A-:B. Em termos fenotípicos, estas estirpes apresentam todas o mesmo perfil: resistência às penicilinas (ampicilina e amoxicilina+ ácido

clavulânico), às cefalosporinas de 2ª geração (cefoxitina), aos carbapenemes (ertapeneme e imipeneme) e à colistina e de suscetibilidade com aumento da exposição ao meropeneme.

Em termos temporais, e considerando que os comprimentos dos ramos são estimativas do tempo evolutivo, primeiro ocorreu a divisão entre o clade I e os clades II e III. Em segundo lugar, ocorreu a divergência entre os clades II e III, seguindo-se as mutações que deram origem à separação entre a estirpe F515 e o subclade formado pelas estirpes F480 e F544 (clade II); depois, surgiram as mutações que levaram à divergência entre as estirpes do clade I (F427 e F1617). Em último, ocorreu a divergência das estirpes presentes no clade III (F1609, F509, F325, F487, F431, F271).

Foram encontradas estirpes pertencentes ao mesmo clade (e subclade) em reservatórios ambientais distintos: por exemplo, as estirpes F427 e F1617, a primeira isolada no afluente e a segunda na água de superfície, o que poderá indicar que estas estirpes transitam entre os vários reservatórios. Adicionalmente, estas 2 estirpes são provenientes de colheitas diferentes, ou seja, a estirpe F427 pertence à colheita de Verão, enquanto a estirpe F1617 pertence à colheita de Outono.

IV. Discussão

A resistência aos antibióticos é um problema emergente de Saúde Pública que tem vindo a ter um grande impacto nos sistemas de saúde, prevendo-se um agravamento devido à disseminação dos genes de resistência aos antibióticos (ARG) através de elementos genéticos móveis (EGM) e à falta de investimento na indústria farmacêutica para a descoberta de novos compostos (Chokshi *et al*.,2019; Stokes & Gillings, 2011).

O tema da resistência aos antibióticos tem sido descrito maioritariamente como associado ao ambiente hospitalar. No entanto, com o passar do tempo, tem-se verificado a existência de outros reservatórios (de ARG e/ou de bactérias portadoras desses genes) que têm vindo a ganhar alguma relevância, nomeadamente os animais, os solos, as águas e o ar (Chapin *et al*., 2005; Acar & Röstel, 2001). Vários estudos têm demonstrado que os ARG que atualmente são encontrados em estirpes clínicas humanas tiveram origem em estirpes ambientais. De facto, tem-se provado que a introdução e acumulação de antibióticos em reservatórios ambientais facilitou a mobilização de ARG: por exemplo, a carbapenemase OXA-48 teve origem no género *Shewanella*, que normalmente habita os ambientes aquáticos e que não é patogénica para o Homem (Pitout *et al*., 2019; Tafoukt *et al*., 2017).

O meio aquático tem sido descrito como um reservatório ambiental de ARG, tendo já sido identificadas bactérias portadoras destes genes em praticamente todos os ambientes aquáticos, tais como lagos, mares, águas balneares, águas residuais, rios, águas subterrâneas e até na água de consumo (Lupo *et al*., 2012). As estações de tratamentos de águas residuais (ETARs) têm uma particular importância na disseminação da resistência aos antibióticos pois permitem um contacto próximo entre bactérias provenientes de várias origens devido às diferentes naturezas das águas residuais recebidas (hospitalares, industriais, municipais, da pecuária), além do ambiente ser relativamente rico em nutrientes. Esta proximidade entre as bactérias, em associação com a presença de resíduos de antibióticos não metabolizados, funciona como um ambiente propício à transferência horizontal de ARG, veiculada por EGM, nomeadamente plasmídeos e transposões (Amador *et al*., 2014; Karkman *et al*., 2018).

Neste estudo, foi efetuada a identificação e posterior caracterização da suscetibilidade aos antibióticos, de estirpes isoladas de amostras de águas de diferentes reservatórios ambientais (afluente, água superficial, lamas e efluente de lagoa de estabilização; água subterrânea de um furo; água de canal de rega; água potável e água de rio) recolhidas numa estação experimental de produção agropecuária e agroalimentar. Devido ao seu interesse em termos de Saúde Pública e estando presentes em vários dos reservatórios ambientais estudados, foi dado ênfase às estirpes de *E. cloacae* complex.

As bactérias do género *Enterobacter* são bactérias de Gram negativo, anaeróbicas facultativas pertencendo à família *Enterobacteriaceae*. Fazem parte do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium, S. aureus, K. pneumoniae, Acinetobacter baumannii, P. aeruginosa, Enterobacter spp*.) o qual inclui as principais bactérias preocupantes em termos de virulência e de ARG, e que são frequentemente causa de infeções hospitalares (por exemplo, pneumonia, infeções do trato urinário e septicemia), principalmente em pacientes imunocomprometidos e internados em unidades de cuidados intensivos (Liu *et al*.,2021; Santajit & Indrawattana, 2016). O género *Enterobacter* encontra-se amplamente distribuído pela natureza, habitando os solos, águas, sendo

patogénicos de várias espécies de plantas, além de serem comensais ou patogénicos oportunistas do trato gastrointestinal Humano e Animal (Mezzatesta *et al.*, 2012; Regli *et al.*, 2019).

As espécies deste género são naturalmente resistentes às penicilinas e às cefalosporinas de primeira e segunda geração devido à presença de uma β-lactamase cromossómica do tipo AmpC, codificada pelo gene $bla_{ACT,}$ e que tem uma expressão indutível (Annavajhala *et al.*, 2019). No presente estudo, a estirpe *E. cloacae* F480, mostrou ser suscetível a todos os antibióticos β-lactâmicos testados. Por sequenciação nucleotídica de Sanger e por WGS, foi identificado o gene $bla_{ACT\text{-}92}$, e a ocorrência de mutações no gene *ampR*. O gene *ampR* codifica um regulador transcricional do tipo Lys-R que ativa a expressão da β-lactamase do tipo AmpC quando ocorrem alterações no peptidoglicano devido à presença de um antibiótico β-lactâmico. Em condições normais, o gene *ampR* inibe a transcrição da β-lactamase do tipo AmpC ligando-se ao precursor do peptidoglicano uridina difosfato-ácido N-acetilmurâmico (UDP-MurNAc) (Vadlamani *et al.*, 2015). Foi também detetada uma mutação G318D no gene $bla_{ACT\text{-}92}$, numa região altamente conservada em todas as β-lactamases de classe C (315LysThrGly317/318) e de extrema importância para a sua atividade catalítica; esta mutação poderá interferir na interação da proteína com o seu substrato (antibióticos β-lactâmicos), o que permitirá explicar o fenótipo observado (suscetibilidade a todos os antibióticos β-lactâmicos, nomeadamente à ampicilina e cefoxitina). A estirpe F544, apesar de apresentar a mesma variante do gene bla_{ACT} ($bla_{ACT\text{-}92}$) que a estirpe F480, apresenta uma suscetibilidade diminuída às penicilinas e carbapenemes, o que pode ser justificado pela presença da carbapenemase IMI-6.

Neste estudo a resistência às cefalosporinas de segunda geração (cefoxitina) está relacionada com a expressão da AmpC cromossómica. No entanto, em estirpes isoladas em águas, foram já identificadas β-lactamases de espetro alargado (ESBLs): num estudo realizado num lago do Bangladesh foram identificadas estirpes de *E. coli, E. cloacae* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs do tipo SHV ($bla_{SHV\text{-}2,}$ $bla_{SHV\text{-}12}$) e CTX-M ($bla_{CTX\text{-}M\text{-}15}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}27}$) (Haque *et al.*, 2014). Recentemente, num estudo efetuado com estirpes isoladas em águas residuais de matadouros de suínos e de aves, na Alemanha, foram identificadas 2 estirpes de *E. cloacae* complex produtoras de ESBLs, com resistência à piperacilina, cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima e cefotaxima) e ciprofloxacina, e suscetibilidade aos carbapenemes (meropeneme e imipeneme) e à colistina (Bachmann *et al.*, 2021). Num outro estudo, realizado nos EUA, foram isoladas 10 estirpes do género *Enterobacter* spp. em águas recreacionais costeiras: 80% das estirpes eram suscetíveis ao aztreoname contrariamente aos resultados obtidos no presente estudo, onde detetámos 13,8% (4/29) de resistência a este antibiótico. Quanto aos carbapenemes, 90% das estirpes mostraram ser suscetíveis, enquanto, no presente estudo, menos de 14% das estirpes eram suscetíveis (Belding & Boopathy., 2018).

A disseminação mundial de bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases, conferindo resistência aos carbapenemes, uma das classes de antibióticos utilizadas apenas para o tratamento de infeções causadas por bactérias multirresistentes, veio limitar as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento destas infeções (Duin & Doi, 2016). Assim, e considerando as implicações clínicas da utilização dos carbapenemes, foram também investigados neste estudo os mecanismos associados à resistência a estes antibióticos. Entre as principais carbapenemases destacam-se as de classe A (KPC, *K. pneumoniae* carbapenemase), as metalo-β-lactamases de classe B (VIM, *Verona integron-encoded metallo-β-lactamase*; IMP, *imipenamase*; NDM, *New Delhi metallo-β-lactamase*) e as de classe D (OXA-48-tipo, *oxacilinase*). Estas enzimas estão, muitas vezes, localizadas em MGEs (tais como, plasmídeos,

transposões e integrões), o que tem contribuído para a sua disseminação global (Queenan & Bush, 2007). Existem outras carbapenemases consideradas raras e que são subdiagnosticadas nos laboratórios clínicos, pois não se encontram implementadas nos testes de rotina, podendo constituir uma ameaça para a Saúde Pública (Bonnin *et al*., 2021; Taggar *et al*.,2020).

Os mecanismos mais comuns de resistência aos carbapenemes em *Enterobacter* spp. estão relacionados com: 1) sobreexpressão da AmpC cromossómica associada a alterações da permeabilidade da membrana externa (diminuição ou perda total da expressão de porinas); 2) aumento do efluxo, e 3) a produção de carbapenemases (Boyd *et al*., 2017). Em ambientes aquáticos, foram já identificados isolados de *E. cloacae* complex produtores de carbapenemases. Num estudo recente, realizado nas Filipinas, foram detetadas duas estirpes produtoras da carbapenemase NDM-1 e da ESBL CTX-M-15, no esgoto de um hospital e num rio (Suzuki *et al*., 2020). Em Portugal, a presença de *E. cloacae* complex ambientais produtores de carbapenemases é uma realidade. Num estudo realizado no rio Lis foram identificadas 3 estirpes de *Enterobacter* spp. produtoras de NDM-1, para além de 9 estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-3, e uma estirpe de *Citrobacter spp.* produtora de GES-5 (Teixeira *et al*., 2020). Nesse estudo, realizado na zona centro de Portugal, as estirpes de *Enterobacter* apresentavam uma suscetibilidade diminuída à ciprofloxacina, piperacilina-tazobactame, ceftazidima, cefotaxima, cefepima, e trimetoprim-sulfametoxazol, o que contrasta com a ausência de resistência a estes antibióticos encontrada no presente estudo. Comparando os dois estudos, verifica-se ainda uma baixa percentagem de resistência encontrada ao aztreoname (33% nas estirpes isoladas do rio Lis e 13,8% no presente estudo) (Teixeira *et al*., 2020).

Em relação aos carbapenemes, 86,2% (25/29) das estirpes aqui estudadas apresentam um fenótipo de resistência ao ertapeneme, 3,4% ao meropeneme (1/29) e 86,2% (25/29) ao imipeneme. Por caracterização genotípica, usando o método de PCR, na qual foram pesquisados apenas os genes de resistência aos carbapenemes mais comuns, não foi identificada nenhuma carbapenemase que justificasse o fenótipo encontrado. No entanto, por WGS, realizada para 11 isolados (63,6% resistentes ao ertapeneme, 9,1 % ao meropeneme e 63,6 % ao imipeneme), detetou-se a presença do gene $bla_{\text{FRI-8}}$, que codifica a carbapenemase FRI (*French imipenamase*), de classe A, a qual hidrolisa as penicilinas, o aztreoname e os carbapenemes, mas não hidrolisa as cefalosporinas de espetro alargado (cefotaxima, ceftazidima e cefepima). Esta família de carbapenemases foi identificada pela primeira vez em 2015, num paciente internado num hospital em França, com antecedente de viagem pela Suíça (Dortet *et al*., 2015). Até à data, foram já descritas 9 variantes do gene bla_{FRI} em 3 continentes, sugerindo uma distribuição global ($bla_{\text{FRI-1}}$ em França, $bla_{\text{FRI-2}}$ no Reino Unido, $bla_{\text{FRI-3}}$ na Alemanha, $bla_{\text{FRI-4,5,7,8,9}}$ no Japão e $bla_{\text{FRI-6}}$ no Canadá), sendo praticamente todas estas variantes isoladas em meio hospitalar (Dortet *et al*., 2015; Meunier *et al*., 2017; Schauer *et al*., 2019; Kubota *et al*., 2018; Uwamino *et al*., 2019; Boyd *et al*., 2019; Bonnin *et al*., 2021). As carbapenemases da família FRI, ao contrário do que acontece nas outras carbapenemases, hidrolisam mais eficazmente o imipeneme do que meropeneme (Dortet *et al*., 2015), o que está de acordo com o encontrado no presente estudo e que poderá justificar o resultado negativo no teste para deteção de carbapenemases de classe A nas estirpes em que foi detetado este gene. A variante FRI-8 foi identificada, no Lago Biwa, Japão, em três isolados resistentes aos carbapenemes pertencentes a espécies diferentes, *Enterobacter asburiae* (ST1585), *Enterobacter quasiroggenkampii* (ST929) e *Enterobacter genomospecies 8* (ST930), apenas a primeira espécie pertencente ao *E. cloacae* complex (Gomi *et al*., 2021). Os resultados obtidos estão em concordância com os do presente estudo, pois todas as estirpes portadoras do

gene *bla*$_{FRI-8}$ mostraram ser não suscetíveis ao imipeneme. O presente estudo representa a primeira vez que uma carbapenemase da família FRI é identificada em Portugal.

Neste estudo, foi ainda identificada a presença de uma outra carbapenemase de classe A, da família IMI, codificada pelo gene *bla*$_{IMI-6}$, no isolado de *E. cloacae* F544 resistente aos três carbapenemes testados. As carbapenemases do tipo IMI/NMC-A (*Imipenem-hydrolysing β-lactamase/Non-metallo-carbapenemase A*) foram identificadas pela primeira vez no género *Enterobacter*, nos EUA, em 1996, em amostras de pacientes hospitalizados (Rasmussen *et al*., 1996). Desde essa data, foram identificadas pelo menos 20 variantes do gene *bla*$_{IMI}$, com distribuição global (Naas *et al*., 2016; Laurens *et al*., 2018). Estas carbapenemases têm uma menor prevalência, quando comparadas com as de outras famílias como KPC, IMP, VIM ou NDM, no entanto, são comuns em *Enterobacter*. Foram também já identificadas em outras espécies como *Klebsiella variicola* e *E. coli*, e têm uma localização predominantemente plasmídica, ainda que já tenham sido encontradas variantes cromossómicas (Laurens *et al*., 2018). Foram já identificadas em ambiente aquático, como se constata, num estudo realizado no rio Llobregat, em Espanha, onde foi isolada uma estirpe de *E. cloacae* (ST822) produtora da β-lactamase IMI-2 (Carrasco *et al*., 2017). Apesar de algumas variantes do gene *bla*$_{IMI}$ terem sido identificadas em isolados de rios, a variante *bla*$_{IMI-6}$ já foi identificada numa estirpe de *E. cloacae* resistente aos carbapenemes, isolada de um paciente hospitalizado no Canadá, o que pode indicar que as estirpes portadoras deste gene poderão ser patogénicas para o homem (Boyd et al., 2017).

De acordo com o descrito na literatura, os genes *bla*$_{FRI-8}$ e *bla*$_{IMI-6}$ estão frequentemente localizados num plasmídeo do tipo IncFII(Yp), um tipo de plasmídeos que está descrito associado à disseminação da carbapenemase NDM em *K. pneumoniae* ST395 no Vietname, e nos ST2017 e ST323 na África do Sul (Pedersen *et al*., 2018; Hirabayashi *et al*., 2021; Gomi *et al*., 2021). Neste estudo, não foi avaliada a localização (cromossómica/plasmídica) destes dois genes, ficando a indicação para uma perspetiva futura.

A colistina apesar de ter deixado de ser usada nos anos 70 devido aos efeitos secundários nefrotóxicos, ressurgiu nos anos 90 como uma das únicas opções no tratamento de infeções causadas por bactérias de Gram negativo multirresistentes produtoras de carbapenemases (*P. aeruginosa, A. baumannii, K. pneumoniae, E. coli* entre outros membros da família *Enterobacteriaceae*). No entanto, o uso excessivo e inadequado deste antibiótico na medicina humana e na pecuária levou à disseminação de bactérias resistentes a este antibiótico (Ahmed *et al*.,2020; Hamel *et al*.,2021).

Neste estudo, 93,1% (27/29) das estirpes apresentaram resistência à colistina (das quais apenas 59,3% foram isoladas de meio de cultura suplementado com colistina). No entanto, quer a amplificação por PCR quer o WGS, não detetou qualquer gene plasmídico de resistência à colistina (PMCR). Os PMCR, especificamente a variante *mcr-1*, foram já identificados numa estirpe de *E. coli* que foi isolada num lago na Suíça (Zurfuh *et al*., 2016). O gene *mcr-10* também foi identificado numa estirpe ambiental de *Enterobacter kobei* isolada num rio que recebe efluentes de uma estação de tratamento de águas residuais na África do Sul (Mbanga *et al*., 2021).

No entanto, neste estudo, foi identificado o gene *ramA*-tipo, por WGS, o qual tem vindo a ser relacionado com a resistência à colistina em *K. pneumoniae*. Este gene é um regulador global da transcrição, regulando cerca de 68 genes associados a várias funções celulares. A sua sobreexpressão resulta num aumento da resistência à colistina e a outras classes de antibióticos (tetraciclinas, β-lactâmicos, quinolonas, fenicóis) devido à modulação de genes que codificam

bombas de efluxo como *acrAB, oqxAB* e *yrbF* e também à diminuição da expressão de porinas membranares como a OmpF, o que causa um aumento da impermeabilidade e contribui para um fenótipo de multirresistência. Este gene é também responsável pela ativação de genes relacionados com a biossíntese do lípido A como o *lpxC, lpxL-2* and *lpxO* resultando em modificações da porção lípido A do LPS. Já foram detetados homólogos deste gene em outras espécies como *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp. e *Enterobacter* spp. (Chollet *et al*., 2004; Ahmed *et al*., 2020; Majumdar *et al*., 2015; Aghapour *et al*., 2019). Por outro lado, a expressão do *ramA* é regulada por um mecanismo de feedback negativo pelo gene *ramR*, assim, a sua sobreexpressão pode dever-se à ocorrência de mutações no seu repressor levando à sua inativação (Ferrand *et al*., 2020). Este gene apenas estava presente nas estirpes que apresentavam resistência à colistina, sendo uma indicação de que poderá também estar relacionado com a resistência à colistina nestas estirpes de *E. cloacae* complex. Como perspetivas futuras, sugere-se o estudo do papel deste gene na resistência cromossómica à colistina.

A análise bioinformática permitiu ainda identificar o gene *fosA2*-tipo, o qual codifica uma glutationa-S-transferase implicada na diminuição da suscetibilidade à fosfomicina, em 90,9% (10/11) das amostras para as quais foi realizado o WGS. Assim, no futuro, sugere-se determinar a concentração inibitória mínima para a fosfomicina nestas estirpes. Este gene já foi identificado em outras estirpes ambientais, nomeadamente numa estirpe de *E. cloacae* isolada no rio Salmon no Canadá, com uma localização cromossómica; de facto, estes genes encontram-se bastante disseminados em bactérias de Gram negativo, estando presentes no cromossoma da maioria das espécies (Xu *et al*., 2011; Ito *et al*., 2017). Foram também detetados vários genes que codificam bombas de efluxo como *adeF, baeR, CRP, emrB, emrR, H-NS, KpnE, KpnF, KpnH, marA, marR, mdf(A), msbA, oqxAB* e *rsmA*, pertencentes às famílias RND, MFS, ABC que contribuem para uma diminuição da suscetibilidade a algumas classes de antibióticos, tais como fluoroquinolonas, macrólidos, aminoglicosídeos, tetraciclinas, fenicóis, entre outros. A maioria destas bombas de efluxo também foram identificadas em estirpes de *E. cloacae* complex isoladas no rio Alexander em Israel (Cohen *et al*., 2020).

O único fator de virulência detetado neste estudo foi o *iroN*, o qual codifica um recetor da membrana externa que está envolvido no transporte de sideróforos, que são compostos quelantes de ferro responsáveis pela captura dos iões ferro presentes no meio. Este fator de virulência está presente principalmente em *S. enterica* e em estirpes de *E. coli* que são uropatogénicas (Hantke *et al*., 2003).

A sequenciação total do genoma revelou-se uma ferramenta bastante útil para a análise dos genes de resistência presentes nas diferentes estirpes, no entanto, os resultados estão condicionados pelas bases de dados que utilizamos. Neste caso, para a deteção dos genes de resistência, foram utilizadas 2 bases de dados: o Resfinder, uma ferramenta indicada para a deteção de genes de resistência adquiridos, e o CARD, uma base de dados mais ampla que inclui também genes de resistência cromossómica. Por exemplo, a carbapenemase FRI-8 foi identificada pelo CARD com uma identidade de 100%, enquanto, o Resfinder a indicou como uma variante FRI-5 com uma identidade de 88,94%. Neste caso, o CARD estava já atualizado para esta variante e o ResFinder não. Assim, deverá sempre ser utilizada mais do que uma base de dados por forma a comparar e avaliar os resultados.

O estudo da diversidade genética de todas as estirpes de *E. cloacae* complex, após análise de 7 *housekepping genes*, utilizando o método de MLST, permitiu identificar 5 STs diferentes. O ST1688 foi o predominante, estando presente em 83% das estirpes (24/29) e em 4 dos 5

reservatórios ambientais estudados. Este ST foi já identificado num individuo com uma infeção dos tecidos moles, na China, inferindo que os isolados pertencentes a este ST poderão ser patogénicos para o homem (PubMLST, isolado YG_304 id:297). O ST1116, também identificado neste estudo, foi previamente isolado nos EUA, no âmbito de um projeto de metagenómica (NCBI DHYH00000000, Parks et al., 2017) numa amostra de madeira, indicando uma origem ambiental. *E. cloacae* com o ST 170, que estava presente no afluente da lagoa de estabilização, foi também isolado num indivíduo nos EUA, o que demonstra a possibilidade de as estirpes pertencentes a este ST poderem colonizar o homem (NCBI PSQT00000000). Os ST1727 e ST1728 de *E. cloacae* foram descritos pela primeira vez neste estudo.

A árvore filogenética das 11 estirpes para as quais foi realizada WGS permitiu agrupar as estirpes em 3 clades, que variam entre si entre 6 e 49517 SNPs, corroborando os resultados obtidos por MLST. Foram detetadas estirpes pertencentes ao mesmo clade (e subclade) em reservatórios ambientais distintos, o que demonstra que as estirpes dispersaram entre os diferentes reservatórios ambientais. Esta disseminação poderá favorecer o contacto com uma maior diversidade de bactérias presentes nos vários reservatórios, aumentando a possibilidade de ocorrer transferência genética horizontal de genes de resistência aos antibióticos, o que irá contribuir para a evolução do mobiloma e resistoma nestes reservatórios ambientais.

As estirpes de *E. cloacae* complex analisadas neste estudo foram isoladas de amostras colhidas em estações do ano diferentes (n=27 no Verão, n=2, no Outono), sugerindo uma tendência de sazonalidade destas espécies. De facto, a *E. cloacae* F1609 ST1688, isolada na colheita de Outono, na água de superfície da lagoa de estabilização, está filogeneticamente relacionada com a *E. cloacae* F271 ST1688, identificada na colheita de Verão, no mesmo reservatório, indicando que este clone está presente neste reservatório em diferentes épocas sazonais.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o sistema que está implementado para o tratamento das águas, nomeadamente a lagoa de estabilização, não é completamente eficaz, pois houve apenas uma redução de 11,8 % no número de estirpes bacterianas isoladas no efluente da lagoa de estabilização (água que sai da lagoa), comparativamente ao afluente de lagoa de estabilização (água que entra na lagoa). Por outro lado, o sistema que está implementado para o tratamento da água para consumo humano mostrou ser totalmente eficaz, pois não foram isoladas estirpes bacterianas na água da torneira.

V. Conclusão

Neste estudo avaliou-se a suscetibilidade aos antibióticos em 29 estirpes pertencentes ao *E. cloacae* complex que foram isoladas em 5 reservatórios ambientais aquáticos (afluente, água superficial, lamas e efluente de lagoa de estabilização; e água de rio). Foi detetada uma diminuição da suscetibilidade aos carbapenemes, sendo que 86% das estirpes eram resistentes a pelo menos um dos carbapenemes estudados. Em 54,5% (6/11) das estirpes estudadas por WGS, este fenótipo está associado à produção de uma carbapenemase de classe A da família FRI (codificada pelo gene $bla_{\text{FRI-8}}$); em outra estirpe, a resistência aos carbapenemes foi justificada pela produção da carbapenemase de classe A, IMI (codificada pelo $bla_{\text{IMI-6}}$). Este estudo traduz a primeira identificação destas 2 famílias de carbapenemases em Portugal. Foram ainda identificadas 4 novas variantes da β-lactamase de classe C da família ACT (codificadas pelos $bla_{\text{ACT-91}}$, $bla_{\text{ACT-92}}$, $bla_{\text{ACT-93}}$, $bla_{\text{ACT-94}}$).

Mais de 90% das estirpes apresentavam resistência à colistina, um antibiótico de último recurso no tratamento de infeções causadas por bactérias multirresistentes de Gram negativo. Não foi possível identificar exatamente qual o mecanismo de resistência que causa este fenótipo, mas possivelmente estará relacionado com o gene *ramA* que já foi associado à resistência à colistina em outras espécies.

Os reservatórios ambientais têm vindo a ser muito pouco considerados, pois pensava-se que os genes de resistência apenas estavam presentes na clínica humana. No entanto, veio a comprovar-se que muitos dos genes de resistência com grande importância em termos de Saúde Pública tiveram a sua origem em estirpes ambientais. De facto, estes reservatórios têm um papel fulcral na disseminação de genes de resistência aos antibióticos. De salientar, que foi encontrado o mesmo ST1688 (incluindo 6 estirpes geneticamente relacionadas) em 4 dos 5 reservatórios aquáticos avaliados neste estudo, demostrando que as bactérias circulam entre reservatórios, favorecendo o contacto entre uma grande diversidade de bactérias e a consequente transferência dos genes de resistência presentes em elementos genéticos móveis.

As águas constituem um reservatório de genes de resistência aos antibióticos, cuja pressão de seleção será muitas vezes causada por resíduos de antibióticos, utilizados em várias áreas, tais como a indústria farmacêutica, pecuária, Saúde Humana, que acabam por ser excretados não metabolizados e libertados para os esgotos tendo como seu destino final os recursos hídricos. Assim, será necessária uma diminuição do consumo de antibióticos, dado que muitas vezes estes são utilizados em excesso e de forma inapropriada, além de ser necessário o tratamento dos efluentes por forma a remover os resíduos de antibióticos para que estes não terminem no ambiente. Existem muitos genes de resistência em estirpes ambientais que ainda não são conhecidos, portanto deve ser implementada uma estratégia de monitorização e vigilância que permita a deteção dos genes de resistência atempadamente, antes que estes sejam transferidos para estirpes com interesse clínico.

Neste trabalho foi possível o estudo de vários mecanismos de resistência. Todos os objetivos propostos foram cumpridos. No entanto, devido à grande vastidão de genes de resistência existentes não foi possível estudar em detalhe todos os mecanismos envolvidos. Como perspetivas futuras sugere-se a realização de estudos semelhantes para identificar quais os genes de resistência presentes em reservatórios ambientais de outras regiões de Portugal, mas também verificar se os genes de resistência encontrados neste estudo terão uma disseminação alargada ou se estão

circunscritos a esta zona. Poderá também ser realizado um estudo em explorações pecuárias e cuidados de saúde da região com o objetivo de determinar se os genes identificados neste estudo estarão apenas presentes no ambiente ou também nas pessoas e nos animais, alargando a estratégia *One Health*.

VI. Referências

Aarestrup, F. (2005) Veterinary Drug Usage and Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **96**: 271-281.

Abusaiba, T., and Al-Harmoosh, R. (2020) Mechanisms of Antibiotics Resistance in Bacteria. *Sys Rev Pharm* **11**: 817-823.

Acar, J., and Moulin, G. (2012) Antimicrobial resistance: a complex issue. *Rev Sci Tech* **31**: 23-31.

Acar, J., and Röstel, B. (2001) Antimicrobial resistance: an overview. *Rev Sci Tech* **20**: 797-810.

Adedeji, A. (2016) The treasure called antibiotics. *Ann Ib Postgrad Med* **14**: 56-57.

Aghapour, Z., Gholizadeh, P., Ganbarov, K., bialvaei, A., Mahmood, S., Tanomand, A., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., Yousefi, B., and Kafil, H. (2019) Molecular mechanisms related to colistin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Infect Drug Resist* **12**: 965-975.

Ahmed, M., Zhong, L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., and Tian, G. (2020) Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerg Microbes Infect* **9**: 868-885.

Akiyama, T., Hayakawa, K., Ohmagari, N., Shimojima, M., and Kirikae, T. (2013) Multilocus Sequence Typing (MLST) for Characterization of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One* **8**: 1-10.

Alanis, A. (2005) Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era?. *Arch Med Res* **36**: 697-705.

Allen, H., Donato, J., Wang, H., Hansen, K., Davies, J., and Handelsman, J. (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* **8**: 251-259.

Amador, P., Fernandes, R., Prudêncio, M., Barreto, M., and Duarte, I. (2014) Antibiotic resistance in wastewater: Occurrence and fate of *Enterobacteriaceae* producers of Class A and Class C β-lactamases. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* **50**: 26-39.

Aminov, R. (2010) A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol* **1:** 1–7.

Annavajhala, M., Gomez-Simmonds, A., and Uhlemann, A. (2019) Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* Complex Emerging as a Global, Diversifying Threat. *Front Microbiol* **10**: 1-8.

Arenz, S., and Wilson, D. (2016) Bacterial Protein Synthesis as a Target for Antibiotic Inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**: 1-14.

Arnold, T., Forrest, G., and Messmer, K. (2007) Polymyxin antibiotics for Gram-negative infections. *Am J Health Syst Pharm* **64**: 819-826.

Aslam, B., Wang, W., Arshad, M., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M., Nisar, M., Alvi, R., Aslam, M., Qamar, M., Salamat, M., and Baloch, Z. (2018) Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist* **11**: 1645-1658.

Babakhani, S., and Oloomi, M. (2018) Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J Basic Microbiol* **58**: 905-917.

Babic, M., Hujer, A., and Bonomo, R. (2006) What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat* **9**: 142-156.

Bachmann, T., Heiden, S., Lübcke, P., Bachmann, L., Bohnert, J., Zimmermann, D., and Schaufler, K. (2021) Antibiotic-Resistant *Enterobacteriaceae* in Wastewater of Abattoirs. *Antibiotics* **10**: 1-16.

Bahrami, F., Morris, D., and Pourgholami, M. (2012) Tetracyclines: Drugs with Huge Therapeutic Potential. *Mini Rev Med Chem* **12**: 44-52.

Bakheet, T., and Doig, A. (2010) Properties and identification of antibiotic drug targets. *BMC Bioinform* **11**: 1-10.

Balsalobre, L., Blanco, A., and Alarcón, T. (2019) Beta-Lactams (Chapter 3) *In* Antibiotic drug resistance, Eds. Martínez, José., and Alarcón, T.; John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 9781119282549.

Baltz, R. (2009) Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering. *Curr Opin Chem Biol* **13**: 144-151.

Baltz, R., Miao, V., and Wrigley, S. (2005) Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics. *Nat Prod Rep* **22**: 717-741.

Bambeke, F., Laethem, Y., Courvalin, P., and Tulkens, P. (2004) Glycopeptide Antibiotics. *Drugs* **64**: 913-936.

Bambeke, F., Michot, J., Van Eldere, J., and Tulkens, P. (2005) Quinolones in 2005: an update. *Clin Microbiol Infect* **11**: 256-280.

Barbachyn, M., and Ford, C. (2003) Oxazolidinone Structure–Activity Relationships Leading to Linezolid. *Angew Chem Int Ed* **42**: 2010-2023.

Baron, S., Hadjadj, L., Rolain, J., and Olaitan, A. (2016) Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Agents* **48**: 583-591.

Bearden, D., and Danziger, L. (2001) Mechanism of Action and Resistance to Quinolones. *Pharmacotherapy* **21**: 224-232.

Belding, C., and Boopathy, R. (2018) Presence of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in coastal recreational waters of southeast Louisiana, USA. *J Water Supply: Res Technol - AQUA* **67**: 800-809.

Bennett, J., and Chung, K. (2001) Alexander Fleming and the discovery of penicillin. *Adv Appl Microbiol* **49**: 163-184.

Bennett, P. (2008) Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* **153**: 347-357.

Bérdy, J. (2012) Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiot* **65**: 385-395.

Berendonk, T., Manaia, C., Merlin, C., Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., and Martinez, J. (2015) Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol* **13**: 310-317.

Bermingham, A., and Derrick, J. (2002) The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery. *BioEssays* **24**: 637-648.

Binda, E., Marinelli, F., and Marcone, G. (2014) Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. *Antibiotics* **3**: 572-594.

Bionda, N., Pitteloud, J., and Cudic, P. (2013) Cyclic lipodepsipeptides: a new class of antibacterial agents in the battle against resistant bacteria. *Future Med Chem* **5**: 1311-1330.

Blair, J., Richmond, G., and Piddock, L. (2014 (B)) Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol* **9**: 1165-1177.

Blair, J., Webber, M., Baylay, A., Ogbolu, David., and Piddock, L. (2014 (A)) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* **13**: 42–51.

BLAST®, Basic Local Alignment Search Tool, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ (Consultado a 20/05/2021).

Bogaard, A., and Stobberingh, E. (2000) Epidemiology of resistance to antibiotics-Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents* **14**: 327-335.

Bonnedahl, J., and Järhult, J. (2014) Antibiotic resistance in wild birds. *Ups J Med Sci* **119**: 113-116.

Bonnin, R., Jousset, A., Emeraud, C., Oueslati, S., Dortet, L., and Naas, T. (2021) Genetic Diversity, Biochemical Properties, and Detection Methods of Minor Carbapenemases in Enterobacterales. *Front Med* **7**: 1-20.

Boyd, D., Lefebvre, B., Mataseje, L., Gagnon, S., Roger, M., Savard, P., Longtin, J., and Mulvey, M. (2019) *Enterobacter* sp. N18-03635 harbouring $bla_{\text{FRI-6}}$ class A carbapenemase, Canada. J Antimicrob Chemother **75**: 486-488.

Boyd, D., Mataseje, L., Davidson, R., Delport, J., Fuller, J., Hoang, L., Lefebvre, B., Levett, P., Roscoe, D., Willey, B., and Mulvey, M. (2017) *Enterobacter cloacae* Complex Isolates Harboring $bla_{\text{NMC-A}}$ or $bla_{\text{IMI-Type}}$ Class A Carbapenemase Genes on Novel Chromosomal Integrative Elements and Plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* **61**: 1-12.

Bozdogan, B., and Appelbaum, P. (2004) Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. Int J Antimicrob Agents **23**: 113-119.

Bush, K., and Jacoby, G. (2009) Updated Functional Classification of β-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 969-976.

Butler, M., Hansford, K., Blaskovich, M., Halai, R., and Cooper, M. (2014) Glycopeptide antibiotics: Back to the future. *J Antibiot* **67**: 631-644.

Byarugaba, D. (2009) Mechanisms of Antimicrobial Resistance (Chapter 2) *In* Antimicrobial Resistance in Developing Countries, Eds. Sosa, A., Byarugaba, D., Cuevas, C., Hsueh, P., Kariuki, S., and Okeke, I.; Springer New York. ISBN: 978-0-387-89370-9.

Caniça, M., Manageiro, V., Abriouel, H., Moran-Gilad, J., and Franz, C. (2019) Antibiotic resistance in foodborne bacteria. *Trends Food Sci Technol* **84**: 41-44.

Caniça, M., Manageiro, V., Dias, D., Clemente, L., Neves, E., Poeta, P., Dias, E., and Ferreira, E. (2015) Current perspectives on the dynamics of antibiotic resistance in different reservoirs. *Res Microbiol* **166**: 594-600.

Carr, V., Shkoporov, A., Hill, C., Mullany, P., and Moyes, D. (2021) Probing the Mobilome: Discoveries in the Dynamic Microbiome. *Trends Microbiol* **29**: 158-170.

Carrasco, N., Fàbrega, A., Calero-Cáceres, W., Sánchez, T., Jaque, M., Cros, A., Muniesa, M., and López, J. (2017) Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* recovered from a Spanish river ecosystem. PLoS One **12**: 1-11.

Cars, O., and Nordberg, P. (2005) Antibiotic resistance – The faceless threat. *Int J Risk Saf Med* **17**: 103-110.

Cars, O., Hogberg, L., Murray, M., Nordberg, O., Sivaraman, S., Lundborg, C., So, A., and Tomson, G. (2008) Meeting the challenge of antibiotic resistance. *BMJ* **337**: 1-3.

Castillo, J. (2013) Tetracyclines (Chapter 15) *In* Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, Eds. Giguère, S., Prescott, J., and Dowling, P.; John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 9781118675014.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2018) One Health Basics, www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html (Consultado a 23/04/2021).

Center for Genomic Epidemiology, http://genomicepidemiology.org/services/ (Consultado a 9/10/2021).

Chapin, A., Rule, A., Gibson, K., Buckley, T., and Schwab, K. (2005) Airborne Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from a Concentrated Swine Feeding Operation. *Environ Health Perspect* **113**: 137-142.

Cheng, G., Hao, H., Dai, M., Liu, Z., and Yuan, Z. (2013) Antibacterial action of quinolones: From target to network. *Eur J Med Chem* **66**: 555-562.

Chitsaz, M., and Brown, M. (2017) The role played by drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance. *Essays Biochem* **61**: 127-139.

Chokshi, A., Sifri, Z., Cennimo, D., and Horng, H. (2019) Global contributors to antibiotic resistance. *J Glob Infect Dis* **11**: 36-42.

Chollet, R., Chevalier, J., Bollet, C., Pages, J., and Regli, A. (2004) RamA Is an Alternate Activator of the Multidrug Resistance Cascade in *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2518-2523.

Chopra, I., and Roberts, M. (2001) Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 232-260.

Christaki, E., Marcou, M., and Tofarides, A. (2019) Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol* **88**: 26-40.

Clinical and Laboratory Standards Instituite (CLSI). M100-Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 31st Edition, 2021, https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/ (Consultado a 15/04/2021).

Clinical and Laboratory Standards Instituite (CLSI). Vet08-Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 4th Edition ,2018; https://clsi.org/media/2321/vet08ed4_sample.pdf (Consultado a 15/04/2021).

Cohen, R., Paikin, S., Rokney, A., Blum, M., and Astrahan, P. (2020) Multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in coastal water: an emerging threat. *Antimicrob Resist Infect Control* **9**: 1-9.

Collignon, P. (2015) Antibiotic resistance: are we all doomed?. *Intern Med J* **45**: 1109-1115.

Collignon, P. and McEwen, S. (2019) One Health—Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Trop Med Infect Dis* **4**: 1-21.

Connell, S., Tracz, D., Nierhaus, K., and Taylor, D. (2003) Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3675-3681.

Daghrir, R., and Drogui, P. (2013) Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environ Chem Lett* **11**: 209-227.

Davies, J. (2006) Where Have all the Antibiotics Gone?. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **17**: 287-290.

Delcour, A. (2009) Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta-Proteins and Proteomics* **1794**: 808-816.

Demain, A., and Elander, R. (1999) The β-lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie van Leeuwenhoek* **75**: 5-19.

Deng, Y., Zhang, X., and Zhang, X. (2017) Recent advances in genetic modification systems for Actinobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**: 2217-2226.

Denyer, S., and Maillard, J. (2002) Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol* **92**: 35-45.

Diekema, D., and Jones, R. (2001) Oxazolidinone antibiotics. *Lancet* **358**: 1975-1982.

Dodd, M. (2012) Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. *J Environ Monit* **14**: 1754-1772.

Doorslaer, X., Dewulf, J., Langenhove, H., and Demeestere, K. (2014) Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. *Sci Total Environ* **500**: 250-269

Dorn, J., Alpern, M., McNulty, C., and Volcheck, G. (2018) Sulfonamide Drug Allergy. *Curr Allergy Asthma Rep* **18**: 1-10

Dortet, L., Poirel, L., Abbas, S., Oueslati, S., and Nordmann, P. (2015) Genetic and Biochemical Characterization of FRI-1, a Carbapenem-Hydrolyzing Class A β-Lactamase from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 7420-7425.

Dowling, A., O'Dwyer, J., and Adley, C. (2017) Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance *In* Antimicrobial Research: Novel bioknowledge and educational programs Ed. Vilas, A.; *Formatex Research Center*. ISBN: 9788494751202

Drlica, K., Hiasa, H., Kerns, R., Malik, M., Mustaev, A., and Zhao, X. (2009) Quinolones: Action and Resistance Updated. *Curr Top Med Chem* **9**: 981-998.

Duin, D., and Doi, Y. (2016) The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence* **8**: 460-469.

Emami, S., Shafiee, A., and Foroumadi, A. (2005) Quinolones: Recent Structural and Clinical Developments. *Iran J Pharm Res* **4**: 123-136.

Emmerson, A., and Jones, A. (2003) The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother* **51**: 13-20.

English, B., and Gaur, A. (2009) The Use and Abuse of Antibiotics and the Development of Antibiotic Resistance. *Adv Exp Med Biol* **659**: 73-82.

Enterobacter cloacae MLST Databases, https://pubmlst.org/organisms/enterobacter-cloacae (Consultado a 15/10/2021).

Epaulard, O., and Brion, J. (2010) Fenicoles (cloranfenicol y tianfenicol). *EMC Medicina* **14**: 1-6.

Etebu, E., and Arikekpar, I. (2016) Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int J Appl Microbiol Biotechnol Res* **4**: 90-101.

Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., and Vila, J. (2008) Mechanism of action of and resistance to quinolones. Microb Biotechnol **2**: 40-61.

Fair, R., and Tor, Y. (2014) Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect Medicin Chem* **6**: 25-64.

Falagas, M., Rafailidis, P., and Matthaiou, D. (2010) Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat* **13**: 132-138.

Ferrand, A., Vergalli, J., Pagès, J., and Regli, A. (2020) An Intertwined Network of Regulation Controls Membrane Permeability Including Drug Influx and Efflux in Enterobacteriaceae. *Microorganisms* **8**: 833-850.

FigTree, http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/ (Consultado a 15/11/2021).

Fosso, M., Li, Y., and Tsodikova, S. (2014) New trends in the use of aminoglycosides. *MedChemComm* **5**: 1075-1091.

Frieri, M., Kumar, K., and Boutin, A. (2017) Antibiotic resistance. *J Infect Public Health* **10**: 369-378.

Frost, L., Leplae, R., Summers, A., and Toussaint, A. (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**: 722-732.

García, Y., Herrera, C., and Rojas, J. (2007) Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. *Rev Mex Cienc Farm* **38**: 58-69.

Garzón, D., Mavingui, P., Boetsch, G., Boissier, J., Darriet, F., Duboz, P., Fritsch, C., Giraudoux, P., Le Roux, F., Morand, S., Paillard, C., Pontier, D., Sueur, C., and Voituron, Y. (2018) The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. *Front Vet Sci* **5:** 1-13.

Gaynor, M., and Mankin, A. (2003) Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance. *Curr Top Med Chem* **3**: 949-960.

GE Healthcare Life Sciences, https://www.lobov.com.ar/downloads/illustra-ExoProStar-DataFile.PDF (Consultado a 6/04/2021).

Gogry, F., Siddiqui, M., Sultan, I., and Haq, Q. (2021). Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. *Front Med* **8**: 1-19.

Gomi, R., Matsumura, Y., Tanaka, M., Ihara, M., Sugie, Y., Matsuda, T., and Yamamoto, M. (2021) Emergence of rare carbapenemases (FRI, GES-5, IMI, SFC, and SFH-1) in *Enterobacterales* isolated from surface waters in Japan (Pre-Print).

Gross, M. (2013) Antibiotics in crisis. *Curr Biol* **23**: 1063-1065.

Guimarães, D., Momesso, L., and Pupo, M. (2010) Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim Nova* **33**: 667-679.

Hamel, M., Rolain, J., and Baron, S. (2021) The History of Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria: Progress and Challenges. *Microorganisms* **9**: 1-18.

Hancock, R. (2005) Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *Lancet Infect Dis* **5**: 209-218.

Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W., and Winkelmann, G. (2003) Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 3677-3682.

Haque, A., Yoshizumi, A., Saga, T., Ishii, Y., and Tateda, K. (2014) ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in environmental water in Dhaka, Bangladesh. *J Infect Chemother* **20**: 735-737.

Hawser, S., Lociuro, S., and Islam, K. (2006) Dihydrofolate reductase inhibitors as antibacterial agents. *Biochem Pharmacol* **71**: 941-948.

Heidary, M., Khosravi, A., Khoshnood, S., Nasiri, M., Soleimani, S., and Goudarzi, M. (2017) Daptomycin. *J Antimicrob Chemother* **73**: 1-11.

Hirabayashi, A., Yahara, K., Mitsuhashi, S., Nakagawa, S., Imanishi, T., Ha, V., Nguyen, A., Nguyen, S., Shibayama, K., and Suzuki, M. (2021) Plasmid analysis of NDM metallo-β-lactamase-producing *Enterobacterales* isolated in Vietnam. *PLoS One* **16**: 1-16.

Holmes, A., Moore, L., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P., and Piddock, L. (2016) Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet* **387**: 176-187.

Hooper, D. (2002) Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis* **2**: 530-538.

Hooper, D., and Jacoby, G. (2016) Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**: 1-22.

Como os antimicrobianos são classificados?, https://farmaceuticodigital.com/2018/06/como-os-antimicrobianos-sao-classificados.html (Consultado a 15/11/2021).

Hu, Y., Yang, X., Lu, N., and Zhu, B. (2014) The abundance of antibiotic resistance genes in human guts has correlation to the consumption of antibiotics in animal. *Gut Microbes* **5**: 245-249.

Huang, J., Li, C., Song, J., Velkov, T., Wang, L., Zhu, Y., and Li, J. (2020) Regulating polymyxin resistance in Gram-negative bacteria: roles of two-component systems PhoPQ and PmrAB. *Future Microbiol* **15**: 445-459.

Huovinen, P., Sundstrom, L., Swedberg, G., and Skold, O. (1995) Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 279-289.

Hutchings, M., Truman, A., and Wilkinson, B. (2019) Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* **51**: 72-80.

Ito, R., Mustapha, M., Tomich, A., Callaghan, J., McElheny, C., Mettus, R., Shanks, R., Cremer, N., and Doi, Y. (2017) Widespread Fosfomycin Resistance in Gram-Negative Bacteria Attributable to the Chromosomal *fosA* Gene. *mBio* **8**: 1-9.

Jackson, J., Chen, C., and Buising, K. (2013) Aminoglycosides how should we use them in the 21st century?. *Curr Opin Infect Dis* **26**: 516-525.

Jacoby, G. (2005) Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clin Infect Dis* **41**: S120-S126.

Kahn, L. (2017) Antimicrobial resistance: a One Health perspective. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **111**: 255-260.

Kang, H., and Park, Y. (2015) Glycopeptide Antibiotics: Structure and Mechanisms of Action. *J Bacteriol Virol* **45**: 67-78.

Kang, K., Klein, D., Kazi, M., Guérin, F., Cattoir, V., Brodbelt, J., and Boll, J. (2019) Colistin heteroresistance in Enterobacter cloacae is regulated by PhoPQ-dependent 4-amino-4-deoxy- l - arabinose addition to lipid A. *Mol Microbiol* **111**: 1604-1616.

Karkman, A., Do, T., Walsh, F., and Virta, M. (2018) Antibiotic-Resistance Genes in WasteWater. *Trends Microbiol* **26**: 220-228.

Katz, L., and Ashley, G. (2005) Translation and Protein Synthesis: Macrolides. *Chem rev* **105**: 499-528.

Kaye, K., Pogue, J., Tran, T., Nation, R., and Li, J. (2016) Agents of Last Resort. *Infect Dis Clin North Am* **30**: 391-414.

Kelesidis, T., and Falagas, M. (2015) The safety of polymyxin antibiotics. *Expert Opin Drug Saf* **14**: 1687-1701.

Kieffer, N., Poirel, L., Bessa, L., Vasconcelos, A., Costa, P., and Nordmann, P. (2016) VIM-1, VIM-34, and IMP-8 Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Strains Recovered from a Portuguese River. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 2585-2586.

Kim, D., and Cha, C. (2021) Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Exp Mol Med* **53**: 301-309.

King, D., Sobhanifar, S., and Strynadka, N. (2017) The Mechanisms of Resistance to β-Lactam Antibiotics (pp.177-201) *In* Handbook of Antimicrobial Resistance, Eds. Gotte, M., Berghuis, A., Matlashewski, G., Wainberg, M., and Sheppard, D.; Springer, New York. ISBN: 978-1-4939-0693-2

Kong, K., Schneper, L., and Mathee, K. (2010) Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* **118**: 1-36.

Krause, K., Serio, A., Kane, T., and Connolly, L. (2016) Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**: 1-14.

Kubota, H., Uwamino, Y., Matsui, M., Sekizuka, T., Suzuki, Y., Okuno, R., Uchitani, Y., Ariyoshi, T., Aoki, W., Suzuki, S., Kuroda, M., Shinkai, T., Yokoyama, K., Sadamasu, K., Funakoshi, T., Murata, M., Hasegawa, N., and Iwata, S. (2018) FRI-4 carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* complex isolated in Tokyo, Japan. *J Antimicrob Chemother* **73**: 2969-2972.

Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde (2020A) DDI URRA-IT02_01: Preparação de microplacas com antibiótico para determinação de CIM por microdiluição.

Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde (2020B) DDI URRA-PE01_07: Determinação da Concentração Inibitória Mínima por microdiluição.

Lammie, S., and Hughes, J. (2016) Antimicrobial Resistance, Food Safety, and One Health: The Need for Convergence. *Annu Rev Food Sci Technol* **7**: 287-312.

Landman, D., Georgescu, C., Martin, D., and Quale, J. (2008) Polymyxins Revisited. *Clin Microbiol Rev* **21**: 449-465.

Laskin, A. (2003) What is an antibiotic? Revisited. *Adv Appl Microbiol* **52**: 313-327.

Laurens, C., Pierre, H., Fajardo, P., Hantova, S., Godreuil, S., Martinez, O., and Bilak, E. (2018) Transmission of IMI-2 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from river water to human. *J Glob Antimicrob Resist* **15**: 88-92.

Lavanya, R. (2017) Sulphonamides: A Pharmaceutical Review. *Int J Pharm Sci Invent* **6**: 1-3

Leach, K., Brickner, S., Noe, M., and Miller, P. (2011) Linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent. Ann NY Acad Sci **1222**: 49-54.

Leonard, D., Bonomo, R., and Powers, R. (2013) Class D β-Lactamases: A Reappraisal after Five Decades. *Acc Chem Res* **46**: 2407-2415.

Li, Z., and Velkov, T. (2019) Polymyxins: Mode of Action (Chapter 4) *In* Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside, Eds. Li, J., Nation, R., and Kaye, K.; Springer. ISBN: 978-3-030-16371-6.

Lim, D., and Strynadka, N. (2002) Structural basis for the β-lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol* **9**: 870-876.

Lima, L., Silva, B., Barbosa, G., and Barreiro, E. (2020) β-lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem* **208**: 1-40.

Lin, J., Zhou, D., Steitz, T., Polikanov, Y., and Gagnon, M. (2018) Ribosome-Targeting Antibiotics: Modes of Action, Mechanisms of Resistance, and Implications for Drug Design. *Annu Rev Biochem* **87**: 451-478.

Liu, S., Fang, R., Zhang, Y., Chen, L., Huang, N., Yu, K., Zhou, C., Cao, J., and Zhou, T. (2021) Characterization of resistance mechanisms of *Enterobacter cloacae* Complex co-resistant to carbapenem and colistin. *BMC Microbiol* **21**: 1-10.

Lohsen, S., and Stephens, D. (2019) Current Macrolide Antibiotics and Their Mechanisms of Action (Chapter 5) *In* Antibiotic drug resistance, Eds. Martínez, José., and Alarcón, T.; John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 9781119282549.

Lupo, A., Coyne, S., and Berendonk, T. (2012) Origin and Evolution of Antibiotic Resistance: The Common Mechanisms of Emergence and Spread in Water Bodies. *Front Microbiol* **3**: 1-13.

MacDougall, C. (2018) Sulfonamides, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, Quinolones, and Agents for Urinary Tract Infections (Chapter 56) *In* The Pharmacological Basis of Therapeutics 12th ed., Eds. Brunton, L., Hilal-Dandan, R., Knollmann, B., Goodman, L., and, Gilman, A.; McGraw-Hill, New York. ISBN: 978-1-25-958473-2.

MacGowan, A., and Macnaughton, E. (2017) Antibiotic resistance. *Medicine* **45**: 622-628.

Mack, A.R., Barnes, M.D., Taracila, M.A., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Cabot, G., Feldgarden, M., Haft, D.H., Klimke, W., van den Akker, F., Vila, A. J., Smania, A., Haider, S., Papp-Wallace, K.M., Bradford, P.A., Rossolini, G.M., Docquier, J.D., Frère, J.M., Galleni, M., Hanson, N.D., Oliver, A., Plésiat, P., Poirel, L., Nordmann, P., Palzkill, T.G., Jacoby, G.A., Bush, K., and Bonomo, R. A. (2020). A standard numbering scheme for Class C β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **64**, e01841-19.

Mack, A., Barnes, M., Taracila, M., Hujer, A., Hujer, K. , Cabot, G., Feldgarden, M., Haft, D., Klimke, W., Akker, F., Vila, A., Smania, A., Haider, S., Wallace, K., Bradford, P., Rossolini, G., Docquier, J., Frère, J., Galleni, M., Hanson, N., Oliver, A., Plésiat, P., Poirel, L., Nordmann, P., Palzkill, T., Jacoby, G., Bush, K., Bonomo, R. (2020) A Standard Numbering Scheme for Class C β-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **64**: e01841-19.

Mackenzie, J., and Jeggo, M. (2019) The One Health Approach—Why Is It So Important?. *Trop Med Infect Dis* **4**: 88-90.

Magnus, D., and Mazel, D. (2002) The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol* **292**: 115-125.

Magouras, I., Carmo, L., Stärk, K., and Regula, G. (2017) Antimicrobial Usage and Resistance in Livestock: Where Should We Focus?. *Front vet sci* **4**: 1-4.

Majumdar, S., Yu, J., Fookes, M., McAteer, S., Llobet, E., Finn, S., Spence, S., Monaghan, A., Kissenpfennig, A., Ingram, R., Bengoechea, J., Gally, D., Fanning, S., Elborn, J., and Schneiders, T. (2015) Elucidation of the RamA Regulon in *Klebsiella pneumoniae* Reveals a Role in LPS Regulation. *PLoS Pathog* **11**: 1-22.

Manageiro, V., Salgueiro, V., Ferreira, E., and Caniça, M. (2017) Antimicrobial resistances in specific environments. Bacterial resistances (Chapter 20) *In* Exposure to Microbiological Agents in Indoor and Occupational Environments, Eds. Viegas, C., Viegas, S., Gomes, A., Täubel, M., Sabino, R.; Springer International Publishing AG. ISBN: 978-3-319-61686-5.

Marín, M., and Gudiol, F. (2003) Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **21**: 42-55.

Marshall, B., and Levy, S. (2011) Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clin Microbiol Rev* **24**: 718-733.

Marsik, F., and Nambiar, S. (2011) Review of Carbapenemases and AmpC-beta Lactamases. *Pediatr Infect Dis J* **30**: 1094-1095.

Martinez, J. (2014) General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today: Technol* **11**: 33-39.

Masters, P., O'Bryan, T., Zurlo, J., Miller, D., and Joshi, N. (2003) Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited. *Arch Intern Med* **163**: 402-410.

Max, M. (2021) Antibiotics, antibiotic resistance and environment. Encyclopedia of the Environment [online ISSN 2555-0950], https://www.encyclopedie-environnement.org/en/health/antibiotics-antibiotic-resistance-and-environment/.

May, K., and Grabowicz, M. (2018) The bacterial outer membrane is an evolving antibiotic barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**: 8852-8854.

Mazzei, T., Mini, E., Novelli, A., and Periti, P. (1993) Chemistry and mode of action of macrolides. *J Antimicrob Chemother* **31**: 1-9.

Mbanga, J., Amoako, D., Abia, A., Fatoba, D., and Essack, S. (2021) Genomic analysis of antibiotic-resistant *Enterobacter* spp. from wastewater sources in South Africa: The first report of the mobilisable colistin resistance *mcr-10* gene in Africa. *Ecol Genet Genom* **21**: 100-104.

McEwen, S. (2011) Human Health Importance of use of Antimicrobials in Animals and Its Selection of Antimicrobial Resistance (Chapter 21) *In* Antimicrobial Resistance in the Environment, Eds. Keen, P., and Monforts, M.; Wiley-Blackwell. ISBN: 9781118156247.

McEwen, S., and Collignon, P. (2018) Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective (Chapter 25) *In* Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals, Eds. Schwarz, S., Cavaco, L., and Shen, J.; American Society for Microbiology Press. ISBN: 978-1-683-67052-0.

Mehta, D., and Sharma, K. (2016) Cephalosporins: A Review on Imperative Class of Antibiotics. *Mol Pharmacol* **1**: 1-6.

Meunier, D., Findlay, J., Doumith, M., Godoy, D., Perry, C., Pike, R., Gronthoud, F., Shryane, T., Poirel, L., Welfare, W., Woodford, N., and Hopkins, K. (2017) FRI-2 carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* complex in the UK. *J Antimicrob Chemother* **72**: 2478-2482.

Mezzatesta, M., Gona, F., and Stefani, S. (2012) *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol* **7**: 887-902.

Miller, E. (2002) The Penicillins: A Review and Update. *J Midwifery Womens Health* **47**: 426-434.

Motta, S., and Aldana, M. (2016) Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley Interdiscip Rev: Syst Biol Med* **8**: 253-267.

Munita, J., and Arias, C. (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* **4**: 1-37.

Naas, T., Dortet, L., and Iorga, B. (2016) Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. *Curr Drug Targets* **17**: 1006-1028.

Naeem, A., Badshah, S., Muska, M., Ahmad, N., and Khan, K. (2016) The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. *Molecules* **21**: 1-19.

Nelson, M., and Levy, S. (2011) The history of the tetracyclines. Ann NY Acad Sci **1241**: 17-32.

Nicolau, D. (2007) Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert Opin Pharmacother* **9**: 23-37.

Nilsson, O. (2012) Vancomycin resistant *enterococci* in farm animals – occurrence and importance. *Infect Ecol Epidemiol* **2**: 1-8.

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

Olaitan, A., Morand, S., and Rolain, J. (2014) Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology* **5**: 643-661.

One Health Comission (2020) What is One Health?, https://www.onehealthcommission.org/en/why_one_health/what_is_one_health/ (Consultado a 23/04/2021).

Overbye, K., and Barrett, J. (2005) Antibiotics: Where did we go wrong?. *Drug Discov Today* **10**: 45-52.

Page, M. (2012) Beta-Lactam Antibiotics (Chapter 5) *In* Antibiotic Discovery and Development, Eds. Dougherty, T., and Pucci, M.; Springer Boston. ISBN: 978-1-4614-1400-1

Pagès, J., James, C., and Winterhalter, M. (2008) The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**: 893-903.

Pallasch, T. (2003) Antibiotic resistance. *Dent Clin North Am* **47**: 623-639.

Pandit, N., Singla, R., and Shrivastava, B. (2012) Current Updates on Oxazolidinone and Its Significance. *Int J Med Chem* **2012**: 1-24.

Parks, D., Rinke, C., Chuvochina, M., Chaumeil, P., Woodcroft, B., Evans, P., Hugenholtz, P., and Tyson, G. (2017) Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nat Microbiol* **2**: 1533-1542.

Partridge, S., Kwong, S., Firth, N., and Jensen, S. (2018) Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* **31**: 1-45

Pascale, G., and Wright, G. (2010) Antibiotic Resistance by Enzyme Inactivation: From Mechanisms to Solutions. *ChemBioChem* **11**: 1325-1334

Paterson, D., and Bonomo, R. (2005) Extended-Spectrum β-Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev* **18**: 657-686.

Pedersen, T., Sekyere, J., Govinden, U., Moodley, K., Sivertsen, A., Samuelsen, Ø., Essack, S., and Sundsfjord, A. (2018) Spread of Plasmid-Encoded NDM-1 and GES-5 Carbapenemases among Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Clinical *Enterobacteriaceae* in Durban, South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* **62**: 1-12.

Phillips, O., and Sharaf, L. (2016) Oxazolidinone antimicrobials: a patent review (2012-2015). *Expert Opin Ther Pat* **26**: 591-605.

Piddock, L. (2006) Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**: 629-636.

Pitout, J., Peirano, G., Kock, M., Strydom, K., and Matsumura, Y. (2019) The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev* **33**: 1-14.

Ploy, M., Lambert, T., Couty, J., and Denis, F. (2000) Integrons: an Antibiotic Resistance Gene Capture and Expression System. *Clin Chem Lab Med* **38**: 483-487.

Poehlsgaard, J., and Douthwaite, S. (2005) The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat Rev Microbiol* **3**: 870-881.

Poirel, L., Jayol, A., and Nordmann, P. (2017) Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev* **30**: 557-596.

Poirel, L., Naas, T., and Nordmann, P. (2010) Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 24-38.

Poirel, L., Vasconcelos, A., Simões, R., Costa, P., Liu, W., and Nordmann, P. (2011) Environmental KPC-Producing *Escherichia coli* Isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 1662-1663.

Poole, K. (2004) Resistance to β-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* **61**: 2200-2223

Prescott, J. (2013) Sulfonamides, Diaminopyrimidines, and Their Combinations (Chapter 17) *In* Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, Eds. Giguère, S., Prescott, J., and Dowling, P.; John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 9781118675014.

Pyzik, E., Radzki, R., and Chmiel, R. (2020) Experimental Phage Therapies in Companion Animals with A Historical Review. *Curr Rev Clin Exp Pharmacol* **16**: 17-29.

Queenan, A., and Bush, K. (2007) Carbapenemases:the Versatile β-Lactamases. *Clin Microbiol Rev* **20**: 440-458.

Quinlivan, E., McPartlin, J., Weir, D., and Scott, J. (2000) Mechanism of the antimicrobial drug trimethoprim revisited. *FASEB J* **14**: 2519-2524.

Rasmussen, B., Bush, K., Keeney, D., Yang, Y., Hare, R., O'Gara, C., and Medeiros, A. (1996) Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2080-2086.

Redgrave, L., Sutton, S., Webber, M., and Piddock, L. (2014) Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* **22**: 438-445.

Regli, A., Lavigne, J., and Pagès, J. (2019) Enterobacter spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* **32**: 1-21.

Rensing, K., Abdallah, H., Koek, A., Elmowalid, G., Grauls, C., Naiemi, N., and Dijk, K. (2019) Prevalence of plasmid-mediated AmpC in *Enterobacteriaceae* isolated from humans and from retail meat in Zagazig, Egypt. *Antimicrob Resist Infect Control* **8**: 1-8.

Retsema, J., and Fu, W. (2001) Macrolides: structures and microbial targets. *Int J Antimicrob Agent* **18**: 3-10.

Reygaert, W. (2018) An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol* **4**: 482-501.

Ribeiro, A. (2018) Como os Antimicrobianos são Classificados. Farmacêutico Digital, https://farmaceuticodigital.com/2018/06/como-os-antimicrobianos-sao-classificados.html (Consultado a 23/04/2021).

Roberts, M. (2019) Tetracyclines: Mode of Action and their Bacterial Mechanisms of Resistance (Chapter 5) *In* Bacterial Resistance to Antibiotics – From Molecules to Man, Eds. Bonev, B., and Brown, N.; John Wiley & Sons Ltd. ISBN: 9781119593522.

Roberts, M., and Schwarz, S. (2016) Tetracycline and Phenicol Resistance Genes and Mechanisms: Importance for Agriculture, the Environment, and Humans. *J Environ Qual* **45**: 576-592.

Robinson, T., Bu, D., Mas, J., Fèvre, E., Gilbert, M., Grace, D., Hay, S., Jiwakanon, J., Kakkar, M., Kariuki, S., Laxminarayan, R., Lubroth, J., Magnusson, U., Ngoc, P., Boeckel, T., and Woolhouse, M. (2016) Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **110**: 377-380.

Rossolini, G., Arena, F., Pecile, P., and Pollini, S. (2014) Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharmacol* **18**: 56-60.

Rossolini, G., D'Andrea, M., and Mugnaioli, C. (2008) The spread of CTX-M-type extended-spectrum β-lactamases. *Clin Microbiol Infect* **14**: 33-41.

Sabtu, N., Enoch, D., and Brown, N. (2015) Antibiotic resistance: what, why, where, when and how?. *Br Med Bull* **116**: 105-113.

Salyers, A., and Shoemaker, N. (2006) Reservoirs of Antibiotic Resistance Genes. *Anim Biotechnol* **17**: 137-146.

Salyers, A., Gupta, A., and Wang, Y. (2004) Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol* **12**: 412-416.

Sanford, J., Maxwell, S., Tsau, K., Merrick, K., and Aminov, R. (2011) Antibiotic Resistance in Swine-Manure-Impacted Environments (Chapter 11) *In* Antimicrobial Resistance in the Environment, Eds. Keen, P., and Monforts, M.; Wiley-Blackwell. ISBN: 9781118156247.

Santajit, S., and Indrawattana, N. (2016) Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int* **2016**: 1-8.

Sarkar, P., Yarlagadda, V., Ghosh, C., and Haldar, J. (2017) A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics. *MedChemComm* **8**: 516-533.

Sárközy, G. (2001) Quinolones: a class of antimicrobial agents. *Vet Med (Praha)* **46**: 257-274.

Schaenzer, A., and Wright, G. (2020) Antibiotic Resistance by Enzymatic Modification of Antibiotic Targets. *Trends Mol Med* **26**: 768-782.

Schauer, J., Gatermann, S., Marschal, M., and Pfennigwerth, N. (2019) Genetic and biochemical characterization of FRI-3, a novel variant of the Ambler class A carbapenemase FRI-1. *J Antimicrob Chemother* **74**: 2891-2894.

Schwarz, S., and White, D. (2014) Phenicol Resistance (Chapter 9) *In* Frontiers in Antimicrobial Resistance: a tribute to Stuart B. Levy., Eds. White, D., Alekshun, M., and McDermott, P.; John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 1555813291

Schwarz, S., Shen, J., Kadlec, K., Wang, Y., Brenner Michael, G., Feßler, A., and Vester, B. (2016) Lincosamides, Streptogramins, Phenicols, and Pleuromutilins: Mode of Action and Mechanisms of Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**: 27-37.

Sefton, A. (2002) Mechanisms of Antimicrobial Resistance. *Drugs* **62**: 557-566.

Serio, A., Magalhães, M., Blanchard, J., and Connolly, L. (2017) Aminoglycosides: Mechanisms of Action and Resistance (Chapter 14) *In* Antimicrobial Drug Resistance, Eds. Mayers, D., Sobel, J., Ouellette, M., Kaye, K., and Marchaim D.; Springer. ISBN: 978-3-319-46718-4.

Phage Search Tool Enhanced Release (PHASTER), https://phaster.ca/ (Consultado a 9/10/2021).

RFPlasmid, http://klif.uu.nl/rfplasmid/ (Consultado a 9/10/2021).

Shakil, S., Khan, R., Zarrilli, R., and Khan, A. (2007) Aminoglycosides versus bacteria – a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J Biomed Sci* **15**: 5-14.

Sköld, O. (2000) Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat* **3**: 155-160.

Sköld, O. (2001) Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res* **32**: 261-273.

Sköld, O. (2010) Sulfonamides and trimethoprim. *Expert Rev Anti Infect Ther* **8**: 1-6.

Smith, C., and Powell, K. (2000) Review of the Sulfonamides and Trimethoprim. *Pediatr Rev* **21**: 368-371.

Smith, R., M'ikanatha, N., and Read, A. (2014) Antibiotic Resistance: A Primer and Call to Action. *Health Commun* **30**: 309-314.

Spellberg, B. (2014) The future of antibiotics. *Crit Care* **18**: 1-7.

Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., and Ploy, M. (2012) Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance. *Front Microbiol* **3**: 1-14

Stokes, H., and Gillings, M. (2011) Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 790-819.

StrainSeeker, https://bioinfo.ut.ee/strainseeker/ (Consultado a 9/10/2021).

Straus, S., and Hancock, R. (2006) Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim Biophys Acta-Biomembranes* **1758**: 1215-1223.

Suárez, C., and Gudiol, F. (2009) Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **27**: 116-129.

Sutcliffe, J. (2005) Improving on nature: antibiotics that target the ribosome. *Curr Opin Microbiol* **8**: 534-542.

Suzuki, Y., Nazareno, P., Nakano, R., Mondoy, M., Nakano, A., Bugayong, M., Bilar, J., Perez, M., Medina, E., Obata, M., Saito, M., Nakashima, K., Oshitani, H., and Yano, H. (2020) Environmental Presence and Genetic Characteristics of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* from Hospital Sewage and River Water in the Philippines. *Appl Environ Microbiol* **86**: 1-10.

Tafoukt, R., Touati, A., Leangapichart, T., Bakour, S., and Rolain, J. (2017) Characterization of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae* isolated from river water in Algeria. *Water Res* **120**: 185-189.

Taggar, G., Attiq Rehman, M., Boerlin, P., and Diarra, M. (2020) Molecular Epidemiology of Carbapenemases in *Enterobacteriales* from Humans, Animals, Food and the Environment. *Antibiotics* **9**: 1-21.

Teixeira, P., Tacão, M., Pureza, L., Gonçalves, J., Silva, A., Schneider, M., and Henriques, I. (2020) Occurrence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in a Portuguese river: bla_{NDM}, bla_{KPC} and bla_{GES} among the detected genes. *Environ Pollut* **260**: 1-10.

Teuber, M. (2001) Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* **4**: 493-499.

Thaker, M., Spanogiannopoulos, P., and Wright, G. (2009) The tetracycline resistome. *Cell Mol Life Sci* **67**: 419-431.

The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD), https://card.mcmaster.ca/ (Consultado a 9/10/2021).

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 12.0, 2021, https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf (Consultado a 15/04/2021).

Thierauf, A., Perez, G., and Maloy, S. (2009) Generalized Transduction. *Methods Mol Biol* **501**: 267-286.

Tomé, A., and Filipe, A. (2011) Quinolones. *Drug Saf* **34**: 465-488.

Tortora, G., Funke, B., and Case, C. (2017) Microbiologia 12ª ed. Porto Alegre; Artmed pp 82

Uwamino, Y., Kubota, H., Sasaki, T., Kosaka, A., Furuhashi, M., Uno, S., Kudoh, J., Murata, M., and Hasegawa, N. (2019) Recovery of FRI-5 carbapenemase at a Japanese hospital where FRI-4 carbapenemase was discovered. *J Antimicrob Chemother* **74**: 3390-3392.

Vaara, M. (2010) Polymyxins and their novel derivatives. *Curr Opin Microbiol* **13**: 574-581.

Vadlamani, G., Thomas, M., Patel, T., Donald, L., Reeve, T., Stetefeld, J., Standing, K., Vocadlo, D., and Mark, B. (2015) The β-Lactamase Gene Regulator AmpR is a Tetramer That Recognizes and Binds the d-Ala-d-Ala Motif of Its Repressor UDP-N-acetylmuramic Acid (MurNAc)-pentapeptide. *J Biol Chem* **290**: 2630-2643.

Van Hoek, A., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A., and Aarts, H. (2011) Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. *Front Microbiol* **2**: 1-27.

Velkov, T., Roberts, K., Nation, R., Thompson, P., and Li, J. (2013) Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol* **8**: 711-724.

Ventola, C. (2015) The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* **40**: 277–283.

Vikesland, P., Garner, E., Gupta, S., Kang, S., Moskowitz, A., and Zhu, N. (2019) Differential Drivers of Antimicrobial Resistance across the World. *Acc Chem Res* **52**: 916-924.

Vilhena, C., and Bettencourt, A. (2012) Daptomycin: A Review of Properties, Clinical Use, Drug Delivery and Resistance. *Mini Rev Med Chem* **12**: 202-209.

Wallace, K., Endimiani, A., Taracila, M., and Bonomo, R. (2011) Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 4943-4960.

Wand, M., and Sutton, J. (2020) Mutations in the two component regulator systems PmrAB and PhoPQ give rise to increased colistin resistance in *Citrobacter* and *Enterobacter* spp. *J Med Microbiol* **69**: 521-529.

Wareham, D., and Wilson, P. (2002) Chloramphenicol in the 21st century. *Hosp Med* **63**: 157-161.

Webber, M. (2003) The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* **51**: 9-11.

White, A. and Hughes, J. (2019) Critical Importance of a One Health Approach to Antimicrobial Resistance. *EcoHealth* **16**: 404-409.

Whittle, G., and Salyers, A. (2010) Bacterial Transposons—An Increasingly Diverse Group of Elements (Chapter 17) *In* Modern microbial genetics, Eds. Streips, U., and Yasbin, R.; Wiley-Liss. ISBN: 9780471221975

Wilson, D., Hauryliuk, V., Atkinson, G., and O'Neill, A. (2020) Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nat Rev Microbiol* **18**: 637-648.

Wilson, D., Schluenzen, F., Harms, J., Starosta, A., Connell, S., and Fucini, P. (2008) The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 13339-13344.

Woolhouse, M., Ward, M., Bunnik, B., and Farrar, J. (2015) Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370**: 1-7.

World Health Organization (WHO) (2017) One Health, www.who.int/news-room/q-adetail/one-health (Consultado a 23/04/2021).

World Health Organization Europe (WHO/Europe) (2020) One Health, https://www.euro.who.int/en/health-topics/health-policy/one-health (Consultado a 23/04/2021).

World Organisation For Animal Health (OIE) (2017) One health "at a glance", https://www.oie.int/en/for-the-media/onehealth/ (Consultado a 23/04/2021).

Worthington, R., and Melander, C. (2013) Overcoming Resistance to β-Lactam Antibiotics. *J Org Chem* **78**: 4207-4213.

Wozniak, R., and Waldor, M. (2010) Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol* **8**: 552-563.

Wright, G. (2010) Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic?. *Curr Opin Microbiol* **13**: 589-594.

Xu, H., Miao, V., Kwong, W., Xia, R., and Davies, J. (2011) Identification of a novel fosfomycin resistance gene (*fosA2*) in *Enterobacter cloacae* from the Salmon River, Canada. *Lett Appl Microbiol* **52**: 427-429.

Yadav, S., and Kapley, A. (2021) Antibiotic resistance: Global health crisis and metagenomics. *Biotechnol Rep* **29**: 1-9.

Yoneyama, H., and Katsumata, R. (2006) Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**: 1060-1075.

Yu, Z., Qin, W., Lin, J., Fang, S., and Qiu, J. (2015) Antibacterial Mechanisms of Polymyxin and Bacterial Resistance. *Biomed Res Int* **2015**: 1-11.

Zeng, X., and Lin, J. (2013) Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front Microbiol* **4**: 1-9.

Zhanel, G., Dueck, M., Hoban, D., Vercaigne, L., Embil, J., Gin, A., and Karlowsky, J. (2001) Review of Macrolides and Ketolides. *Drugs* **61**: 443-498.

Zhanel, G., Wiebe, R., Dilay, L., Thomson, K., Rubinstein, E., Hoban, D., Noreddin, A., and Karlowsky, J. (2007) Comparative Review of the Carbapenems. *Drugs* **67**: 1027-1052.

Zhao, Y., Yang, Q., Zhou, X., Wang, F., Muurinen, J., Virta, M., Brandt, K., and Zhu, Y. (2020) Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: Status and solutions. *Crit Rev Environ Sci Technol* **51**: 2159-2196.

Zurfuh, K., Poirel, L., Nordmann, P., Nüesch-Inderbinen, M., Hächler, H., and Stephan, R. (2016) Occurrence of the Plasmid-Borne *mcr-1* Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 2594-2595.

VII. Anexos

Anexo I

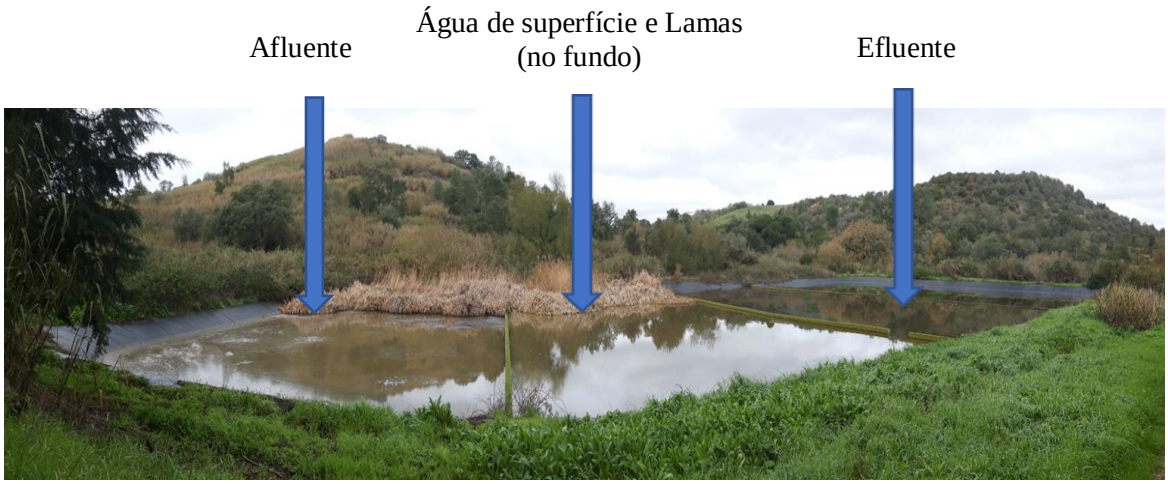


Figura VII.1. Fotografia com a localização das lagoas de estabilização onde foram recolhidas as amostras do afluente, efluente, lamas e água de superfície.

Anexo II

Os discos assinalados a cinzento não foram incluídos no presente estudo.

A

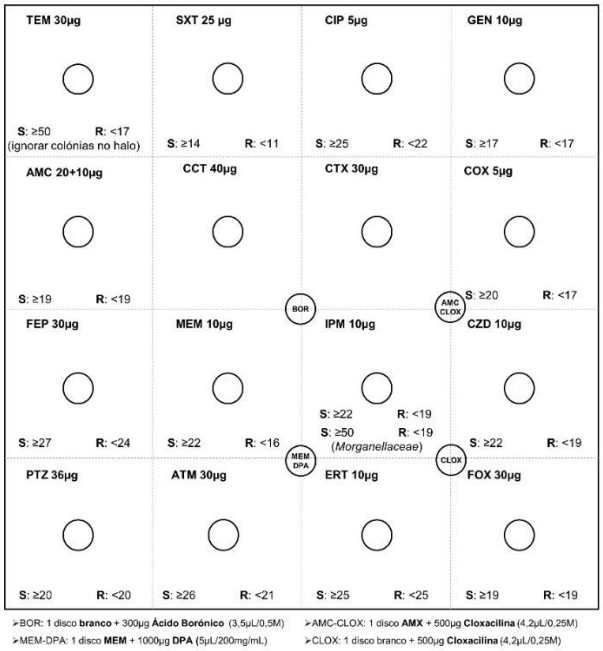


Figura VII.2. Esquema da organização dos discos de antibiótico utilizados na determinação da suscetibilidade aos antibióticos por difusão em disco na placa A

B

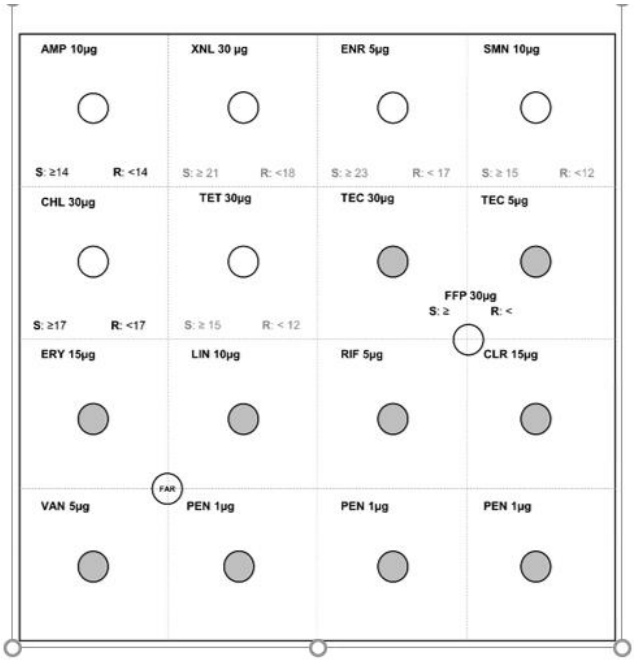


Figura VII.3. Esquema da organização dos discos de antibiótico utilizados na determinação da suscetibilidade aos antibióticos por difusão em disco na placa B. Os discos assinalados a cinzento não foram incluídos no presente estudo

Anexo III

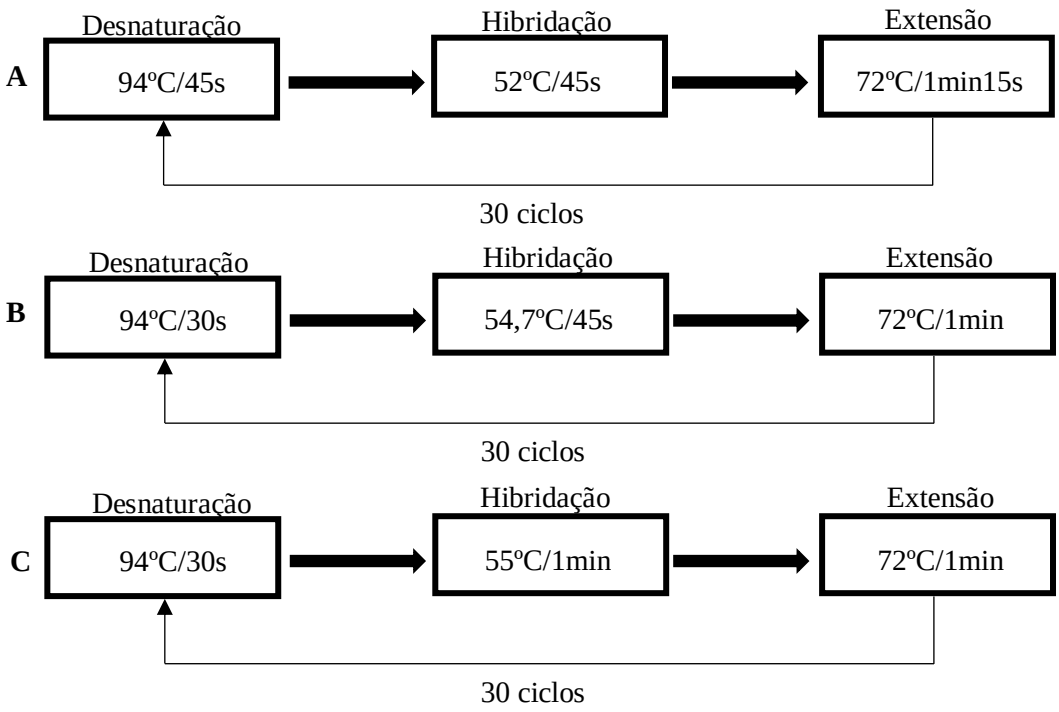


Figura VII.4. (A) Programa utilizado para os PCR multiplex para amplificação das carbapenemases de classe A, B e D e para o gene *mcr1/2*; (B) Programa utilizado para a amplificação do gene *bla*$_{\text{VIM-G1-tipo}}$; (C) Programa utilizado para a amplificação do gene *bla*$_{\text{VIM-G2-tipo}}$

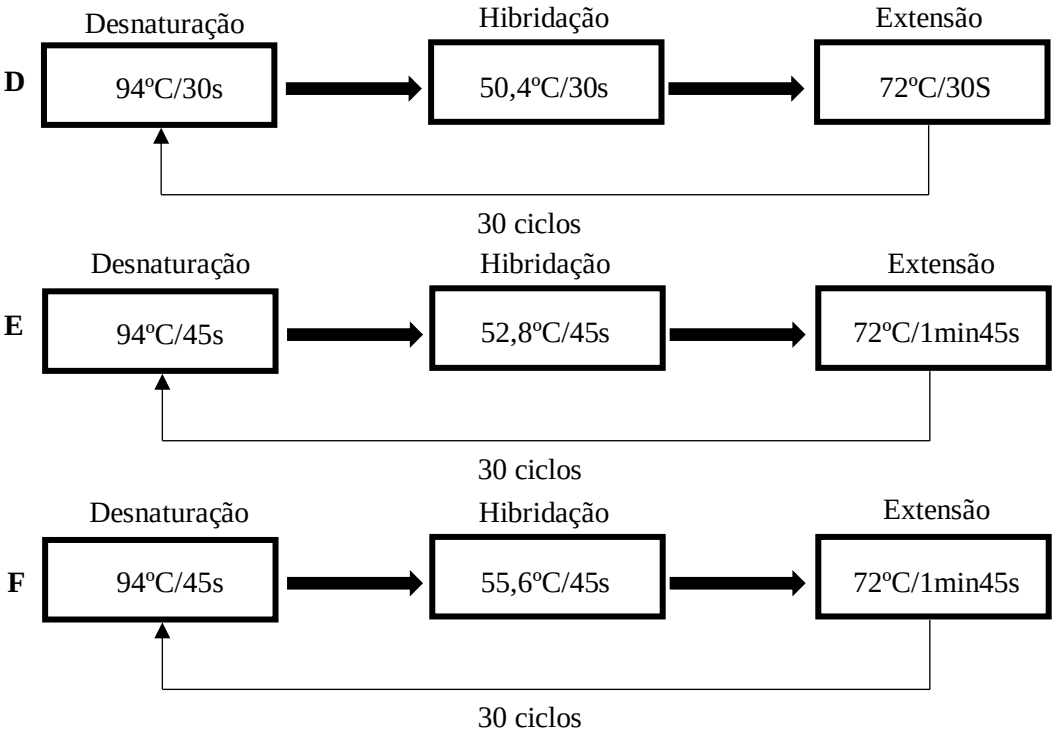


Figura VII.5. (D) Programa utilizado para a amplificação do gene *bla*$_{\text{IMP-G1/G2-tipo}}$; (E) Programa utilizado para o PCR multiplex para a amplificação dos genes *mcr1-5*; (F) Programa utilizado para a amplificação do gene *mcr-9*.

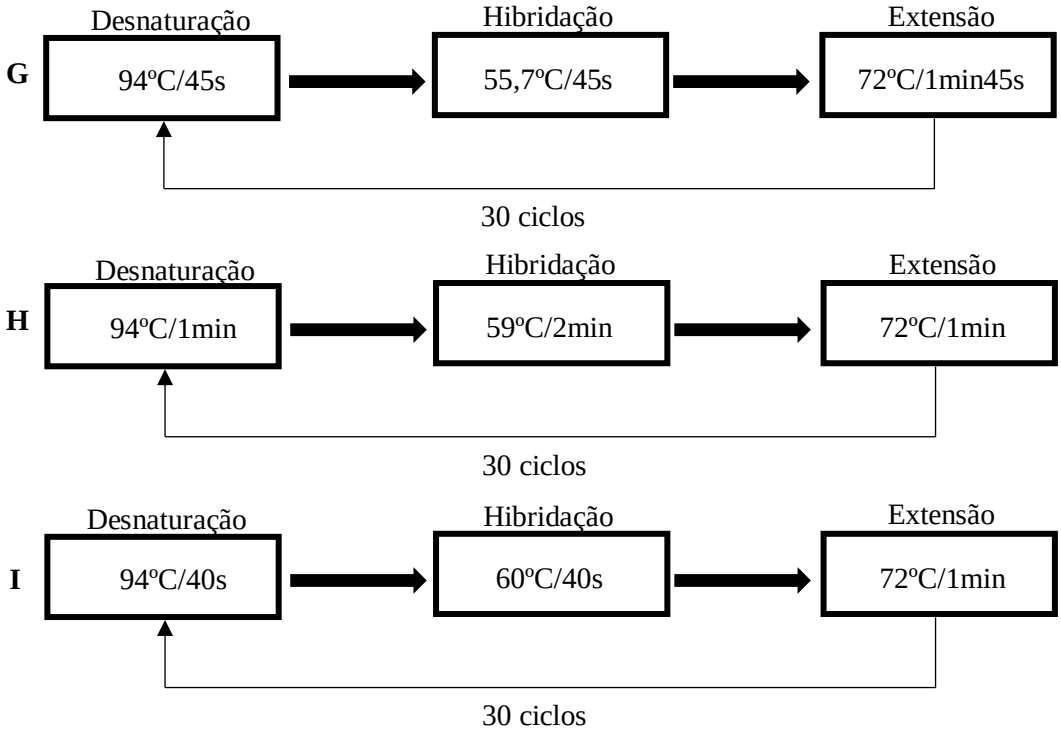


Figura VII.6. (G) Programa utilizado para amplificação do gene *mcr-10*; (H) Programa utilizado para o PCR multiplex para a amplificação de ESBLs; (I) Programa utilizado para o PCR multiplex para amplificação de β-lactamases da família CTX-M, grupos 1, 2 e 9

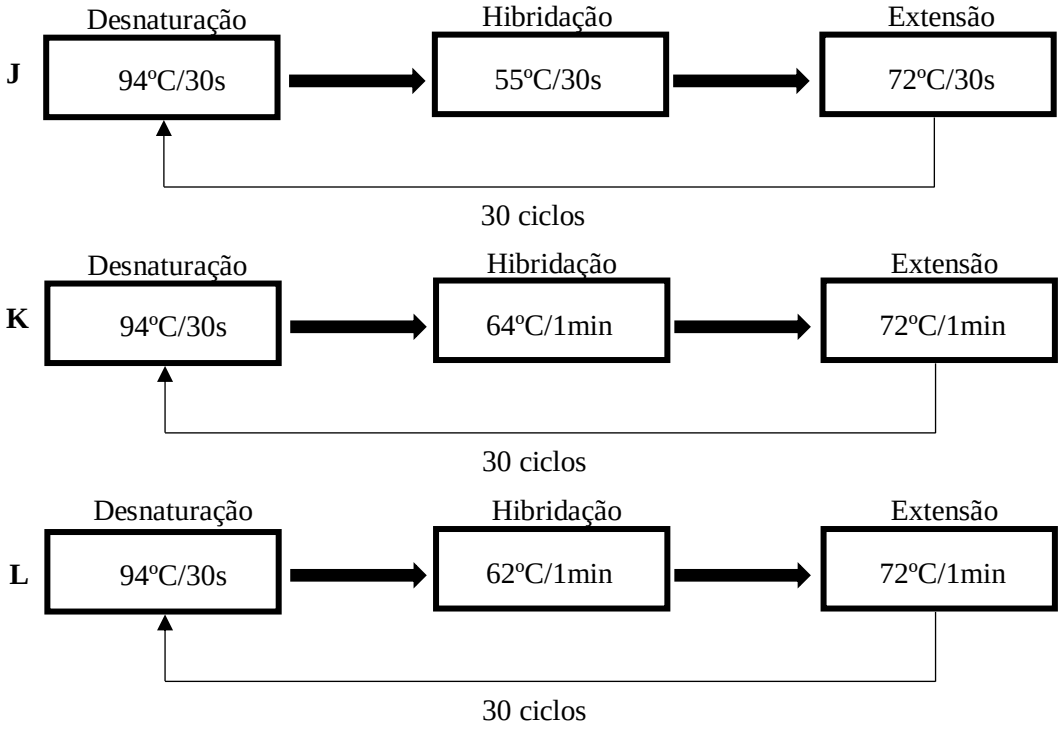


Figura VII.7. (J) Programa utilizado para a amplificação do gene *bla*$_{\text{CTX-M-G8/25-tipo}}$; (K) Programa utilizado para o PCR multiplex para amplificação de β-lactamases do tipo AmpC; (L) Programa utilizado para a amplificação do gene *bla*$_{\text{ACT-tipo}}$.

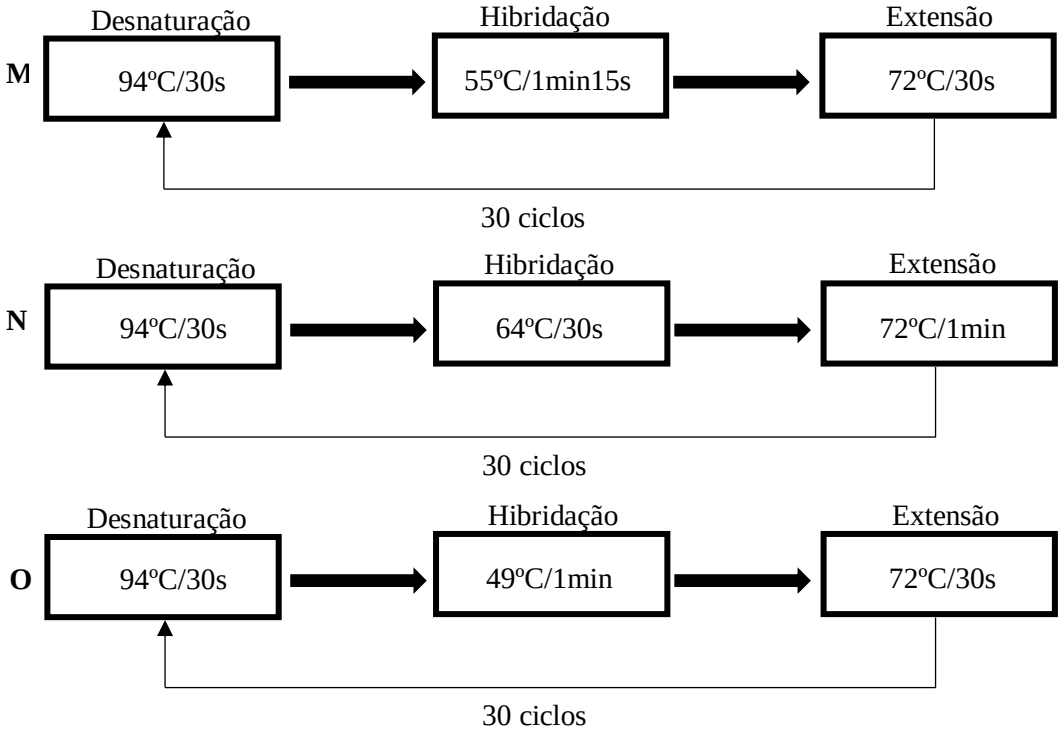


Figura VII.8. (M) Programa utilizado para o PCR multiplex para amplificação dos genes de resistência às quinolonas (*qnr*-tipo); (N) Programa utilizado para a amplificação do gene *oqxAB*-tipo; (O) Programa utilizado para a amplificação de integrases de classe I.

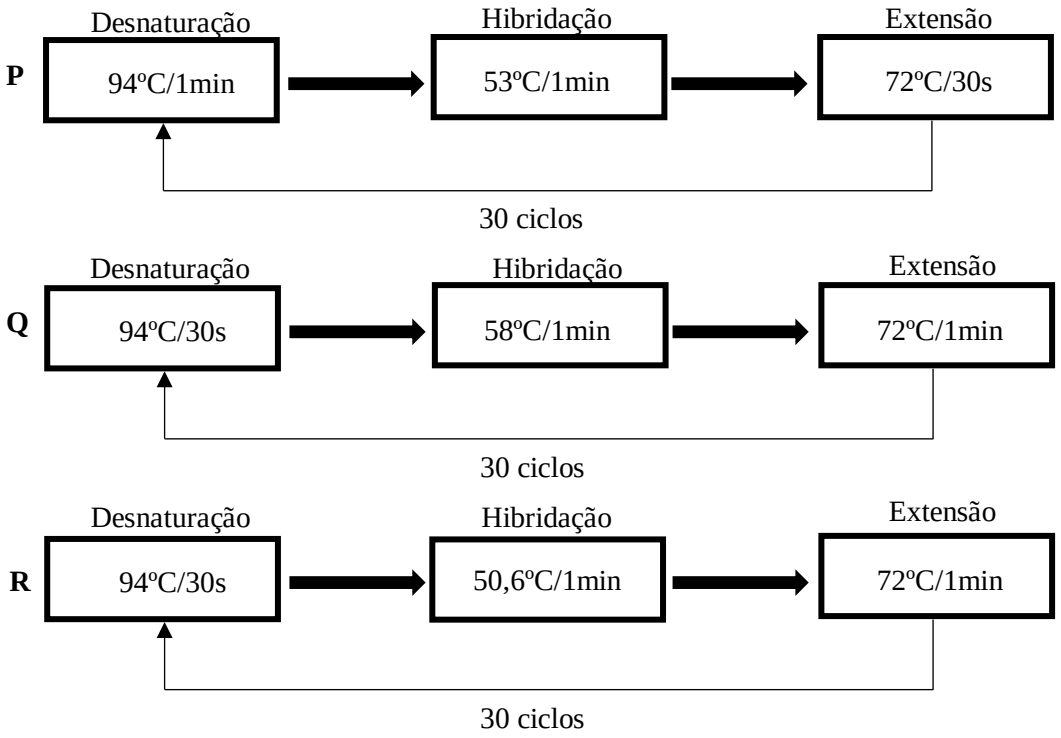


Figura VII.9. (P) Programa utilizado para a amplificação de integrases de classe II; (Q) Programa utilizado para a amplificação de integrases de classe III; (R) Programa utilizado para amplificação do gene $bla_{\text{ACT-tipo}}$ externo.

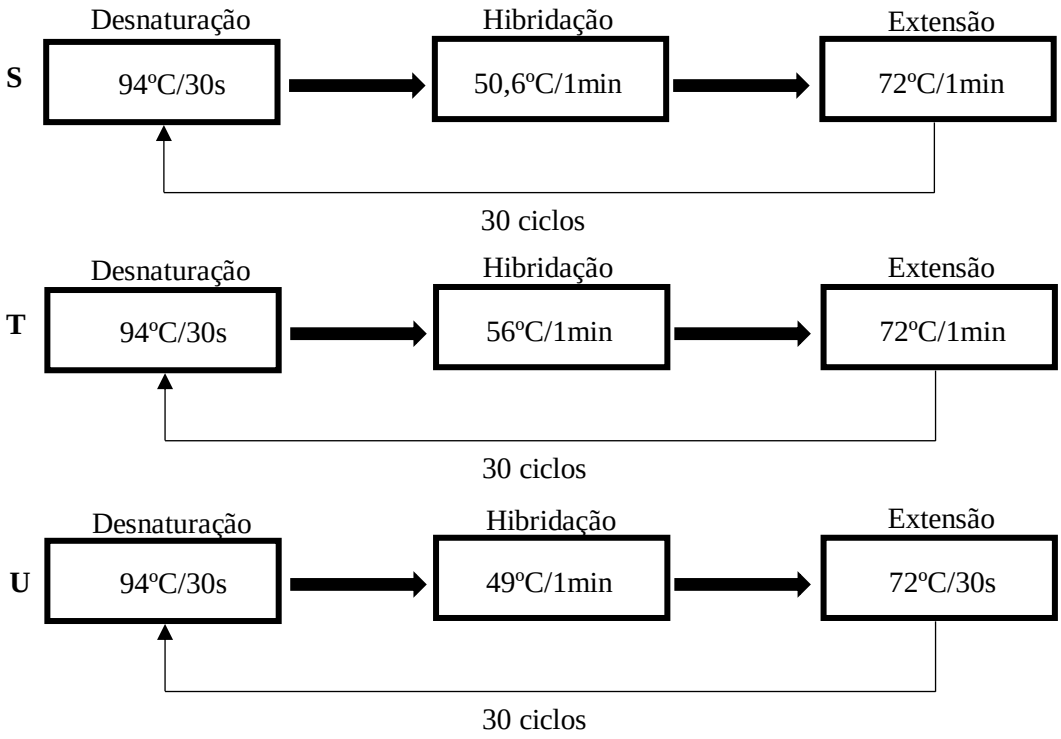


Figura VII.10. (S) Programa utilizado para a amplificação do gene *bla*$_{\text{ACC-tipo}}$; (T) Programa utilizado para a amplificação do gene *bla*$_{\text{DHA-tipo}}$; (U) Programa utilizado para a amplificação do gene *qnrB*-tipo

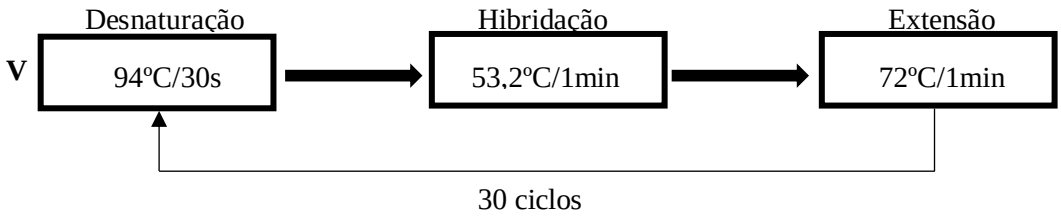


Figura VII.11. Programa utilizado para a amplificação do gene *qepA*-tipo

Anexo IV

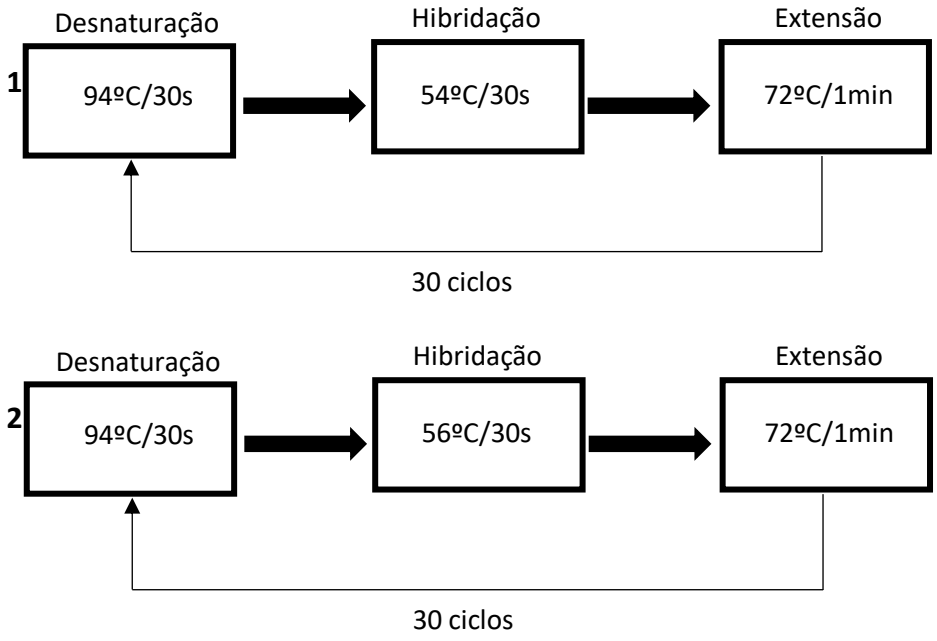


Figura VII.12. (1) Programa utilizado para a amplificação dos genes *dnaA, fusA, rplB, rpoB e gyrB*; (2) Programa utilizado para a amplificação dos genes *leuS* e *pyrG*

Anexo V

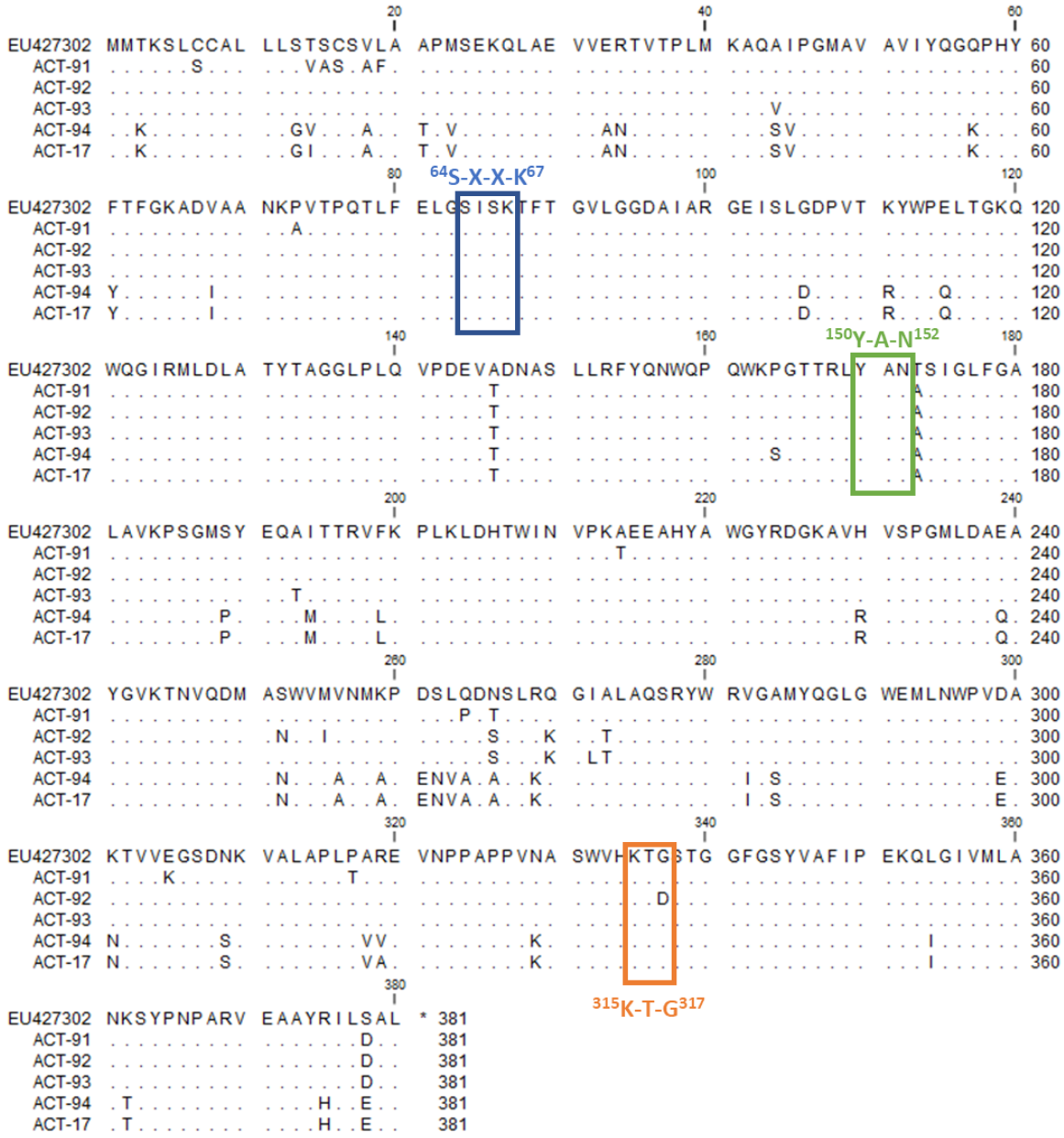


Figura VII.13 Alinhamento das proteínas ACT-17, ACT-91, ACT-92, ACT-93 e ACT-94 relativamente à proteína de referência (NCBI *accession* no. EU427302). A numeração da sequência aminoacídica considera a primeira metionina como o aminoácido nº. 1; a numeração dos locais conservados está de acordo com o esquema de numeração padrão para β-lactamases Classe C (Mack *et al.*, 2020).