

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Ciências
ULisboa

Evolução da resistência aos antibióticos em estirpes isoladas de diferentes reservatórios

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Rafael José Ferreira Nunes Graça

Dissertação orientada por:
Manuela Caniça
Deodália Dias

2015

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Ciências
ULisboa

Evolução da resistência aos antibióticos em estirpes isoladas de diferentes reservatórios

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Rafael José Ferreira Nunes Graça

Dissertação orientada por:
Manuela Caniça
Deodália Dias

2015

Notas prévias

Esta dissertação contou com a co-orientação da Doutora Vera Manageiro, pertencente ao Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

As referências bibliográficas estão de acordo com as normas da revista *International Journal of Medical Microbiology*.

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

Trabalhos publicados/submetidos:

Daniela Jones-Dias, Lurdes Clemente, **Rafael Graça**, Eugénia Ferreira, Teresa Albuquerque, Patrícia Themudo, Vera Manageiro, Manuela Caniça, 2015. Fluoroquinolone resistance and a new CTX-M enzyme among *Salmonella* spp and *Escherichia coli* isolates from food, zoo and companion animals. 6th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE). Poster nº 90, 29 de Junho - 1 de Junho 2015, Tours, França.

Vera Manageiro, **Rafael Graça**, Eugénia Ferreira, Lurdes Clemente, Manuela Caniça, 2015. Characterization of a new CTX-M β -lactamase (CTX-M-166) produced by a commensal *Escherichia coli* isolate recovered from poultry. 35^e Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse (RICAI). Submetido para apresentação oral, 14-15 de Dezembro 2015, Paris, França.

Daniela Jones-Dias, Vera Manageiro, **Rafael Graça**, Teresa Albuquerque, Patrícia Themudo, Eugénia Ferreira, Lurdes Clemente, Manuela Caniça, 2015. Fluoroquinolone nonsusceptibility in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* from animals. Artigo submetido à revista Veterinary Record.

Agradecimentos

À Doutora Manuela Caniça, por me receber no laboratório e pela disponibilidade demonstrada para me ajudar, e ainda pelos conhecimentos partilhados.

À Doutora Deodália Dias, por estar sempre disponível para ajudar, e pela orientação durante os dois anos de mestrado.

À Doutora Vera Manageiro, pela ajuda constante desde o primeiro ao último dia de trabalho sem a qual não teria sido possível realizar esta tese.

À Doutora Eugénia Ferreira, e às restantes colegas com quem partilhei o laboratório, Daniela, Inês, Joana, Raquel, Sofia e Vanessa pela ajuda prestada e pelos momentos de descontração proporcionados ao longo deste ano. Um obrigado especial à futura Doutora Daniela Dias pelo auxílio constante, por todas as explicações e conhecimentos partilhados.

À mestre Lurdes Clemente, por ter disponibilizado os isolados de origem animal, e pela ajuda prestada.

Aos meus amigos, eles sabem quem são, pelos momentos de diversão e descompressão passados juntos. Obrigado pela vossa amizade.

Aos meus pais e irmão, por estarem sempre presentes e me apoiarem sempre que foi necessário, não só durante este ano de trabalho, mas durante toda a minha vida.

À Mikinhas, por tudo. Obrigado por estares sempre ao meu lado, nos bons e nos maus momentos. Tu sabes o quão importante és para mim. Já chega de lamechices TTT. Amo-te.

Sumário

A resistência aos antibióticos é um problema global e atual. O uso e mau uso de antibióticos não só em medicina humana e veterinária, mas também no ambiente, são fatores responsáveis pela emergência e disseminação de bactérias multirresistentes. A difusão das β -lactamases de espectro alargado (ESBL) constitui o principal mecanismo de resistência às cefalosporinas de 3ª geração em bactérias de Gram-negativo. Atualmente, as ESBL, particularmente as produtoras de CTX-M, têm emergido em diferentes reservatórios (animal, homem e ambiente). A produção de CTX-M, concomitantemente com a resistência a outras classes de antibióticos, ou mesmo por coprodução de outras β -lactamases (como as carbapenemases), tem constituído uma forma das bactérias se tornarem multirresistentes.

No sentido de avaliar a evolução da resistência aos antibióticos em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de diferentes reservatórios, este trabalho teve como objetivos específicos: a) investigar a diversidade das β -lactamases produzidas por 68 isolados de origem humana e animal e avaliar a sua suscetibilidade às diferentes classes de antibióticos; b) caracterizar a estrutura-função da nova enzima CTX-M-166 e estudar as suas consequências fenotípicas. Para alcançar estes objetivos, foi utilizada uma combinação de métodos fenotípicos, de biologia molecular e bioquímicos.

A caracterização molecular dos mecanismos de resistência permitiu identificar uma grande diversidade de β -lactamases: penicilinases (TEM-1 e OXA-tipo); ESBLs da família CTX-M [CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-15 (mais prevalente), CTX-M-27, CTX-M-32 e CTX-M-166 (nova variante)], TEM (TEM-52) e SHV (SHV-12); resistentes aos inibidores (TEM-30/IRT-2); e AmpCs plasmídicas (CMY-2 e DHA-1). Foram também identificados genes plasmídicos de resistência às fluoroquinolonas: *aac(6')-Ib-cr* e *qnrB* 19. Dos 68 isolados analisados, 75% revelaram ser multirresistentes. A determinação das constantes cinéticas da CTX-M-166, identificada num isolado de origem animal, permitiu verificar uma diminuição na eficiência catalítica (k_{cat}/K_m), em comparação com a CTX-M-1. Contudo, a substituição aminoácida Ala120Val contribuiu para o aumento da afinidade (K_m) para a penicilina G, piperacilina, cefotaxima e ceftiofur, sendo este último antibiótico exclusivamente utilizado em medicina veterinária.

Em conclusão, este estudo evidenciou uma grande diversidade de β -lactamases em isolados de *E. coli* de vários reservatórios, e uma elevada prevalência de multirresistência. Contribuiu ainda para uma melhor compreensão da evolução das propriedades catalíticas das enzimas CTX-M.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; resistência bacteriana; β -lactamase, CTX-M; CTX-M-166

Abstract

Antibiotic resistance is a global and current problem. The use and misuse of antibiotics, not only in human and veterinary medicine, but also in the environment, are factors responsible for the emergence and spread of multidrug resistant bacteria. The spread of extended spectrum β -lactamases (ESBL) constitute the main mechanism of resistance to 3rd generation cephalosporins in Gram-negative bacteria. Currently, ESBL-producing bacteria, particularly CTX-M, have emerged in different reservoirs (animal, human and environment). The production of CTX-M, concomitantly with resistance to other classes of antibiotics, or even co-production of other β -lactamases (such as carbapenemases) has greatly contributed to the emergence of multidrug resistant bacteria.

In order to assess the evolution of antibiotic resistance in isolates of *Escherichia coli* from different reservoirs, this study included the following objectives: a) to investigate the diversity of β -lactamases produced by 68 isolates of human and animal origin, and to evaluate their susceptibility to different classes of antibiotics; b) to characterize the structure and function of the new CTX-M-166 enzyme and to study its phenotypic consequences. Globally, in order to achieve these goals, a strategic combination of phenotypic, molecular and biochemical methods were applied.

The molecular characterization of resistance mechanisms allowed the identification of a large diversity of β -lactamases: penicillinases (TEM-1 and OXA-type); ESBLs from CTX-M family [CTX-M-1 CTX-M-14, CTX-M-15 (the most prevalent), CTX-M-27, CTX-M-32 and CTX-M-166 (new variant)]; TEM (TEM-52) and SHV (SHV-12); resistance to β -lactamase inhibitors (TEM-30 / IRT-2); and plasmidic AmpCs (CMY-2 and DHA-1). The investigation of plasmid-mediated quinolone resistance identified *aac(6')-Ib-cr* and *qnrB* 19 genes. Among the 68 isolates analyzed, 75% were found to be multidrug resistant. The determination of the kinetic constants of the new CTX-M-166, identified in an isolate of animal origin, showed a reduction in the catalytic efficiency (*k_{cat}/K_m*), when compared to CTX-M-1. However, the aminoacid substitution Ala120Val contributed to an increase in the affinity (*K_m*) for penicillin G, piperacillin, cefotaxime and ceftiofur; it is worth mentioning that this last antibiotic is exclusively used in veterinary medicine.

In conclusion, this study demonstrated the existence of a great diversity of β -lactamases in *E. coli* isolates recovered from different reservoirs, and a high prevalence of multidrug resistance. The results also contributed to a better understanding of the evolution of the catalytic properties of the CTX-M enzymes.

Keywords: *Escherichia coli*; bacterial resistance; β -lactamase, CTX-M; CTX-M-166.

Índice

Agradecimentos	i
Sumário	ii
Abstract	iii
Índice.....	iv
Índice de figuras	vii
Índice de tabelas	viii
Lista de abreviaturas	ix
I. Introdução	1
1. Os antibióticos.....	2
2. Problemática da resistência aos antibióticos.....	2
3. Antibióticos β -lactâmicos.....	3
3.1. Estrutura dos antibióticos β -lactâmicos.....	6
3.2. Mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos	7
3.2.1. Por produção de β -lactamases.....	8
3.2.1.1. Atividade hidrolítica das β -lactamases.....	9
3.2.1.2. ESBLs - β -lactamases de espectro-estendido	11
3.2.1.3. Carbapenemases	12
3.2.1.4. Resistência aos inibidores de β -lactamases	13
3.2.2. Por alteração de porinas	14
3.2.3. Por ação de bombas de efluxo	15
3.2.4. Por alteração das PLPs (Proteínas de Ligação à Penicilina).....	16
4. Classes de antibióticos não β -lactâmicos e principais mecanismos de resistência	16
5. Epidemiologia de determinantes de resistência a antibióticos em humanos e animais.....	18
5.1. CTX-M	18
5.2. Carbapenemases	19
5.3. PMA β (<i>Plasmid-Mediated AmpC β-lactamases</i>)	21
5.4. PMQRs (<i>Plasmid-Mediated Quinolone Resistance</i>).....	21

6. Disseminação de β -lactamases através de elementos genéticos móveis	22
7. Objetivos	24
II. Material e Métodos	25
1. Isolados bacterianos estudados	26
2. Caracterização fenotípica	26
2.1. Teste de suscetibilidade aos antibióticos	26
3. Caracterização genotípica	28
3.1. Extração de ADN	28
3.2. Detecção de genes de resistência aos antibióticos	28
3.3. Purificação dos produtos de PCR	31
3.4. Identificação dos genes de resistência aos antibióticos por sequenciação nucleotídica	31
4. Caracterização do novo gene <i>bla</i> _{CTX-M-166}	32
4.1. Transferência de ADN plasmídico	32
4.1.1. Conjugação	32
4.1.2. Transformação	33
4.1.2.1. Extração de ADN plasmídico	34
4.1.2.2. Transformação de ADN plasmídico	34
4.2. Clonagem dos genes <i>bla</i> _{CTX-M-1} e <i>bla</i> _{CTX-M-166}	35
4.3. Determinação da localização dos genes <i>bla</i> _{CTX-M-1} e <i>bla</i> _{CTX-M-166}	35
4.3.1. Restrição com a enzima I-Ceu I	35
4.4. Caracterização enzimática para análise da estrutura-função	37
4.4.1. Extração das enzimas CTX-M-1 e CTX-M-166 para estudo cinético	37
4.4.2. Purificação das β -lactamases CTX-M-1 e CTX-M-166	37
4.4.3. Quantificação e avaliação da pureza das β -lactamases extraídas	38
4.4.4. Determinação de parâmetros cinéticos	38
5. Mutagênese	39
III. Resultados	41

1. Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos	42
1.1. Suscetibilidade aos antibióticos	42
1.2. Multirresistência	46
2. Caracterização genotípica dos isolados bacterianos	46
2.1. Perfil genotípico: estirpes de origem clínica	47
2.2. Perfil genotípico: estirpes de origem animal	48
2.3. Genes <i>bla</i> _{CTX-M}	50
3. Fenótipo vs Genótipo	52
3.1. Fenótipo vs Genótipo: estirpes de origem clínica	52
3.2. Fenótipo vs Genótipo: estirpes de origem animal	54
4. Transferência horizontal de genes	55
4.1. Conjugação	55
4.2. Transformação	55
4.3. Clonagem	55
5. β -lactamase CTX-M-166	56
6. CIMs enzimas CTX-M-1 e CTX-M-166	57
7. Propriedades bioquímicas da nova enzima CTX-M-166	58
7.1. Purificação das enzimas e avaliação da pureza por SDS-PAGE	58
7.2. Parâmetros cinéticos da enzima CTX-M-166	58
8. Mutagênese do gene <i>bla</i> _{CTX-M-15}	61
IV. Discussão	62
V. Conclusão	73
VI. Bibliografia	76

Índice de figuras

Figura 1: Esquema de ação dos antibióticos β -lactâmicos	4
Figura 2: Classificação dos antibióticos β -lactâmicos de acordo com a sua estrutura química ...	7
Figura 3: Representação do mecanismo de ação das β -lactamases que conduz à hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos	10
Figura 4: Representação das diferentes etapas do protocolo de mutagénesis	39
Figura 5: Representação gráfica da suscetibilidade diminuída, em percentagem, das estirpes de origem clínica (n=51) e animal (n=17), produtoras ou não de CTX-M	45
Figura 6: Diagrama com indicação dos genes detetados e identificados nas estirpes de origem clínica.....	47
Figura 7: Diagrama com indicação dos genes detetados e identificados nas estirpes de origem animal.....	49
Figura 8: Estrutura 3D da enzima CTX-M-166.....	56
Figura 9: Correlação entre a velocidade inicial de hidrólise da penicilina G pela enzima parental CTX-M-1 e o volume de inibidor utilizado.....	60
Figura 10: Correlação entre a velocidade inicial de hidrólise da penicilina G pela enzima CTX-M-166 e o volume de inibidor utilizado.....	60

Índice de tabelas

Tabela 1: Lista de antibióticos utilizados na realização do TSA organizados por classes	27
Tabela 2: Lista de <i>primers</i> utilizados na detecção de genes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos	29
Tabela 3: Lista de <i>primers</i> utilizados na detecção de genes de resistência às fluoroquinolonas	30
Tabela 4: Lista de <i>primers</i> utilizados para sequenciar os diferentes genes estudados	32
Tabela 5: <i>Primers</i> degenerados utilizados para a mutagênese do gene <i>bla</i> _{CTX-M-15}	40
Tabela 6: Suscetibilidade de estirpes de origem clínica e animal.....	44
Tabela 7: Percentagem de estirpes multirresistentes	46
Tabela 8: Perfis genotípicos das 51 estirpes de origem clínica.....	48
Tabela 9: Perfis genotípicos das 17 estirpes de origem animal.....	50
Tabela 10: Mutações aminoacídicas (e nucleotídicas) identificadas nas sequências das β -lactamases AmpC	50
Tabela 11: Mutações aminoacídicas (e nucleotídicas) identificadas nas sequências das β -lactamases (e genes que as codificam) do grupo 1.....	51
Tabela 12: Mutações aminoacídicas (e nucleotídicas) identificadas nas sequências das β -lactamases (e genes que as codificam) do grupo 9.....	51
Tabela 13: Perfis de resistência aos antibióticos dos 51 isolados de <i>E. coli</i> de origem humana, associados aos genótipos e enzimas detetadas em cada isolado.....	53
Tabela 14: Perfis de resistência aos antibióticos dos 17 isolados de <i>E. coli</i> de origem animal, associados aos genótipos e enzimas detetadas em cada isolado.....	54
Tabela 15: Resultados dos testes de suscetibilidade realizados com as células <i>E. coli</i> TOP10 transformadas com os genes <i>bla</i> _{CTX-M-1} e <i>bla</i> _{CTX-M-166}	57
Tabela 16: Parâmetros cinéticos e respectivos desvios-padrão para as β -lactamases CTX-M-1 e CTX-M-166.....	59
Tabela 17: Valores de IC ₅₀ para as enzimas CTX-M-1 e CTX-M-166, para os inibidores de β -lactamases ácido clavulânico e tazobactame	61

Lista de abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARN – Ácido ribonucleico

ARSIP – *Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal*

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – Adenosina trifosfato

6-APA – Ácido 6-amino-penicilânico

7-ACA – Ácido 7-amino-cefalosporânico

CA-SFM – *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*

CIM – Concentração inibitória mínima

EARS-Net – *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*

EDTA – Ácido etilenodiamina tetra-acético

ESAC – *Extended-spectrum AmpC beta-lactamases* / beta-lactamases AmpC de espectro estendido

ESAC-Net – *European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network*

ESBL – *Extended-spectrum beta-lactamases* / beta-lactamases de espectro estendido

et al. – *et alia*, e outras pessoas

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

IC₅₀ – Concentração inibitória de 50% de atividade

IRS – *Inhibitor Resistant SHV*

IRT – *Inhibitor Resistant TEM*

IS - *Insertion Sequence*

k_{cat} – Constante de atividade catalítica

K_m – Constante de Michaelis

LNR-RA/IACS – Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde

MBL – Metalo beta-lactamase

MDR – *Multiple drug resistance*

MFP – *Membrane Fusion Protein*

OEP – *Outer membrane Efflux Protein*

OMP – *Outer Membrane Protein*

PCR – *Polymerase chain reaction*

PLP – Proteínas de ligação à penicilina

PMA β – *Plasmid-mediated AmpC beta-lactamase*

PMQR – *Plasmid-mediated quinolone resistance*

rARN – Ácido ribonucleico ribossômico

SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TSA – Teste de suscetibilidade aos antibióticos

V_{max} – Velocidade máxima da reação

I-Introdução

1. Os antibióticos

Os antibióticos são agentes químicos utilizados para prevenir ou combater infecções bacterianas, tendo a capacidade de eliminar estes microrganismos ou de impedir o seu crescimento e multiplicação, sem produzir efeitos tóxicos para o homem ou para os animais. Estes compostos podem ter uma origem natural, sendo, maioritariamente, produzidos por fungos e bactérias, ou uma origem totalmente sintética. De acordo com a sua atividade, os antibióticos podem ser divididos em bactericidas, se a sua ação provoca a morte bacteriana, ou em bacteriostáticos, se apenas inibem a multiplicação e o crescimento destes microrganismos (Kohanski et al., 2010). Em relação às infecções virais, estas drogas são totalmente ineficazes, podendo mesmo ser prejudiciais. Os antibióticos ou antibacterianos são uma das classes de um grupo mais amplo, o dos antimicrobianos, onde estão também englobados os antivirais, os antifúngicos e os antiparasitários, que têm ação em vírus, fungos e parasitas, respetivamente. Os antibióticos atuam em diferentes géneros e espécies bacterianas e possuem mecanismos de ação distintos, de acordo com a classe a que pertencem, podendo exercer ação sobre a síntese da parede bacteriana, a síntese proteica e a síntese de ácidos nucleicos, e ainda provocar alterações membranares e ter atividade antimetabólica (Kohanski et al., 2010).

2. Problemática da resistência aos antibióticos

A resistência antimicrobiana conduz ao aumento da morbidade, da mortalidade, do período de hospitalização e dos custos de tratamento (Bisht et al., 2009; Hawkey e Jones, 2009; Davies e Davies, 2010). Este problema não é de agora, mas o número de microrganismos resistentes, a prevalência de resistência simultânea de uma bactéria a vários antibióticos e a sua dispersão geográfica nunca foram tão elevadas. Doenças e agentes infecciosos que já estiveram controlados por antibióticos têm ressurgido com resistência a esses mesmos antibióticos. O grande alerta para esta questão é o facto de a tendência atual apontar para que a resistência aos antibióticos continue a aumentar (Levy e Marshall, 2004; Hawkey e Jones, 2009). Tem sido documentado um aumento de bactérias resistentes, causando infeções adquiridas na comunidade, indicando que o problema da resistência deixou de estar confinado aos hospitais e passou a ser um problema mais abrangente (Levy e Marshall, 2004; Bisht et al., 2009). Muitas bactérias patogénicas para o Homem desenvolveram multirresistências aos antibióticos (*MDR-multi drug resistant* – resistência a três ou mais antibióticos estruturalmente diferente) como resultado do uso destas substâncias e, em particular do seu uso excessivo e

inapropriado, que se observa, nomeadamente, em países em desenvolvimento, onde o seu acesso é facilitado. (Levy e Marshall, 2004; Bisht et al., 2009; Davies e Davies, 2010).

Sendo o uso dos antibióticos uma das principais causas deste problema tem sido observado um maior consumo de antibióticos *per capita* em países que têm maiores taxas de resistência. A globalização e a movimentação constante de pessoas são também causas importantes da disseminação da resistência aos antibióticos, através de mecanismos de transferência horizontal de genes, contribuindo diretamente para a dispersão de estirpes com novos genes de resistência como, por exemplo *bla*_{CTX-M}. Os argumentos apresentados para os antibióticos usados em medicina humana aplicam-se, igualmente, aos antibióticos utilizados em medicina veterinária (Bisht et al., 2009; Hawkey e Jones, 2009).

3. Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos são a classe de antibióticos mais amplamente utilizada. Neste grupo, incluem-se as penicilinas, as cefalosporinas de 1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 5ª geração, os carbapenêmes, os monobactames e os inibidores de β -lactamases. Apesar de possuírem características distintas, todos estes antibióticos apresentam, na sua estrutura, um anel β -lactâmico, o que é, em certa medida, responsável pelo facto de apresentarem características químicas e mecanismos de ação semelhantes (Fernandes et al., 2013). Assim, todos os antibióticos β -lactâmicos desempenham a sua atividade antibacteriana promovendo a inibição da síntese de parede celular bacteriana (Figura 1) (Bush, 2012). Mais concretamente, é inibida a síntese da camada de peptidoglicano da parede celular. Os alvos primários dos antibióticos β -lactâmicos são as PLPs (Proteínas de Ligação à Penicilina); ligando-se a estas covalentemente, bloqueiam a sua ação essencial na catálise das ligações cruzadas dos polímeros de peptidoglicano (ligações interpeptídicas), ação necessária à formação da parede. Esta ligação ocorre porque as moléculas dos antibióticos funcionam como análogos da região terminal do dipéptido D-Ala-D-Ala do peptidoglicano (Kohanski et al., 2010). Após ligação às PLPs ocorre a acilação da serina presente no sítio ativo das enzimas, o que resulta na sua inativação, conduzindo assim ao bloqueio da reação de transpeptidação (Kohanski et al., 2010; Bush, 2012). As PLPs, que englobam as carboxipeptidases, as endopeptidases e as transpeptidases, apresentam diferentes afinidades para os vários antibióticos β -lactâmicos (Kohanski et al., 2010; Kong et al., 2010).

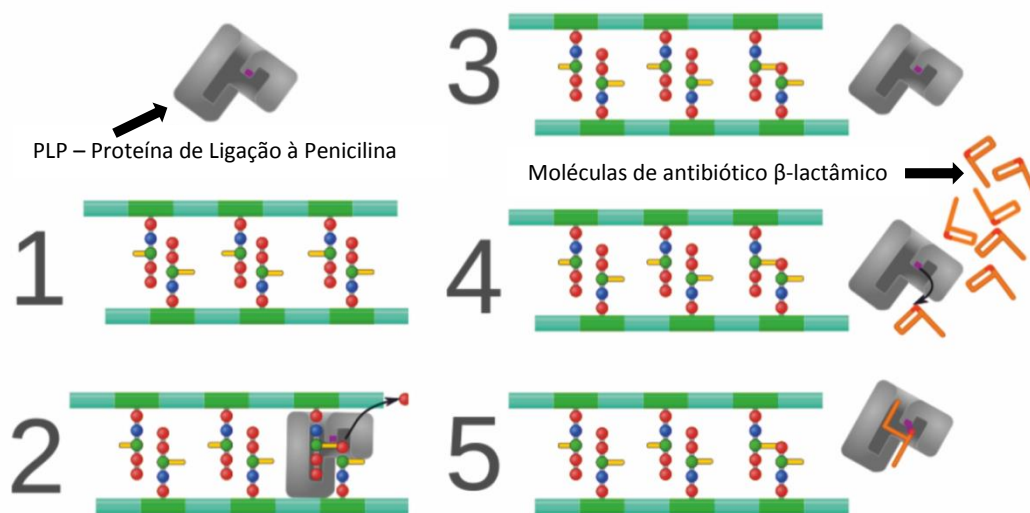


Figura 1: Esquema de ação dos antibióticos β -lactâmicos. ● – D-alanina; ● – D-glutamato; ● – L-lisina. Os números de 1 a 5 correspondem à ordem dos acontecimentos. Adaptado de Siddheshwar et al., 2013.

A penicilina, descoberta em 1928 por Alexander Fleming, foi o primeiro antibiótico β -lactâmico a ser descoberto. Atualmente, existem vários grupos de penicilinas, sendo que todas têm como base a penicilina original, a penicilina G. Os grupos existentes são as penicilinas naturais (penicilina G e penicilina V), as penicilinas resistentes a penicilinases (oxacilina, cloxacilina e dicloxacilina), as aminopenicilinas (amoxicilina e ampicilina) e as penicilinas anti-*Pseudomonas* ou de espectro-estendido (ticarcilina e piperacilina). O segundo grupo, penicilinas resistentes a penicilinases, não apresenta um espectro de ação muito alargado, mas é específico e eficaz contra bactérias produtoras da enzima β -lactamase, as quais são resistentes aos outros grupos de penicilinas (Gupta e Lakhe, 2010; Fernandes et al., 2013; Masoud et al., 2014).

Em relação às cefalosporinas, estas estão agrupadas da 1ª à 5ª geração, de acordo com o seu espectro de ação, sendo aí observado, sequencialmente, um aumento da atividade contra bactérias de Gram-negativo (Gupta e Lakhe, 2010; Fernandes et al., 2013; Masoud et al., 2014). As cefalosporinas de 1ª geração são maioritariamente ativas em cocos aeróbios de Gram-positivo, tendo uma atividade bastante limitada contra bactérias de Gram-negativo. As cefalosporinas de 2ª geração, têm um espectro de ação mais alargado sobre as bactérias de Gram-negativo, mantendo-se a mesma atividade em relação a bactérias de Gram-positivo. No que toca às cefalosporinas de 3ª geração, apesar de apresentarem uma menor ação sobre cocos de Gram-positivo, em relação às gerações referidas anteriormente, têm um espectro de ação muito mais alargado em bactérias de Gram-negativo, incluindo *Pseudomonas* spp.,

possuindo também uma maior capacidade de resistência às β -lactamases. As cefalosporinas de 4ª geração possuem ainda um espectro de ação mais alargado, e menor possibilidade de ser alvo da ação de β -lactamases, atuando tanto em bactérias de Gram-positivo, como de Gram-negativo; tal tem permitido uma utilização crescente destas cefalosporinas. Por fim, as cefalosporinas de 5ª geração apresentam, tal como as anteriores, um espectro de ação que engloba bactérias de Gram-positivo e Gram-negativo, visando, especialmente, estirpes resistentes às cefalosporinas da 1ª à 4ª geração (Gupta e Lakhe, 2010; Fernandes et al., 2013; Masoud et al., 2014).

Outro importante grupo de antibióticos β -lactâmicos é o dos carbapenêmes. Estes antibióticos apresentam um espectro de ação alargado entre bactérias de Gram-positivo, bactérias de Gram-negativo e ainda organismos anaeróbios, sendo os mais abrangentes de entre todos os antibióticos β -lactâmicos. Adicionalmente, têm a característica de poder atuar em bactérias produtoras de β -lactamases, que não sejam carbapenemases, mantendo a sua atividade bactericida. (Drawz e Bonomo, 2010; Papp-Wallace et al., 2011; Fernandes et al., 2013).

Os monobactames têm o seu espectro de ação restringido, maioritariamente, a bactérias de Gram-negativo, sendo um grupo pouco ativo em bactérias de Gram-positivo e bactérias anaeróbias. Ao contrário dos outros antibióticos β -lactâmicos, os monobactames não induzem a atividade de β -lactamases, sendo resistentes a estas enzimas (Fernandes et al., 2013; Masoud et al., 2014).

Por fim, importa referir os inibidores de β -lactamases que, atuando isoladamente, apresentam pouca atividade antimicrobiana mas, quando associados com outros antibióticos, têm a capacidade de diminuir a CIM (Concentração Inibitória Mínima) dessas mesmas drogas. A utilização destes inibidores é uma das estratégias utilizadas para contornar o problema da resistência mediada por β -lactamases. A ação inibitória pode dar-se por duas vias: ligação reversível de elevada afinidade do inibidor à β -lactamase, criando interações desfavoráveis ao seu correto funcionamento; ou ligação irreversível do inibidor à enzima, que fica permanentemente inativa devido a reações químicas secundárias que ocorrem no seu sítio ativo. Um exemplo de um inibidor que estabelece uma ligação irreversível é o ácido clavulânico que, quando em associação com a amoxicilina, aumenta a sua atividade antibiótica. Uma vez neutralizada a ação das β -lactamases, os antibióticos β -lactâmicos associados ao inibidor podem desempenhar a sua ação (Drawz e Bonomo, 2010).

3.1. Estrutura dos antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos têm como principal mecanismo de resistência a produção de β -lactamases. Estas enzimas hidrolisam o anel β -lactâmico presente na estrutura destes antibióticos e, assim, impedem a sua ação antibacteriana (Drawz e Bonomo, 2010; Fernandes et al., 2013).

Este anel β -lactâmico é constituído por três átomos de carbono e um átomo de azoto. Em todos estes antibióticos, com exceção dos monobactames, este anel está conjugado com outro, resultando em estruturas bicíclicas (Fernandes et al., 2013; Siddheshwar et al., 2013). O sistema bicíclico, formado pelo anel β -lactâmico e por um segundo anel, é essencial para o funcionamento destes antibióticos, uma vez que mimetiza o resíduo terminal D-Ala-D-Ala da cadeia de peptidoglicano (Guimarães et al., 2010).

De acordo com o tipo de anel presente na estrutura dos antibióticos, estes vão ser classificados em (Figura 2): (1) Penames, carbapenames e clavames, se for um anel saturado, com 5 membros; (2) Penémes e carbapenémes, se for um anel insaturado, com 5 membros; (3) Cefemes, carbacefemes e oxacefemes, se for um anel insaturado, com 6 membros. A variação na classificação, dentro do mesmo tipo de anel, depende dos elementos constituintes do anel e das cadeias laterais. A diferença entre penames, carbapenames e clavames está no elemento presente na posição 1 do anel, que é enxofre, carbono e oxigénio, respetivamente. Em relação à distinção entre penémes e carbapenémes, esta deve-se à presença de um átomo de enxofre ou de carbono, respetivamente, na posição 1 do anel insaturado. Por fim, cefemes, carbacefemes e oxacefemes têm um átomo de enxofre, carbono e oxigénio, respetivamente, na posição 1 do anel insaturado de 6 membros. Cada anel confere características específicas a cada grupo de antibióticos β -lactâmicos. Dentro de cada grupo, as modificações estruturais das cadeias laterais conferem propriedades distintas aos antibióticos. As alterações estereoquímicas das cadeias laterais modulam a estabilidade em meio ácido, a resistência às β -lactamases e ainda o espectro da ação antibacteriana dos antibióticos (Guimarães et al., 2010; Siddheshwar et al., 2013).

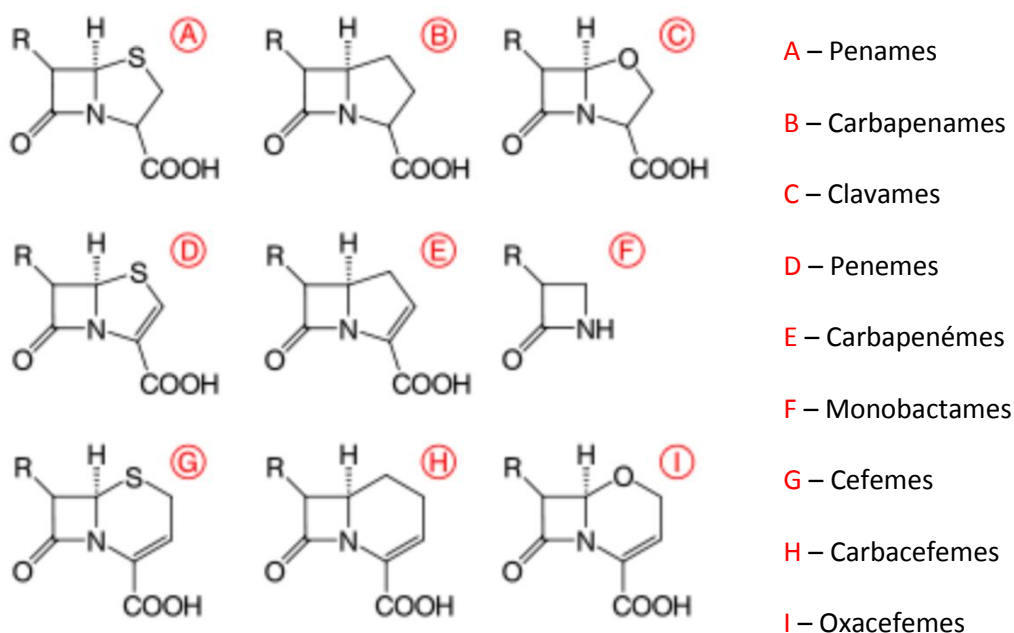


Figura 2: Classificação dos antibióticos β -lactâmicos de acordo com a sua estrutura química. A – Penames; B – Carbapenames; C – Clavames; D – Penémes; E – Carbapenés; F – Monobactames; G – Cefemes; H – Carbacefemes ; I – Oxacefemes. Adaptado de Siddheshwar et al., 2013.

Globalmente, as penicilinas são compostos derivados do ácido 6-amino-penicilânico (6-APA), que possuem o anel β -lactâmico fundido com o anel tiazolidina. No que diz respeito aos inibidores de β -lactamases, todos são derivados do 6-APA, mas o ácido clavulânico pertence ao grupo dos clavames, com um anel oxazolidina, e os outros inibidores de β -lactamases, como o tazobactame e o sulbactame, pertencem ao grupo dos penames, tal como as penicilinas. Em relação às cefalosporinas, estas são derivadas do ácido 7-amino-cefalosporânico (7-ACA), tendo na sua estrutura o anel di-hidrotiazina ligado ao anel β -lactâmico. Por fim, os monobactames são antibióticos β -lactâmicos monocíclicos, cujo núcleo β -lactâmico difere do 6-APA e do 7-ACA (Guimarães et al., 2010; Kong et al., 2010; Fernandes et al., 2013; Siddheshwar et al., 2013).

3.2. Mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos

A resistência aos antibióticos é um fenómeno que pode surgir como resposta da bactéria à presença de antibióticos. Deste modo, os microrganismos passam a ser capazes de sobreviver perante a ação destes compostos. Contudo, aquela resistência pode ser uma característica intrínseca. A resistência pode manifestar-se através de vários mecanismos que, não sendo exclusivos, podem ocorrer em simultâneo. Para além disso, podem existir estirpes multirresistentes. Esta temática é crucial, pois ameaça a prevenção e o tratamento eficazes de

uma vasta gama de infeções causadas por bactérias (Bisht et al., 2009; Davies e Davies, 2010; Guimarães et al., 2010).

3.2.1. Por produção de β -lactamases

A inativação de antibióticos β -lactâmicos por β -lactamases representa o mais importante mecanismo de resistência com relevância clínica em bactérias de Gram-negativo. Este mecanismo está associado a algumas das infeções bacterianas mais graves nos dias de hoje, em particular quando estamos na presença de bactérias de Gram-negativo produtoras de ESBLs (β -lactamases de espectro estendido) ou carbapenemases. O problema da resistência por ação destas enzimas é agravado pelo facto de muitos antibióticos β -lactâmicos serem utilizados, preferencialmente, no tratamento de diversas doenças infecciosas (Jacoby e Munoz-Price, 2005; Bush e Jacoby, 2010; Bush, 2013). A partir do momento em que os antibióticos β -lactâmicos passaram a ser utilizados com fins terapêuticos, observou-se um aumento drástico da prevalência e da variedade de β -lactamases. Contudo, e apesar desta co-evolução entre antibióticos e resistência ser um acontecimento recente, a inativação enzimática de compostos β -lactâmicos é um mecanismo que existe há milhões de anos (Jacoby e Munoz-Price 2005; D'Costa et al., 2011; Bush, 2013). Devido à rápida evolução e diversificação observada ao nível da resistência a antibióticos por produção de β -lactamases, existem, atualmente, mais de 1300 variantes conhecidas destas enzimas hidrolíticas (www.lahey.org/Studies).

Assim, houve necessidade de organizar esta grande variedade de β -lactamases utilizando uma nomenclatura bem definida. Estas enzimas podem ser classificadas, de acordo com a sua estrutura primária e sequência nucleotídica, nas 4 classes moleculares de Ambler (de A a D) (Jacoby e Munoz-Price, 2005; Drawz e Bonomo, 2010; Papp-Wallace et al., 2011). Em relação à classificação estrutural, as β -lactamases podem ser divididas em dois grupos, de acordo com o aminoácido presente no sítio ativo: as metalo- β -lactamases (MBLs) e as serina- β -lactamases. As MBLs, que englobam apenas a classe B, requerem a presença de um ou dois íons de zinco no sítio ativo para hidrolisar o anel β -lactâmico. As serina- β -lactamases, que incluem as classes A, C e D, hidrolisam o anel β -lactâmico por intermédio do sítio ativo com o aminoácido serina (Jacoby e Munoz-Price, 2005; Bush e Jacoby, 2010; Papp-Wallace et al., 2011; Bush, 2013).

As quatro classes moleculares de β -lactamases podem ainda ser divididas, de acordo com Bush e Jacoby (2010), em grupos funcionais, os quais se baseiam na sua capacidade em hidrolisar antibióticos β -lactâmicos e no seu perfil de inibição pelos inibidores de β -lactamases. (Bush e Jacoby, 2010; Bush, 2013). A classe molecular C está associada aos subgrupos

funcionais 1 e 1e, que incluem cefalosporinas e, como tal, hidrolisam cefalosporinas apresentando, maioritariamente, resistência aos inibidores de β -lactamases, em especial ao ácido clavulânico. Enzimas do grupo 1, quando produzidas em grandes quantidades, podem conferir resistência a carbapenêmes, em particular ao ertapeneme. O subgrupo 1e inclui β -lactamases ESAC (β -lactamases AmpC de espectro estendido), e é formado por variantes do grupo 1, originadas a partir de substituições, inserções ou deleções na sua sequência, apresentando uma maior capacidade de hidrólise das cefalosporinas, como a ceftazidima (Bush e Jacoby, 2010; Bush, 2013).

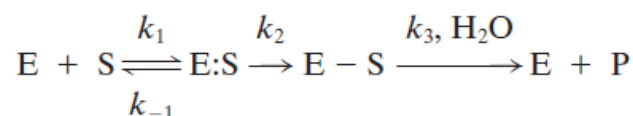
O grupo funcional 2, que inclui as classes moleculares A e D, representa o maior e mais abrangente grupo de β -lactamases. Subdividido em vários subgrupos, o grupo 2 possui enzimas com a capacidade de hidrolisar, globalmente, todas as classes de antibióticos β -lactâmicos. Os seus subgrupos mais importantes são o subgrupo 2be, que engloba as ESBLs, e o subgrupo 2f, das carbapenemases com sítio ativo serina, que serão revistos em detalhe em pontos ulteriores. Uma vez que têm potencial para hidrolisar todas as classes de antibióticos β -lactâmicos, as enzimas destes dois subgrupos, quando co-expressas pela mesma bactéria, congregam várias resistências, o que constitui um grave problema no tratamento de doenças infecciosas (Bush e Jacoby, 2010; Bush, 2013).

No último grupo funcional, o grupo 3, estão englobadas as MBLs (classe molecular B). Inicialmente, destacavam-se pela capacidade de hidrolisar carbapenêmes, capacidade essa que é, como já vimos, agora partilhada por algumas β -lactamases de sítio ativo serina. Este é também um grupo de enzimas com bastante interesse clínico, uma vez que conseguem hidrolisar todas as classes de antibióticos β -lactâmicos, à exceção dos monobactames, em relação aos quais possui fraca capacidade hidrolítica. Ao contrário do que acontece com as carbapenemases de sítio ativo serina, estas enzimas não são inibidas por nenhuma das combinações de inibidores de β -lactamases utilizadas atualmente, sendo inibidos apenas por agentes quelantes de metais como, por exemplo, o EDTA (ácido etilenodiamina tetra-acético) (Bush e Jacoby, 2010; Drawz e Bonomo, 2010; Bush, 2012; Bush, 2013).

3.2.1.1. Atividade hidrolítica das β -lactamases

A atividade das β -lactamases em relação aos antibióticos pode ser avaliada através da determinação de constantes cinéticas, analisando a reação de hidrólise dos antibióticos. Assim, a partir dos valores destas constantes, é possível inferir a capacidade de determinada enzima em conferir resistência aos antibióticos.

A reação enzimática da qual resulta a hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos por parte das β -lactamases é representada pela seguinte equação:



Na equação, E é a β -lactamase, S é o antibiótico, E:S é o complexo de Michaelis (não covalente), E-S é o complexo covalente acil-enzima, e P é o antibiótico degradado, isto é, sem atividade antibacteriana. A Figura 3 ilustra o mecanismo de ação das β -lactamases, descrito anteriormente.

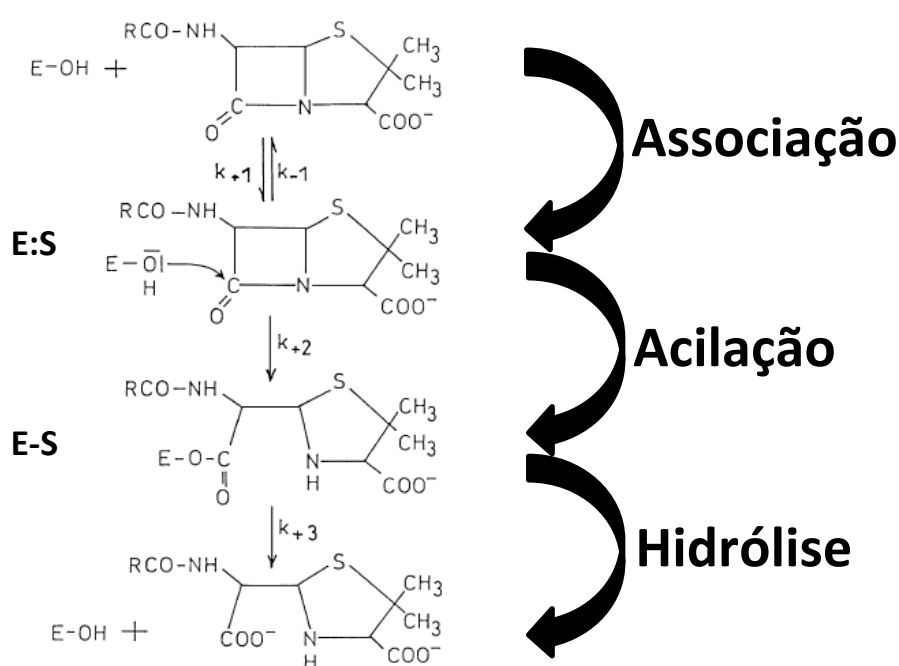


Figura 3: Representação do mecanismo de ação das β -lactamases que conduz à hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos. Adaptado de Matagne et al. (1998).

As constantes de velocidade k_1 e k_{-1} representam, respetivamente, a associação e dissociação do complexo pré-acilação (E:S). Por sua vez, k_2 representa a constante de velocidade de acilação e k_3 representa a constante de velocidade de desacilação (Drawz e Bonomo, 2010). O complexo covalente acil-enzima (E-S) resulta do ataque nucleofílico ao átomo de carbono do grupo carbonilo presente no anel β -lactâmico por parte do grupo hidroxilo da cadeia lateral do sítio ativo da enzima (Matagne et al, 1998). Após hidrólise do anel β -lactâmico, a enzima fica livre, podendo inativar outras moléculas de antibiótico.

As constantes cinéticas V_{max} (velocidade máxima da reação), K_m (constante de Michaelis), k_{cat} (constante de atividade catalítica) e K_{cat}/K_m (eficiência catalítica) são definidas por:

$$K_m = k_3 K_S / (k_2 + k_3), \quad \text{onde } K_S = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

$$K_{cat} = k_2 k_3 / (k_2 + k_3)$$

$$V_{max} = K_{cat} [E]$$

3.2.1.2. ESBLs - β -lactamases de espectro-estendido

O principal mecanismo de resistência às oximino-cefalosporinas, das bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, é a produção de ESBLs. Atualmente, este grupo de enzimas constitui uma das maiores preocupações em termos de resistência aos antibióticos. Tal deve-se ao facto destas β -lactamases, para além de conferirem resistência a penicilinas e cefalosporinas de largo espectro, terem a capacidade de hidrolisar cefalosporinas de espectro alargado ou estendido, como os monobactames (aztreoname) e cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima, ceftazidima, cefpodoxima, ceftriaxona e ceftiofur) e 4ª geração (cefepima) (Drawz e Bonomo, 2010; Cantón et al., 2012; D'Andrea et al., 2013; Fernandes et al., 2013).

As enzimas descritas com fenótipo ESBL, são exclusivas do grupo 2, e são, na sua maioria, variantes das famílias TEM, SHV, CTX-M, GES e VEB, sendo estas duas últimas menos comuns. A família OXA também integra o grupo das ESBLs, mas pertence ao subgrupo 2de, sendo englobada na classe D de Ambler. As ESBLs das famílias TEM, SHV, e OXA tiveram origem em mutações pontuais ocorridas nos genes plasmídicos parentais bla_{TEM-1} , bla_{TEM-2} , bla_{SHV-1} e bla_{OXA-10} . Ao contrário destas, as β -lactamases CTX-M tiveram origem na mobilização de genes bla cromossomais de *Kluyvera* spp., através da sua incorporação em elementos genéticos móveis (Bush e Jacoby, 2010; Drawz e Bonomo, 2010; Cantón et al., 2012; D'Andrea et al., 2013).

A família CTX-M, contrariamente às famílias TEM e SHV, é bastante heterogénea, incluindo cinco grupos principais: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 (D'Andrea et al., 2013; Fernandes et al., 2013; Shaikh et al., 2015). Cada grupo de CTX-M é constituído por variantes alélicas. No entanto, a sua maioria pertence ao grupo 1 e 9, o que sugere que estes grupos apresentem maior capacidade de adaptação. Fatores que contribuem para esta heterogeneidade são, por exemplo, o facto de cada grupo de CTX-M derivar de diferentes espécies de *Kluyvera* spp. e de poder ter origem em eventos de disseminação/mobilização diferentes ou mesmo em processos microevolutivos ocorridos após a mobilização/integração (Cantón et al., 2012; D'Andrea et al., 2013).

As β -lactamases CTX-M são assim denominadas devido às suas propriedades funcionais, uma vez que possuem uma forte atividade cefotaximase. Assim, esta família de ESBLs é caracterizada por ter uma maior eficiência catalítica à cefotaxima do que a qualquer outro antibiótico oximino- β -lactâmico (Bush e Jacoby, 2010; D'Andrea et al., 2013; Fernandes et al., 2013; Shaikh et al., 2015). O eficiente reconhecimento e hidrólise da cefotaxima dependem, para além de um ambiente eletrostático particular, da flexibilidade do centro catalítico, que conduz a cefotaxima em direção ao sítio ativo da enzima. É também importante referir a suscetibilidade das β -lactamases CTX-M aos inibidores de β -lactamases convencionais, tais como o tazobactame e o ácido clavulânico. Tal como estes inibidores, os carbapenêmes são estáveis na presença destas enzimas. (D'Andrea et al., 2013; Fernandes et al., 2013).

3.2.1.3. Carbapenemases

Carbapenemases, são β -lactamases com a capacidade de hidrolisar carbapenêmes, que estão distribuídas por 3 classes moleculares: as pertencentes à classe A, as MBLs, pertencentes à classe B e as OXA-carbapenemases, pertencentes à classe D (Walsh, 2010; Rolain e Cornaglia, 2014).

As carbapenemases da classe molecular A pertencem ao subgrupo funcional 2f, podendo ser divididas em cinco famílias principais, de acordo com a sua filogenia: GES, IMI, KPC, NMC-A e SME. Para além de hidrolisarem carbapenêmes, estas β -lactamases podem conferir resistência a cefalosporinas, a penicilinas e ao aztreoname, mas são inibidas por inibidores de β -lactamases. Clinicamente, o grupo mais importante é o das KPC, pois estas enzimas estão associadas a infeções causadas por bactérias de Gram-negativo multirresistentes, muitas vezes na origem de surtos clínicos (Bush e Jacoby, 2010; Drawz e Bonomo, 2010; Walsh, 2010; Diene e Rolain, 2014).

Tendo como base a homologia entre sequências, as carbapenemases da classe molecular D podem ser divididas em diferentes grupos: OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-72 e OXA-143. Em relação ao subgrupo funcional, todas estas carbapenemases pertencem ao subgrupo 2df (Bush e Jacoby, 2010; Walsh, 2010). Contrariamente a outros grupos de carbapenemases, este grupo não apresenta grande atividade hidrolítica contra cabapenêmes. Ao invés disso, baseia-se em mecanismos sinérgicos, como bombas de efluxo, sendo desta forma capaz de produzir resistência a carbapenêmes. Algumas destas enzimas apresentam resistência aos inibidores de β -lactamases (Bush e Jacoby, 2010; Drawz e Bonomo, 2010; Walsh, 2010). Dentro das carbapenemases da família OXA, a OXA-48 apresenta baixa atividade hidrolítica aos carbapenêmes, mas em associação com outros mecanismos de resistência pode

determinar altos níveis de resistência a estes antibióticos (Bush e Jacoby, 2010; Walsh, 2010; Diene e Rolain, 2014).

Por fim, o último grupo de carbapenemases, e de grande importância, são as MBLs que são frequentemente encontradas em *Enterobacteriaceae*. Estas são das carbapenemases com maior diversidade molecular e que representam uma das maiores ameaças clínicas. Ao contrário das carbapenemases da classe A e D, as MBLs são resistentes aos inibidores de β -lactamase (ácido clavulânico e tazobactame), mas inibidas por quelantes de metais (Bush e Jacoby, 2010; Walsh, 2010). Esta resistência deve-se ao mecanismo único de hidrólise utilizado por estas enzimas. No seu sítio ativo, possuem um ou dois íons de zinco que vão coordenar e apresentar íons de água polarizados para o ataque oxianiónico ao anel β -lactâmico. Este mecanismo é clinicamente relevante uma vez que não se formam intermediários covalentes, isto é, as carbapenemases não se ligam fisicamente ao antibiótico, impossibilitando, assim, que os inibidores de β -lactamases atuem (Drawz e Bonomo, 2010; Walsh, 2010).

3.2.1.4. Resistência aos inibidores de β -lactamases

Os principais inibidores de β -lactamases utilizados com fins clínicos são o ácido clavulânico, o tazobactame e o sulbactame; todos apresentam, principalmente, especificidade às β -lactamases da classe A (Shlaes, 2013). Com o uso mais frequente das associações de inibidores de β -lactamases com um antibiótico β -lactâmico, como a amoxicilina-ácido clavulânico, ticarcilina-ácido clavulânico e ampicilina-sulbactame, não tardaram a aparecer β -lactamases resistentes aos inibidores, tais como as IRTs (β -lactamases TEM resistentes a inibidores). Um estudo efetuado em hospitais de Madrid revelou que, de entre as estirpes de *Escherichia coli* resistentes à amoxicilina, cerca de 20-30% eram co-resistentes ao ácido clavulânico (Drawz e Bonomo, 2010; Bush, 2013).

O fenótipo de resistência aos inibidores de β -lactamases pode resultar, principalmente, da produção de β -lactamases não suscetíveis à ação dos inibidores ou da hiperprodução dessas enzimas. Em relação ao primeiro caso, temos o exemplo das MBLs, cujo mecanismo de resistência foi abordado no ponto anterior sobre carbapenemases. No que diz respeito à hiperprodução de β -lactamases, esta pode ser mediada por mutações na região do promotor do gene *bla* e/ou resultar do elevado número de plasmídeos, com o gene *bla*, presentes nas bactérias. Ambos os casos já foram observados com enzimas da variante TEM-1 (Drawz e Bonomo, 2010).

Adicionalmente, foi demonstrado que as IRTs podem adquirir resistência aos inibidores de β -lactamases através de mutações nucleotídicas no ADN que codifica aminoácidos no sítio

ativo da enzima. Para além das IRTs, foram já identificadas as IRSs (SHV β -lactamases resistentes a inibidores), que conferem resistência a amoxicilina-ácido clavulânico e, possivelmente, ao sulbactame e tazobactame. Contudo, e apesar do aumento de casos de enzimas IR (resistentes aos inibidores) não pertencentes às famílias TEM e SHV, as ESBLs da família CTX-M ainda não evidenciaram resistência significativa aos inibidores de β -lactamases (Drawz e Bonomo, 2010). De salientar que a capacidade das carbapenemases KPC-2 resistirem à ação dos inibidores pode representar a possibilidade de aparecimento de uma nova classe de enzimas IR da classe molecular A. Este problema é agravado pela propagação recente, a nível mundial, destas β -lactamases (Drawz e Bonomo, 2010).

3.2.2. Por alteração de porinas

As bactérias de Gram-negativo, em comparação com bactérias de Gram-positivo, são intrinsecamente menos permeáveis aos antibióticos devido à presença da membrana externa. Assim, um dos mecanismos de resistência aos antibióticos utilizados pelas bactérias baseia-se em modificações na permeabilidade da membrana externa, sendo estas alcançadas através de alterações ou perda de porinas, como é o caso da OmpF e OmpC, em *E. coli*, e da OprD, em *P. aeruginosa* (Giedraitienė et al., 2011; Blair et al., 2015). A membrana externa das bactérias de Gram-negativo é constituída por fosfolípidos e lípido A; os antibióticos podem ser transferidos para o interior das células por difusão direta através da bicamada ou por difusão através das porinas. A via de entrada vai depender da composição química dos antibióticos. Assim, pequenas moléculas hidrofílicas, como os antibióticos β -lactâmicos, passam a membrana externa através de porinas (Drawz e Bonomo, 2010; Giedraitienė et al., 2011). A redução da permeabilidade é alcançada pelo aparecimento de mutações e pela inserção de elementos genéticos móveis nos genes que codificam as porinas ou nas sequências que regulam a sua expressão. Estes eventos podem ser responsáveis pela produção de porinas com menor atividade/maior seletividade e pela sub-regulação das porinas, respetivamente (Drawz e Bonomo, 2010; Blair et al., 2015).

Contudo, este mecanismo de resistência, atuando isolado, nem sempre é capaz de produzir um fenótipo de resistência, sendo um mecanismo que atua em simultâneo com β -lactamases. No entanto, a redução da permeabilidade contribui significativamente para a resistência aos antibióticos (Drawz e Bonomo, 2010; Blair et al., 2015).

3.2.3. Por ação de bombas de efluxo

Bombas de efluxo são proteínas membranares que exportam ativamente os antibióticos para fora da célula, de forma a manterem baixas concentrações destas drogas no seu interior. Estas bombas podem ser específicas para determinados antibióticos. Porém, a sua maioria tem a capacidade de exportar antibióticos de várias classes, sendo designadas por bombas de efluxo que conferem multirresistência. Assim, este tipo de mecanismo de resistência contribui, de forma significativa, para o desenvolvimento de multirresistência aos antibióticos. (Giedraitienė et al., 2011; Blair et al., 2015).

Existem dois tipos de bombas de efluxo: as bombas dependentes de ATP e as bombas de transporte secundário, movidas por uma força motriz protónica (PMF – *Proton Motive Force*). Há quatro famílias de bombas que usam força motriz protónica: RND (*Resistance Nodulation Division*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), SMR (*Small Multidrug Resistance*) e MATE (*Multidrug and Toxic Compounds Extrusion*). A única família de bombas de efluxo que usa a energia da hidrólise do ATP é a ABC (*ATP-binding cassette*) (Bockstael e Aerschot, 2009; Fernandes et al., 2013).

As bombas RND são as mais estudadas em bactérias de Gram-negativo. Quando sobre-expressas, produzem níveis de multirresistência clinicamente relevantes. Estas bombas têm três componentes: uma bomba localizada na membrana citoplasmática da bactéria, auxiliada por uma proteína de fusão de membrana (MFP – *Membrane Fusion Protein*), a qual se estende pelo espaço periplasmático, e está ligada a uma proteína de efluxo na membrana externa (OEP – *Outer membrane Efflux Protein*) (Fernandes et al., 2013; Blair et al., 2015). Estas três proteínas formam um complexo com a capacidade de transportar substratos do interior para o exterior da célula bacteriana. Os exemplos melhor caracterizados são os complexos AcrAB-TolC e MexAB-OprM, presentes, respetivamente em *E. coli* e *P. aeruginosa*. Nestas, AcrB e MexB são as proteínas presentes na membrana citoplasmática, o AcrA e MexA são as MFP e as proteínas TolC e OprM são as OEP. Em *P. aeruginosa*, foi ainda demonstrado que uma bomba de efluxo semelhante, o complexo MexEF-OprN, tem como substrato os inibidores de β -lactamases (Fernandes et al., 2013; Blair et al., 2015). Desta forma, mutações que diminuem a expressão ou a atividade de uma das proteínas constituintes destes complexos provocam uma maior suscetibilidade das bactérias aos antibióticos. Pelo contrário, mutações que contribuam para a sua sobre-expressão, contribuem para a resistência aos antibióticos (Bockstael e Aerschot, 2009; Fernandes et al., 2013).

3.2.4. Por alteração das PLPs (Proteínas de Ligação à Penicilina)

A interação entre antibióticos e moléculas-alvo é um processo extremamente específico. Como tal, qualquer modificação na estrutura da proteína alvo, por mais pequena que seja, vai influenciar o processo de ligação do antibiótico. No entanto, desde que permitam manter o seu funcionamento normal, podem contribuir para um fenótipo de resistência a esse mesmo antibiótico (Giedraitienė et al., 2011; Blair et al., 2015).

A redução da afinidade dos antibióticos às PLPs pode acontecer por diferentes motivos. Uma das razões é o aparecimento de mutações nos genes que codificam as PLPs, induzindo modificações estruturais que impedem a correta ligação do antibiótico (Blair et al., 2015). O MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina) é o exemplo mais bem conhecido deste mecanismo. A presença do gene *mecA* codifica a proteína PLP2a, responsável por conferir o fenótipo de resistência à meticilina. Esta proteína é uma transpeptidase, que atua na síntese do peptidoglicano, sendo diferente da produzida endogenamente por *S. aureus*. Desta forma, a PLP2a está associada a uma forte resistência a antibióticos β -lactâmicos, assegurando a síntese da parede celular na presença de uma concentração de antibiótico, supostamente, letal, o que apenas é possível devido à manutenção da atividade enzimática da PLP2a, uma vez que esta, estando mutada, não se liga aos antibióticos (Drawz e Bonomo, 2010; Fernandes et al., 2013). Pode também haver redução da afinidade através da proteção/modificação da proteína alvo, sem a necessidade de haver mutação nos genes codificantes do alvo. Um exemplo deste mecanismo é a metilação do gene que codifica o 16S rARN de forma a alterar o sítio de ligação e impedindo, assim, a ligação dos antibióticos (Blair et al., 2015).

4. Classes de antibióticos não β -lactâmicos e principais mecanismos de resistência

Os antibióticos podem ser classificados com base em diferentes critérios, entre os quais se destacam os seus mecanismos de ação, espectros de ação e estruturas químicas. Uma vez que antibióticos com estruturas químicas semelhantes apresentam também padrões de atividade, efetividade e toxicidade semelhantes, este é o critério de classificação mais utilizado, e segundo o qual serão enumeradas as várias classes de antibióticos no presente trabalho. Existem diferentes tipos de antibióticos que, apesar da sua diversidade, podem ser agrupados num reduzido número de classes. De entre as grandes classes de antibióticos, encontram-se os aminoglicosídeos, as tetraciclina, as quinolonas e as fluoroquinolonas, os glicopeptídeos, os macrólidos e as lincosamidas. De destacar ainda as sulfonamidas, as rifampicinas e o cloranfenicol (Bockstael e Aerschot, 2009; INSA, 2010).

Dentro da classe dos aminoglicosídeos, destacamos a amicacina, a gentamicina e a tobramicina devido à sua relevância clínica (Lambert, 2012). A atividade bactericida destas drogas resulta da sua ligação à subunidade 30S do ribossoma, que conduz à inibição da síntese proteica. O principal mecanismo de resistência a estes antibióticos passa pela sua modificação através de enzimas produzidas pelas bactérias, tendo sido já descritos mecanismos de eliminação do antibiótico para o exterior da célula e de redução da permeabilidade ao antibiótico. (Kotra et al., 2000; Lambert, 2012).

Tal como acontece com os aminoglicosídeos, as tetraciclina como, por exemplo, a doxiciclina, ligam-se à subunidade 30S do ribossoma, inibindo a síntese proteica. Contudo, estes antibióticos apresentam uma atividade bacteriostática (Kohanski et al., 2010). Os principais mecanismos de resistência às tetraciclina são a eliminação destas drogas para fora da célula através de bombas de efluxo, e através de mutações no 16S rARN (Lambert, 2012).

A classe que engloba quinolonas e fluoroquinolonas inibe a transcrição e a replicação de ADN através da sua interferência com o correto funcionamento da ADN girase (topoisomerase II) e da topoisomerase IV. Os mecanismos de resistência a esta classe de antibióticos englobam a diminuição da permeabilidade, o aumento do efluxo, a inativação enzimática e ainda a diminuição da afinidade dos alvos (Kohanski et al., 2010; Cambau e Guillard, 2012).

As rifamicinas também impedem a transcrição, mas através da inibição da síntese de ARN, que ocorre por ligação direta do antibiótico à ARN polimerase. Nos mecanismos de resistência incluem-se modificações no alvo, inativação enzimática e ação de bombas de efluxo (Cambau e Guillard, 2012). Por sua vez, as sulfonamidas inibem a síntese de purinas e pirimidinas através do bloqueio da produção de ácido fólico. A resistência a esta classe de antibióticos dá-se pela redução da permeabilidade e pela expressão de bombas de efluxo (Cambau e Guillard, 2012).

Os antibióticos pertencentes à classe dos glicopeptídeos, entre os quais se encontra a vancomicina, apresentam uma atividade bactericida que se manifesta pela inibição da síntese da parede celular bacteriana. Os mecanismos de resistência a estes compostos passam pela diminuição da sua afinidade aos alvos, resultante da síntese de peptidoglicano por vias alternativas; o outro mecanismo observado é o espessamento da parede celular (Bockstael e Aerschot, 2009; Bush, 2012).

Por fim, as classes dos macrólidos e das lincosamidas que, apesar de serem estruturalmente distintas, apresentam semelhanças funcionais. Ambas as classes inibem a síntese proteica através da ligação à subunidade 50S do ribossoma, sendo este mesmo mecanismo utilizado pelo cloranfenicol. Os mecanismos de resistência a estes antibióticos são 3: a alteração do sítio de ligação, quer através de metilação quer de mutações no 23S rARN; o

efluxo dos antibióticos, por ação de bombas de efluxo; a inativação enzimática direta dos antibióticos. Estes mecanismos não são exclusivos, podendo ocorrer em simultâneo (Leclercq, 2002; Lambert, 2012).

5. Epidemiologia de determinantes de resistência a antibióticos em humanos e animais

5.1. CTX-M

Há décadas que a resistência a antibióticos é tida como um problema de saúde global. Contudo, recentemente, as ESBLs da família CTX-M têm apresentado uma difusão muito eficaz, não se limitando aos ambientes clínicos e abrangendo a comunidade, pecuária, e animais de companhia e selvagens (Drawz e Bonomo, 2010; Cantón et al., 2012; Bush, 2013; D'Andrea et al., 2013). As enzimas CTX-M têm substituído outras famílias de ESBLs, incluindo variantes das famílias TEM e SHV. As enzimas CTX-M são atualmente as ESBLs com maior prevalência num contexto global (Cantón et al., 2012; D'Andrea et al., 2013). A disseminação explosiva dos últimos anos é referida na literatura como a “pandemia das CTX-M” e, desta forma, é nesta família de ESBLs que incide o presente estudo (Cantón et al., 2012).

Dentro da família CTX-M, verificou-se uma alteração do grupo que predominava inicialmente. Se o grupo 2 dos CTX-M foi responsável pelo aparecimento e disseminação desta família, atualmente são as enzimas CTX-M do grupo 1 e 9 que predominam (Cantón et al., 2012; D'Andrea et al., 2013). Apesar de génotipos específicos de CTX-M serem endémicos de determinadas regiões geográficas, verifica-se que são as variantes CTX-M-14 (grupo 9) e CTX-M-15 (grupo 1) as mais prevalentes e mais disseminadas, tanto no reservatório humano como no reservatório animal (Hawkey e Jones, 2009; Cantón et al., 2012; Bush, 2013; Shaikh et al., 2015).

A presença destas ESBLs já foi detetada em várias bactérias de Gram-negativo, mas verifica-se que a maioria dos problemas clínicos se deve a enzimas CTX-M produzidas por *E. coli* e *K. pneumoniae*. Por exemplo, em Portugal observa-se uma prevalência elevada de *E. coli* produtoras de CTX-M em doentes que fazem hemodiálise (Correia et al., 2012; D'Andrea et al., 2013), sendo que infeções sanguíneas causadas por estas bactérias podem apresentar taxas de mortalidade de 20-30% (D'Andrea et al., 2013). Apesar disto, verificou-se, num estudo realizado na Alemanha, que a taxa de mortalidade não difere entre infeções sanguíneas causadas por *E. coli* produtoras e não-produtoras de ESBLs. Este mesmo estudo revelou um aumento significativo do número das infeções causadas por *E. coli* produtoras de ESBLs (Leistner et al., 2014). Adicionalmente, estas enzimas são as mais prevalentes em infeções do

trato urinário, sendo que a estirpe multirresistente de *E. coli* ST131 produtora de CTX-M-15 tem aí emergido, globalmente.

Outro facto preocupante é, por exemplo, a prevalência de isolados de *E. coli* produtores de ESBLs em pessoas saudáveis ter aumentado cerca de dez vezes entre 2006 e 2011, em França. O mesmo tipo de evolução foi também já descrito noutras zonas urbanas como, por exemplo, na Bolívia (D'Andrea et al., 2013).

No que diz respeito ao reservatório animal de genes de resistência a antibióticos, uma das maiores preocupações é a sua transmissão aos humanos, a qual pode ocorrer através de contacto direto ou indireto (Marshall e Levy, 2011). É importante destacar a enzima CTX-M-1 que, na Europa, é a variante mais frequentemente associada a animais da cadeia alimentar. Globalmente, tem-se verificado o aumento de estirpes de *E. coli* produtoras de ESBLs em animais saudáveis e em produtos alimentares de origem animal (Ramos et al., 2013).

Existem várias evidências de transmissão animal-homem de resistência a antibióticos. Apesar da transmissão por contacto direto não estar completamente esclarecida, a transmissão por consumo de alimentos contaminados já é mais fácil de associar a uma população afetada (Clemente et al., 2013). Infeções causadas por *Salmonella enterica* através da ingestão de alimentos, na sua grande maioria, de origem animal, têm, muitas vezes, envolvido genes que codificam ESBLs. Adicionalmente, esta transmissão ao homem pode ser uma via para outros patógenos humanos adquirem resistência a antibióticos (Clemente et al., 2013). Temos ainda o exemplo de um surto recente de origem alimentar, o qual se deveu a *K. pneumoniae* produtora de CTX-M-15 (D'Andrea et al., 2013).

Os acontecimentos aqui referidos evidenciam a importância que a cadeia alimentar tem na disseminação de ESBLs, em especial, os alimentos de origem animal, enfatizando a necessidade da implementação de uma monitorização contínua dos mecanismos de resistência.

5.2. Carbapenemases

Nos últimos anos observou-se um aumento de casos reportados para a presença de carbapenemases, verificando-se o aumento da sua prevalência em *Enterobacteriaceae*. Por esta razão, a sua relevância clínica tem vindo a crescer exponencialmente, com especial incidência no grupo das MBLs em detrimento das carbapenemases das classes A e D, apesar da sua disseminação global (Walsh, 2010; Rolain e Cornaglia, 2014).

As carbapenemases da família KPC já foram encontradas em hospitais nos Estados Unidos da América, Europa e China, com a característica de serem dificilmente eliminadas,

mesmo com aplicação de políticas restritivas de controlo de infeção (Bush, 2013). As carbapenemases KPC-2 e KPC-3 são as variantes predominantes a nível global, sendo a variante KPC-2 a mais prevalente entre as *Enterobacteriaceae* (Walsh, 2010; Djahmi et al., 2014).

Das carbapenemases de classe D, a variante OXA-48 é claramente a mais disseminada. A região mais problemática em relação a esta variante é a zona do Mediterrâneo, onde já foram identificados vários surtos causados por estirpes produtoras desta enzima (Walsh, 2010; Djahmi et al., 2014; Rolain e Cornaglia, 2014).

Contudo, a maior preocupação, no presente, é a emergência de MBLs em *Enterobacteriaceae*. Inicialmente, estas carbapenemases estavam confinadas a *P. aeruginosa*, tendo-se alastrado, recentemente, às *Enterobacteriaceae*. As MBLs podem ser divididas em 5 grupos principais: IMP, VIM, GIM, SIM e NDM. Os grupos IMP e VIM são os que apresentam maior diversidade, tendo 53 e 46 variantes, respetivamente (www.lahey.org/Studies/). As enzimas do grupo VIM são as mais prevalentes em isolados clínicos, em especial a variante VIM-2, que é a variante dominante (Walsh, 2010; Djahmi et al., 2014; Rolain e Cornaglia, 2014).

O grupo das NDM é o mais recente, mas apresenta já 16 variantes (www.lahey.org/Studies/). Atualmente, a enzima NDM-1 é uma das que requer maior atenção, devido à sua grande capacidade de dispersão, sendo a América Central e América do Sul as únicas regiões onde esta enzima não foi identificada, e ao facto de isolados com esta enzima apresentarem valores de CIM elevados aos carbapenemes em bactérias de Gram-negativo. (Walsh, 2010; Djahmi et al., 2014; Diene e Rolain, 2014). Mantendo a velocidade de disseminação observada atualmente, prevê-se que esta enzima se torne global. Inclusive, há a hipótese de adquirir uma importância semelhante à variante CTX-M-15 (Walsh, 2010).

As enzimas KPC são, principalmente, encontradas em isolados de *K. pneumoniae* de origem nosocomial. Por sua vez, as enzimas NDM e OXA-48 são identificadas tanto em isolados nosocomiais como comunitários de *E. coli* e *K. pneumoniae* (Rolain e Cornaglia, 2014). No que diz respeito ao reservatório animal, as carbapenemases são alvo de pouca investigação, o que se deve, principalmente, ao facto do uso veterinário de carbapenemes não ser licenciado em nenhum país do Mundo. Contudo, animais de companhia estão em condições propícias para receberem genes de resistência aos carbapenemes provenientes de humanos, tendo já sido identificada, por exemplo, uma estirpe de *K. pneumoniae* portadora da variante OXA-48 em vários cães de uma clínica veterinária (Woodford et al., 2014).

Os aspetos discutidos, para as ESBLs, em relação à transmissão animal-homem da resistência a antibióticos e da monitorização de alimentos de origem animal são aplicados, da mesma forma, às carbapenemases.

Uma vez que as opções terapêuticas para o tratamento de infeções provocadas por bactérias produtoras de carbapenemases são limitadas, políticas de prevenção de infeção são a melhor opção para evitar o alastramento destas infeções (Rolain e Cornaglia, 2014). Estas políticas de prevenção são fundamentais uma vez que estas infeções estão associadas a altas taxas de morbilidade e mortalidade, assim como prolongados tempos de internamento e, conseqüente, aumento de custos. Num estudo recente, realizado numa unidade de cuidados intensivos, verificou-se que doentes colonizados com *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases têm, em média, 1,79 vezes maior risco de mortalidade do que doentes não colonizados por estas bactérias (Dautzenberg et al., 2015).

5.3. PMA β (*Plasmid-Mediated AmpC β -lactamases*)

As PMA β s já foram identificadas em isolados nosocomiais e comunitários, tendo a primeira sido descrita em 1989 (Jacoby, 2009). Existem 9 famílias principais: ACC, ACT, CFE, CMY, DHA, FOX, LAT, MIR e MOX. A maior família é a CMY, com um total de 136 variantes. As famílias LAT e CFE apenas têm uma variante (www.lahey.org/Studies/). Algumas destas enzimas são muito similares às enzimas parentais cromossómicas e, como tal, são acompanhadas por genes reguladores, podendo ser induzidas, embora a maioria não o seja (Jacoby e Munoz-Price, 2005; Jacoby, 2009). Tal como as AmpC cromossómicas, as PMA β s conferem resistência às oximino cefalosporinas, penicilinas e algumas ao aztreoname. Além disso, são resistentes à inibição pelo ácido clavulânico (Jacoby e Munoz-Price, 2005; Jacoby, 2009).

Os plasmídeos onde se encontram os genes que codificam as AmpC, muitas vezes incluem genes que codificam outras β -lactamases e ainda genes de resistência para outras famílias de antibióticos, como por exemplo, aminoglicosídeos e sulfonamidas (Jacoby, 2009).

5.4. PMQRs (*Plasmid-Mediated Quinolone Resistance*)

Até ao final da década de 90, pensava-se que os únicos mecanismos de resistência às fluoroquinolonas eram a acumulação de mutações nos genes cromossómicos das enzimas alvo destes antibióticos (ADN girase e topoisomerase IV) e a redução da concentração intracelular destas drogas, quer pelo aumento do efluxo, quer pela diminuição de permeabilidade (Poirel

et al., 2012a; Guan et al., 2013). Apenas recentemente se descobriu a capacidade de determinados mecanismos de resistência serem transferidos através de plasmídeos, dando origem ao termo PMQR (*Plasmid-mediated Quinolone Resistance*). Estes mecanismos incluem a produção de proteínas Qnr, a produção da variante da aminoglicosídeo-acetiltransferase (AAC(6′)-Ib-cr) e a produção das bombas de efluxo QepA e OqxAB (Poirel et al., 2012a). As proteínas Qnr são constituídas pela repetição de um pentapéptido, portanto, caracterizam-se por repetirem 5 aminoácidos em tandem. Estas proteínas atuam através da proteção das enzimas alvo das fluoroquinolonas, impedindo que estas desempenhem a sua ação (Robicsek et al., 2006; Poirel et al., 2012a). A proteína AAC(6′)-Ib-cr atua através da modificação direta dos antibióticos, concretamente, através da acetilação desses compostos (Poirel et al., 2012a; Guan et al., 2013). As bombas de efluxo QepA e OqxAB são transportadores dependentes de força motriz protónica, e pertencem às famílias MFS e RND, respetivamente (Poirel et al., 2012a).

Estes genes disseminam-se através de diferentes plasmídeos, os quais variam, entre si, no tamanho e no grupo de incompatibilidade; muitos destes plasmídeos contêm genes de resistência a outros antibióticos, contribuindo, portanto, para fenótipos de multirresistência (Strahilevitz et al., 2009; Poirel et al., 2012a). Desta forma, a resistência às fluoroquinolonas, que até agora se pensava ser apenas transmitida verticalmente, pode também ser transmitida horizontalmente. É de destacar ainda que estes genes não estão apenas presentes em isolados de origem humana, mas também se encontram presentes em isolados animais e ambientais (Poirel et al., 2012a).

6. Disseminação de β -lactamases através de elementos genéticos móveis

A resistência a antibióticos ou, mais concretamente, os genes que conferem resistência por produção de β -lactamases, como é o caso das ESBLs da família CTX-M, das PMA β s e das carbapenemases, pode ser transmitida e disseminada através de elementos genéticos móveis. Estes elementos incluem plasmídeos, transposões, integrões e sequências de inserção (IS – *Insertion Sequence*). Os genes *bla*_{CTX-M}, assim como os genes *bla* que codificam carbapenemases, encontram-se usualmente em plasmídeos, podendo também estar inseridos no cromossoma bacteriano (Walsh, 2010; D'Andrea et al., 2013).

Os genes *bla* (CTX-M e PMA β s) estão associados, normalmente, a duas IS, a *ISEcp1* ou a *ISCR1*, ambas com capacidade de mobilizar segmentos de ADN adjacentes (Jacoby, 2009; Cantón et al., 2012; D'Andrea et al., 2013). Algumas destas IS, como a *ISCR1*, para além de permitirem a mobilização dos genes *bla*, vão também ser responsáveis pela sua sobre-

expressão. Em relação aos genes *bla*_{CTX-M}, a *ISEcp1* é a sequência de maior relevância na sua mobilização e disseminação (Cantón et al., 2012; D'Andrea et al., 2013). Devido à eficiência da mobilização dos genes *bla*, estes têm rapidamente sido disseminados pelos diferentes grupos de plasmídeos circulantes em *Enterobacteriaceae*. Por exemplo, a disseminação pandémica do gene que codifica a variante CTX-M-15 está associada a plasmídeos IncFII. Outra consequência resultante da disseminação dos genes *bla* é a transmissão clonal de algumas espécies de bactérias, como *E. coli* e *K. pneumoniae*, as quais contribuem para a disseminação global destas β -lactamases.

A disseminação dos genes *bla* pode, adicionalmente, ser mediada por fagos. A associação entre genes *bla* e sequências de ADN de fagos ilustra a importância dos bacteriófagos na difusão e na propagação destas β -lactamases (Cantón et al., 2012; D'Andrea et al., 2013).

A disseminação das carbapenemases ocorre através de mecanismos semelhantes ao que acontece para os genes *bla*. A propagação destas enzimas pode ocorrer através da disseminação clonal de determinadas espécies bacterianas ou através de plasmídeos, estando o primeiro mecanismo principalmente associado a *Acinetobacter* e o segundo a *Enterobacteriaceae*. (Bush e Jacoby, 2010; Walsh, 2010). O facto dos genes *bla*_{KPC} se encontrarem presentes em plasmídeos móveis contribui decisivamente para que estas enzimas se tornassem o grupo dominante dentro das carbapenemases da classe molecular A (Drawz e Bonomo, 2010; Diene e Rolain, 2014).

7. Objetivos

- a) Identificar a β -lactamase da família CTX-M mais frequente em isolados clínicos de origem humana e em estirpes de origem veterinária, provenientes de coleções representativas da realidade nacional; a β -lactamase em causa será denominada CTX-M-tipo.
- b) Caracterizar uma nova β -lactamase CTX-M: CTX-M-166.
 - a. Compreender este novo mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos proveniente de um isolado de origem veterinária, e a possibilidade da sua disseminação a outros reservatórios, nomeadamente o humano.
 - b. Avaliar a estrutura-função da nova enzima, de forma a compreender de que modo a nova mutação poderá contribuir para o mecanismo de hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos.
- c) Prever o potencial evolutivo das enzimas CTX-M em conferir hidrólise dos antibióticos, nomeadamente os utilizados mais eficazmente contra bactérias produtoras de β -lactamases da família CTX-M e, a partir da criação de mutantes do gene *bla*_{CTX-M} prevalente, mapear as novas mutações identificadas.

II-Material e Métodos

1. Isolados bacterianos estudados

O presente estudo incluiu um total de 68 isolados bacterianos de *E. coli* de origem clínica (n=51) e de origem veterinária (n=17). Os isolados clínicos, foram selecionados a partir da coleção do Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (LNR-RA/IACS) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSARJ), sendo provenientes de diferentes produtos biológicos colhidos em 2014.

Em relação às estirpes veterinárias, foram todas isoladas em 2014, a partir do ceco de animais saudáveis de aviário, para consumo, nomeadamente, frango (n=11) e peru (n=6).

A estirpe ATCC *E. coli* 25922 foi utilizada como controlo durante os testes de suscetibilidade aos antibióticos. As estirpes *E. coli* J₅₃ NaN_{3R} e *E. coli* C600 Rif_R, resistentes à azida e à rifampicina, respetivamente, foram usadas como estirpes isogénicas no processo de conjugação. Adicionalmente, utilizaram-se as células bacterianas competentes One Shot®TOP10 e XL 1-Blue fornecidas pelos kits de clonagem e mutagénesis, respetivamente, que serão devidamente descritos ao longo do capítulo Material e Métodos.

2. Caracterização fenotípica

2.1. Teste de suscetibilidade aos antibióticos

Para todos os 68 isolados estudados, foi realizado o teste de suscetibilidade aos antibióticos (TSA), por difusão em disco. Em primeiro lugar, os isolados foram semeados em meio seletivo e diferencial de MacConkey para averiguar a sua pureza, sendo posteriormente inoculada uma colónia isolada de cor rosa, lac-positiva, em meio de gelose simples. Para preparação de uma suspensão bacteriana com turvação de 0,5 na escala de McFarland (*DEN-1B McFarland Densitometer, Grant Bio*), foram ressuspendidas entre uma a três colónias num total de 2 ml de soro fisiológico estéril. De seguida, procedeu-se à inoculação, por espalhamento, de duas placas quadradas (120 mm x 120 mm) com *Muller-Hinton* agar, utilizando uma zaragatoa. Por fim, aplicaram-se 32 discos de antibiótico (*Biorad*) com auxílio de dispensadores (16 discos por placa) (Tabela 1).

Após incubação das placas numa estufa a 37°C, durante 16 horas, os halos de inibição, sinergias e antagonismos foram analisados no aparelho *ADAGIO™ Antimicrobial Susceptibility Testing System (Biorad)*. Os resultados obtidos foram interpretados de acordo com os diâmetros críticos (*breakpoints*) estabelecidos pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2014)*. A leitura interpretativa dos antibiogramas permitiu

predizer determinados mecanismos de resistência como, por exemplo, a presença de ESBLs ou PMA β s. Isolados suscetíveis à cefoxitina e/ou apresentando sinergia com o ácido borônico e/ou cloxacilina foram considerados possíveis produtores de AmpCs, enquanto que a presença de ESBLs foi inferida pela presença de sinergia entre cefalosporinas de 3ª geração e o ácido clavulânico (Manageiro et al., 2015b).

Tabela 1: Lista de antibióticos utilizados na realização do TSA organizados por classes.

Classe de antibiótico	Antibiótico	Breakpoints (mm)	Conteúdo do disco (μ g)
Penicilinas (β -lactâmicos)	Ampicilina	S: ≥ 14 ; R: < 14	10
	Amoxicilina + Ácido clavulânico	S: ≥ 19 ; R: < 19	20+10
	Piperacilina	S: ≥ 20 ; R: < 17	30
	Piperacilina + tazobactame	S: ≥ 20 ; R: < 17	30+6
	Ticarcilina + ácido clavulânico	S: ≥ 23 ; R: < 23	75+10
Cefalosporinas (β -lactâmicos)	Cefepima	S: ≥ 24 ; R: < 21	30
	Cefotaxima	S: ≥ 20 ; R: < 17	5
	Cefoxitina	S: ≥ 19 ; R: < 19	30
	Cefpodoxima	S: ≥ 21 ; R: < 21	10
	Ceftarolina	S: ≥ 23 ; R: < 23	5
	Ceftazidima	S: ≥ 22 ; R: < 19	10
	Ceftriaxona	S: ≥ 23 ; R: < 20	30
	Cefuroxima	S: ≥ 18 ; R: < 18	30
Monobactames (β -lactâmicos)	Aztreoname	S: ≥ 24 ; R: < 21	30
Carbapenêmes (β -lactâmicos)	Doripeneme	S: ≥ 24 ; R: < 21	10
	Ertapeneme	S: ≥ 25 ; R: < 22	10
	Imipeneme	S: ≥ 22 ; R: < 16	10
	Meropeneme	S: ≥ 22 ; R: < 16	10
Aminoglicosídeos	Amicacina	S: ≥ 18 ; R: < 15	30
	Gentamicina	S: ≥ 17 ; R: < 14	10
	Tobramicina	S: ≥ 17 ; R: < 14	10
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	S: ≥ 22 ; R: < 19	5
	Levofloxacina	S: ≥ 22 ; R: < 19	5
	Ofloxacina	S: ≥ 22 ; R: < 19	5
Glicilciclina	Tigeciclina	S: ≥ 18 ; R: < 15	15
Inibidores do metabolismo do ácido fólico (Sulfonamidas)	Trimetoprim + Sulfametoxazol	S: ≥ 16 ; R: < 13	1,25+ 23,75

Cada antibiótico tem indicado a carga, em μ g, utilizada por disco, assim como o respectivo *breakpoint* clínico, em mm, de acordo com o EUCAST (2014) para o método de difusão em disco (S, Suscetível; R, Resistente).

3. Caracterização genotípica

A presença de genes de resistência a antibióticos (PMQRs, PMAβs e ESBLs) foi avaliada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), após leitura interpretativa dos antibiogramas.

3.1. Extração de ADN

Para a caracterização genotípica dos isolados clínicos e veterinários em estudo, foi primeiramente realizada a extração de ADN por fervura. Os isolados foram semeados em meio de gelose simples e incubados a uma temperatura de 37°C, *overnight*. Posteriormente, uma quantidade de colónias correspondente a uma ansa de 10 µL foi ressuspensa, de determinada cultura, em 750 µL de água bidestilada estéril. Esta suspensão foi centrifugada durante 5 minutos, a 10000 rpm, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi rejeitado e o *pellet* ressuspensa em 500 µL de água bidestilada estéril, seguido de nova centrifugação. O *pellet* foi, então, ressuspensa em 100 µL de água bidestilada estéril e fervido em banho-maria durante 15 minutos. De seguida, a suspensão foi centrifugada, nas mesmas condições, procedendo-se à recolha do sobrenadante, contendo o ADN, o qual foi guardado a -20°C.

3.2. Deteção de genes de resistência aos antibióticos

A pesquisa de genes que codificam ESBLs foi efetuada através de dois PCRs *multiplex* e um simples (Tabela 2): os genes *bla_{OXA}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *ampC* foram detetados por PCR *multiplex* (*multiplex* 1), assim como os genes *bla_{CTX-M}* do grupo 1, 2 e 9 (*multiplex* 2); os genes *bla_{CTX-M}* do grupo 8/25 foram detetados por PCR simples. O gene *ampC* está incluído no *multiplex* 1 por se tratar de um controlo interno da espécie *E. coli*. A presença de genes que codificam enzimas *AmpC* plasmídicas, como *bla_{ACT}*, *bla_{ACC}*, *bla_{CMY}*, *bla_{DHA}*, *bla_{FOX}*, *bla_{MIR}* e *bla_{MOX}*, foi determinada por dois PCRs, um simples, para o gene *bla_{ACT}*, e o *multiplex* 3, para os restantes genes. De igual forma os genes plasmídicos que conferem resistência a fluoroquinolonas, como *aac*, *qepA*, *oqxAB*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS*, foram detetados por dois PCRs, um simples para o gene *oqxAB*, e o *multiplex* 4 para os restantes genes (Tabela 3).

Todas as misturas de PCR foram constituídas de forma a perfazerem um volume final de 25 µl. As misturas pré-PCR foram preparadas em câmara de fluxo laminar (*LaminAir, Holten*), utilizando: tampão (10x, *Qiagen*), dNTPs (0,2mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP, *Roche Diagnostics*), MgCl₂ (25 mM, *Qiagen*), Q Solution (5x, *Qiagen*), água bidestilada, ADN Taq polimerase (5 unidades/µl, *Qiagen*), e *primers* específicos para cada gene a amplificar (Tabela 2).

e 3). O ADN foi, por último, adicionado à mistura de PCR, sendo de imediato iniciado o programa de amplificação específico no termociclador (C 1000™ Thermal Cycler, BioRad).

Tabela 2: Lista de *primers* utilizados na detecção de genes de resistência aos antibióticos β -lactâmicos.

	Gene	Designação <i>primer</i>	Sequência (5'→3')	T _a (°C)	Concentração (μM)	Posição (5'→3')
Multiplex 1	ampC	AmpCF	CCC-CGC-TTA-TAG-AGC-AAC-AA	59	0,2	157→176
		AmpCR	TCA-ATG-GTC-GAC-TTC-ACA-CC		0,2	791→772
	<i>bla</i> _{OXA}	OXAF	TAT-CTA-CAG-CAG-CGC-CAG-TG	59	0,2	929→948
		OXAR	CGC-ATC-AAA-TGC-CAT-AAG-TG		0,2	1127→1118
<i>bla</i> _{SHV}	SHVF	TCA-GCG-AAA-AAC-ACC-TTG	59	0,2	311→328	
	SHVR	TCC-CGC-AGA-TAA-ATC-ACC		0,2	782→764	
<i>bla</i> _{TEM}	P1	TAC-GAT-ACG-GGA-GGG-CTT-AC	59	0,2	959→978	
	P2	TTC-CTG-TTT-TTG-CTC-ACC-CA		0,2	282→262	
Multiplex 2	<i>bla</i> _{CTX-M-G1} ^a	MultiCTXMGP1_for	TTA-GGA-ART-GTG-CCG-CTG-YA	60	0,2	61→80
		MultiCTXMGP1-2_rev	CGA-TAT-CGT-TGG-TGG-TRC-CAT		0,2	748→728
	<i>bla</i> _{CTX-M-G2} ^a	MultiCTXMGP2_for	CGT-TAA-CGG-CAC-GAT-GAC	60	0,2	345→362
MultiCTXMGP1-2_rev		CGA-TAT-CGT-TGG-TGG-TRC-CAT	0,2		748→728	
<i>bla</i> _{CTX-M-G9}	MultiCTXMGP9_for	TCA-AGC-CTG-CCG-ATC-TGG-T	60	0,2	299→317	
	MultiCTXMGP9_rev	TGA-TTC-TCG-CCG-CTG-AAG		0,2	859→842	
<i>bla</i> _{CTX-M-G8/25} ^a	CTX-MG8/25_for	AAC-RCR-CAG-ACG-CTC-TAC	55	0,4	172→189	
	CTX-MG8/25_rev	TCG-AGC-CGG-AAS-GTG-TYA-T		0,4	497→479	
<i>bla</i> _{ACT}	ACTF	GAT-GAT-GAC-TAA-ATC-CCT-TTG-CTG	62	0,4	3→26	
	ACTR	AAA-TAC-GGT-ATG-CCG-CCT-C		0,4	1132→1114	
Multiplex 3	<i>bla</i> _{ACC}	ACCMF	AAC-AGC-CTC-AGC-AGC-CGG-TTA	64	0,08	861→881
		ACCMR	TTC-GCC-GCA-ATC-ATC-CCT-AGC		0,08	1206→1186
	<i>bla</i> _{CMY}	CITMF	TGG-CCA-GAA-CTG-ACA-GGC-AAA	64	0,08	337→357
		CITMR	TTT-CTC-CTG-AAC-GTG-GCT-GGC		0,08	798→778
	<i>bla</i> _{DHA}	DHAMF	AAC-TTT-CAC-AGG-TGT-GCT-GGG-T	64	0,08	258→279
		DHAMR	CCG-TAC-GCA-TAC-TGG-CTT-TGC		0,08	662→642
<i>bla</i> _{FOX}	FOXMF2	GGA-CTC-ATC-GCC-AGT-ATT-CCA-ACC	64	0,08	497→520	
	FOXMR2	AAC-TTC-AGC-AGA-TCC-GCC-GAA-C		0,08	764→743	
<i>bla</i> _{MIR}	EBCMF2	CAG-TTC-TGC-ATT-CGC-CGC-AC	64	0,08	9→30	
	EBCMR2	CAC-CTT-GTT-ATC-ACT-GCC-TCC-GAC		0,08	933→910	
<i>bla</i> _{MOX}	MOXMF	GCT-GCT-CAA-GGA-GCA-CAG-GAT	64	0,08	56→76	
	MOXMR	CAC-ATT-GAC-ATA-GGT-GTG-GTG-C		0,08	575→554	

^a Y=T ou C; R=A ou G; S=G ou C; D=A, G ou T.

T_a – temperatura de *annealing*.

Tabela 3: Lista de *primers* utilizados na detecção de genes de resistência às fluoroquinolonas.

Gene	Designação <i>primer</i>	Sequência (5'→3')	T _a (°C)	Concentração (μM)	Posição (5'→3')
oqxAB	oqxAF	AGA-GTT-CAA-AGC-CAC-GCT-G	64	0,4	1119→1137
	oqxBR	CTC-CTG-CAT-CGC-CGT-CAC-CA		0,4	2039→2020
qepA	qepA-F	GAA-CCG-ATG-ACG-AAG-CAC-AG	55	0,06	977→958
	qepA-R	CGT-CGT-TAA-AGC-ATT-CTT-GTC-C		0,06	-36→-15
aac	acc6Ib-5	TTG-CGA-TGC-TCT-ATG-AGT-GGC-TA	55	0,06	17→39
	acc6Ib-6	CTC-GAA-TGC-CTG-GCG-TGT-TT		0,06	498→479
qnrA	qnrA	GGC-TAT-GGA-TAT-TAT-TGA-TAA-AG	55	0,06	-4→19
	qnrB	CTA-ATC-CGG-CAG-CAC-TAT-TA		0,06	657→638
qnrB	qnrBF-Tw	CCT-GAG-CGG-CAC-TGA-ATT-TAT	55	0,06	102→122
	qnrBR-Tw	GTT-TGC-TGC-TCG-CCA-GTC-GA		0,06	510→491
qnrC	qnrCF2	AAC-GTA-CGA-TCA-AAT-TG	55	0,06	18→34
	qnrCR	TCC-ACT-TTA-CGA-GGT-TCT		0,06	578→561
qnrD	qnrDF	CGA-GAT-CAA-TTT-ACG-GGG-AAT-A	55	0,06	34→55
	qnrDR	AAC-AAG-CTG-AAG-CGC-CTG		0,06	615→598
qnrS	qnrSJF	ACG-ACA-TTC-GTC-AAC-TGC-AA	55	0,06	141→160
	qnrSJR	TAA-ATT-GGC-ACC-CTG-TAG-GC		0,06	557→538

T_a – temperatura de *annealing*.

Todos os programas de PCR utilizados na amplificação dos genes de resistência aos antibióticos apresentaram uma estrutura idêntica: um ciclo de desnaturação-hibridação-extensão, repetido trinta vezes, e duas etapas adicionais, sendo uma etapa inicial de desnaturação, a 94°C, de 5 minutos, e uma etapa final de extensão, a 72°C, de 10 minutos. Os programas de PCR diferiram entre si na duração das várias etapas e na temperatura de hibridação utilizada (Tabelas 2 e 3).

Após conclusão de cada reação de PCR, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose para averiguar a presença dos genes em estudo. O gel de agarose a 1,8% foi preparado com 100 ml de tampão TBE (Tris-borato-EDTA) 1x e 1,8 g de agarose (*Seakem® LE Agarose, Lonza, Rockland*). Ao gel foram ainda adicionados 3 μl de SYBR safe (*Invitrogen, Life Technologies*) para marcar os ácidos nucleicos. Nos poços do gel, foram aplicadas amostras de 6 μl de produto de PCR juntamente com 2 μl de tampão (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% xilencianol e 30% glicerol). Estas amostras foram corridas a 120 v durante 30 a 45 minutos, em tampão TBE 1x. A identificação do(s) gene(s) presentes nos produtos de PCR foi realizada por comparação do tamanho dos produtos (pb) com os controlos positivos presentes. Todas as reações de PCR englobaram um controlo positivo, por gene, e um controlo negativo.

3.3. Purificação dos produtos de PCR

Sempre que foi necessário a identificação do gene detetado por PCR, os produtos do respectivo PCR simples foram purificados, após utilização de *primers* externos de forma a possibilitar a sequenciação da totalidade do gene (Tabela 4). A reação de purificação tem por base a atividade de duas enzimas hidrolíticas, uma fosfatase alcalina e uma exonuclease (*ExoProStar, Illustra*). A fosfatase alcalina elimina os dNTPs em excesso, enquanto que a exonuclease remove *primers* residuais em cadeia simples, tal como qualquer ADN em cadeia simples que tenha sido produzido na reação de PCR. Cada reação de purificação foi realizada com 4 µl de ExoProStar e 10 µl do produto de PCR a purificar. Esta reação está dividida em duas fases, ambas realizadas no termociclador (*C 1000™ Thermal Cycler, BioRad*): incubação a 37°C, durante 15 min, promovendo a atividade das enzimas, e incubação a 80°C, durante 15 min, levando à inativação das mesmas. Terminada a reação de purificação, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1,8% (*Seakem® LE Agarose, Lonza, Rockland*), utilizando os produtos de PCR purificados, com o objetivo de averiguar a presença e estimar a concentração de ADN purificado.

3.4. Identificação dos genes de resistência aos antibióticos por sequenciação nucleotídica

Para a reação de sequenciação utilizou-se 1 µl de BigDye v1.1 (*Applied Biosystem*), que é uma mistura de pré-sequenciação, contendo ADN polimerase, dNTPs marcados com fluorocromos e tampões específicos, 0,4 µl de *primer* específico (Tabela 4), de acordo como o gene a sequenciar, 10 ng de ADN e a água bidestilada necessária para perfazer um volume final de 10 µl. A reação de sequenciação, realizada num termociclador (*C 1000™ Thermal Cycler, BioRad*), é constituída por 3 etapas, repetidas 29 vezes: desnaturação a 96°C, durante 10 segundos, seguida de hibridação a 56°C durante 5 segundos e, por último, a etapa de extensão, a 60°C, com a duração de 5 minutos. Terminada a sequenciação, os ADNs sequenciados foram encaminhados para a Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do INSA, onde foi realizada a remoção dos terminadores, por precipitação alcoólica, e a migração no sequenciador automático (*ABI PRISM 3100, Applied Biosystem*). Os eletroferogramas foram, posteriormente, analisados e interpretados através do *software Bionumerics© Applied Maths*.

Tabela 4: Lista de *primers* utilizados para sequenciar os diferentes genes estudados.

Gene	Designação <i>primer</i>	Sequência (5'→3')	T _a (°C)	Concentração (μM)	Posição (5'→3')
<i>bla</i> _{CTX-M-G1}	CTX-M-15i	GGA-ATC-TGA-CGC-TGG-GTA-AA	55	0,8	684→703
	CTX-M-15F	AGA-ATA-AGG-AAT-CCC-ATG-GTT		0,8	89→105
	CTX-M-1R	CCG-TTT-CCG-CTA-TTA-CAA		0,8	991→974
	CTX-M-15R	AC-CGT-CCG-TGA-CGA-TTT-TAG		0,8	973→954
	CTX-M-1F	ATG-GTT-AAA-AAA-TCA-CTG-CG		0,8	104→123
	CTX-M-R	CGA-TAT-CGT-TGG-TGG-TGC-CAT-A		0,8	851→830
<i>bla</i> _{CTX-M-G9}	CTX-M-9F	ATG-GTG-ACA-AAG-AGA-GTG-CAA-	55	0,8	58→79
	CTX-M-9R2	AGT-TAC-AGC-CCT-TCG-GCG-AT		0,8	935→916
	CTX-M-F	TTT-GCG-ATG-TGC-AGT-ACC-AGT-		0,8	308→330
	CTX-M-R	CGA-TAT-CGT-TGG-TGG-TGC-CAT-A		0,8	851→830
	CTX-M-G9-Rint	ACC-AGA-TCG-GCA-GGC-TTG-A		0,8	317→299
<i>bla</i> _{SHV}	SHV149p	CGC-TTC-TTT-ACT-CGC-CTT-TA	56	0,8	-50→-31
	SHV1059	TTA-GCG-TTG-CCA-GTG-CTC		0,8	861→844
	SHVi	GCT-GGT-TTA-TCG-CCG-ATA-AGA		1	671→691
	SHVR	TCC-CGC-AGA-TAA-ATC-ACC-A		1,2	782→764
	SHVF	TCA-GCG-AAA-AAC-ACC-TTG		1,2	311→328
<i>bla</i> _{TEM}	FIN	ATT-CTT-GAA-GAC-GAA-AGG-GC	56	0,4	0→19
	DEB	ATG-AGT-AAA-CTT-GGT-CTG-AC		0,4	1091→1072
	P2	TTC-CTG-TTT-TTG-CTC-ACC-CA		0,4	282→262
	P3	TGG-GTG-AGC-AAA-AAC-AGG-AA		0,4	75→56
	CLB	AAT-GAA-GCC-ATA-CCA-AAC-GA		0,4	502→521
<i>bla</i> _{CMY}	CMYG2F	TTA-CGG-AAC-TGA-TTT-CAT-G	56	0,8	-16→3
	CMYG2R	TCG-TCA-GTT-ATT-GCA-GC		0,8	1153→1137
	CIT-F	ATG-ATG-AAA-AAA-TCG-TTA-TGC		0,8	1→21
	CIT-R	TTG-CAG-CTT-TTC-AAG-AAT-GCG-C		0,8	1143→1122
<i>bla</i> _{DHA}	DHAMF	AAC-AGC-CTC-AGC-AGC-CGG-TTA	56	0,4	258→279
	DHMR	CCG-TAC-GCA-TAC-TGG-CTT-TGC		0,4	662→642
<i>aac</i>	Acc6Ib-5	TTG-CGA-TGC-TCT-ATG-AGT-GGC-	55	1	17→39
<i>qnrB</i>	QnrBF2	ATG-ACG-CCA-TTA-CTG-TAT-AA	49	0,8	-36→-17
	QnrBR2	CTA-ACC-AAT-CAC-CGC-GAT-GC		0,8	645→626
<i>ampC</i>	ESAC-R	AAA-AGC-GCA-GAA-AAG-GTC-CG	62,2	0,8	1176→1157
	ESACPR-F	AAG-GAC-TAC-TAG-CAA-GAC-GG		0,8	-218→-199

4. Caracterização do novo gene *bla*_{CTX-M-166}

4.1. Transferência de ADN plasmídico

4.1.1. Conjugação

Para a conjugação bacteriana, de forma a transferir o gene em estudo para uma estirpe isogénica, foram utilizadas duas estirpes recetoras: *E. coli* J₅₃ NaN_{3R} (lac +) e *E. coli* C600 Rif_R (lac -), resistentes à azida e à rifampicina, respetivamente, e suscetíveis à cefotaxima. Para além da estirpe com o novo gene *bla*_{CTX-M-166}, identificado por sequenciação, foi também utilizada,

como estirpe dadora, uma estirpe que possui no seu genoma o gene *bla*_{CTX-M-1}, o qual será utilizado como controlo. Ambas as estirpes dadoras fermentam a lactose (lac +) e são suscetíveis à azida e à rifampicina, e resistentes à cefotaxima. A conjugação bacteriana foi realizada de acordo com um protocolo de quatro dias:

Dia 1: As estirpes foram semeadas em meio seletivo e diferencial de MacConkey agar com antibiótico incorporado. Para a conjugação, realizada com a estirpe Ec J₅₃ NaN_{3R}, semeou-se esta estirpe, bem como as dadoras, em placas de meio com azida (160 µg/ml) ou cefotaxima (2 µg/ml); para a conjugação com a estirpe Ec C600 Rif_R seguiu-se o mesmo procedimento, substituindo apenas o meio com azida por meio incorporado com rifampicina (250 µg/ml). As estirpes foram incubadas, *overnight*, a 37°C.

Dia 2: Após avaliação do padrão de suscetibilidade aos antibióticos, inoculou-se uma colónia isolada de cada estirpe dadora e recetora em 5 ml de meio nutritivo BHI (*Brain Heart Infusion*), durante 3 horas, a 37°C, com agitação de 180 rpm. Terminadas as 3 horas, estando as culturas bacterianas na fase exponencial, adicionou-se 100 µl da estirpe dadora e 200 µl da estirpe recetora a 5 ml de meio BHI, e incubou-se a 37°C em banho-maria, *overnight*.

Dia 3 e 4: Para a seleção dos transconjugantes, a cultura proveniente da experiência no dia 2 foi semeada em placas de meio seletivo e diferencial MacConkey, com antibióticos incorporados: cefotaxima associada com azida ou com rifampicina, de acordo com a estirpe recetora em questão. Após incubação, *overnight*, a 37°C, repicaram-se as colónias obtidas, cada uma, para 5 ml de meio BHI, e colocaram-se a incubar durante 6 horas a 37°C, com agitação de 180 rpm. A cultura dos tubos com crescimento foi semeada em placas de meio seletivo e diferencial de MacConkey agar com o mesmo conjunto de antibióticos incorporados e colocadas a incubar a 37°C, *overnight*.

4.1.2. Transformação

Em alternativa ao protocolo de conjugação bacteriana, procedeu-se à transformação direta do ADN plasmídico das estirpes com os genes *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-166} para células competentes One Shot® TOP10 (*Invitrogen*). Estas células foram escolhidas pelo facto de o seu genótipo ser totalmente conhecido e, assim, funcionarem como uma estirpe isogénica para o nosso estudo.

4.1.2.1. Extração de ADN plasmídico

A extração de ADN plasmídico foi realizada através do *kit* NucleoBond® Xtra Midi Plus, (*Macherey-Nagel GmbH & Co.*) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Este *kit* possibilita a purificação de ADN plasmídico a partir da lise das células bacterianas, sendo todos os contaminantes, deste proteínas a ARN, excluídos da amostra final. O primeiro passo é a inoculação das estirpes de interesse em 100 ml de meio LB líquido com cefotaxima (2 µg/ml), para garantir a propagação do plasmídeo, e posterior incubação, *overnight*, a 37°C. O *kit* é composto por diversas etapas que englobam a recolha e lise das células, a aplicação e equilíbrio do lisado celular no complexo coluna-filtro, as várias lavagens efetuadas a esse mesmo complexo, assim como a eluição e precipitação do ADN plasmídico.

Resumidamente, o lisado celular total é carregado num complexo coluna-filtro (*NucleoBond® Xtra Column – NucleoBond® Xtra Column Filter, Macherey-Nagel GmbH & Co.*) que, por ação do fluxo gravimétrico, vai percorrer este mesmo complexo. O processo de purificação do ADN plasmídico baseia-se na ligação específica deste ADN à coluna de troca de aniões utilizada e na capacidade de controlar a sua afinidade de ligação através do pH envolvente. O pH ácido promove a ligação do ADN plasmídico à coluna, enquanto o pH alcalino leva à sua eluição.

4.1.2.2. Transformação de ADN plasmídico

O ADN plasmídico foi visualizado e quantificado através de uma corrida em gel de agarose e do NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*), respetivamente. A reação de transformação em células competentes *One Shot® TOP10 (Invitrogen)*, foi efetuada por choque térmico: adicionou-se 2 µl de ADN plasmídico (contendo *bla*_{CTX-M-1} ou *bla*_{CTX-M-166}) a 50 µl de células TOP10, em gelo, onde ficaram a incubar durante 30 minutos. Terminado este período, as células foram colocadas durante 45 segundos a 42°C, em banho-maria, regressando de imediato ao gelo por mais 2 minutos. Imediatamente a seguir, adicionou-se 250 µl de meio S.O.C. às células, as quais foram colocadas a incubar a 37°C, com 225 rpm de agitação. Após 1 hora de incubação, as células foram semeadas, com auxílio de um plaqueador em L, em meio LB com cefotaxima (2 µg/ml), e incubadas a 37°C, *overnight*.

Para análise dos transformantes, as colónias que cresceram em meio LB com antibiótico foram repicadas para 5 ml de meio BHI com cefotaxima (2 µg/ml), de forma a confirmar a eficiência da transformação.

4.2. Clonagem dos genes *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-166}

A clonagem dos genes *bla*_{CTX-M-1} ou *bla*_{CTX-M-166} foi realizada utilizando o *kit Zero Blunt*[®] *PCR Cloning* (Invitrogen, Life Technologies), após extração de ADN total das estirpes clínicas com o *kit DNeasy*[®] *Blood & Tissue* (Qiagen), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Numa primeira etapa, foi efetuada uma reação de PCR onde o ADN plasmídico foi amplificado com uma ADN polimerase produtora de extremidades cegas (*Proofreading Polymerase*), seguida de uma reação de ligação, entre o ADN amplificado e o vetor do *kit*, levada a cabo pela enzima *ExpressLink*[™] *T4 DNA ligase*. O vetor *pCR*[®]-*Blunt* utilizado para a clonagem contém o gene letal de *E. coli ccdB* fundido com a região C-terminal do gene *lacZ* α . A ligação do fragmento a clonar interrompe a expressão do gene de fusão *lacZ* α -*ccdB* permitindo, assim, apenas o crescimento de recombinantes positivos após transformação. Nas células com vetores não-recombinantes, há expressão do gene *ccdB*, o que impossibilita o crescimento destas células. A transformação da construção genética obtida foi feita através de choque térmico, de acordo com o que foi descrito para a transformação do ADN plasmídico (ver 4.1.2.2.). A análise dos transformantes foi realizada por PCR, através da combinação dos *primers* do vetor e do inserto de ADN, verificando o tamanho em pares de bases (pb) dos fragmentos amplificados.

4.3. Determinação da localização dos genes *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-166}

Para determinar se os genes que codificam as enzimas CTX-M-1 e CTX-M-166 eram cromossómicos, recorreu-se à restrição com a enzima *I-Ceu I*. Esta enzima caracteriza-se por digerir o ADN cromossómico de *E. coli* em 7 fragmentos distintos, atuando numa região de 26 pb presente no gene *rrl* (Liu et al., 1993).

4.3.1. Restrição com a enzima I-Ceu I

O protocolo seguido para a determinação da localização dos genes contemplou 5 etapas: preparação dos discos, digestão enzimática, eletroforese em gel com campo pulsado [PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)], extração de ADN presente no gel e confirmação da presença do gene por PCR:

Preparação dos discos: As estirpes portadoras dos genes de interesse foram semeadas em placas de gelose simples e incubadas a 37°C, *overnight*. A seguir, emulsionou-se uma porção de cultura, com uma ansa de 10 μ l, num *ependorf* com 1 ml de tampão fosfato 50 mM, pH 8.0. Após centrifugar, durante 10 minutos, a 6600 rpm/4°C, rejeitou-se 150 μ l de

sobrenadante, e, após ressuspender o *pellet* no restante volume, foi transferido na sua totalidade para uma cuvete. A leitura da sua absorvância, a 650 nm, foi efetuada num espectrofotómetro (*Novaspec® II, Pharmacia Biotech*). Após equilibrar, durante 5 minutos a 41°C, 300 µl da suspensão bacteriana com densidade ótica situada entre 1,250 e 1,450, adicionou-se 300 µl de agarose 1,5% (*SeaPlaque GTG – Low Melting*) e homogeneizou-se. Com auxílio de uma seringa de 1 ml recolheu-se a solução, evitando a formação de bolhas, e colocou-se a seringa no congelador a -20°C durante 4 minutos, seguidos de 10 minutos à temperatura ambiente. Depois de cortados, com auxílio de uma seringa, os discos foram colocados em 1 ml de solução de lise bacteriana e incubados, durante 3 horas, a 50°C. Findo o tempo de incubação, retirou-se a solução de lise e adicionou-se 1 ml de tampão de digestão com proteinase K e foi a incubar, *overnight*, a 55°C, com agitação. No dia seguinte, rejeitou-se o tampão com a proteinase, seguindo-se cinco lavagens dos discos, a primeira com 5 ml de água destilada estéril num agitador orbital (*3D Rocking Platform STR9, Stuart Scientific*) a 20 rpm, durante 5 minutos e as restantes quatro com 10 ml de tampão TE 1x, com a mesma agitação, mas durante 30 minutos. Os discos foram armazenados em *ependorfs* com 0,5 ml de TE 1x, a 4°C.

Digestão enzimática: Para efetuar a digestão, prepararam-se duas soluções para cada disco: o tampão de equilíbrio (10 µl de *CutSmart*, o tampão específico da enzima, e 90 µl de água destilada estéril) e a solução de restrição (85 µl de água destilada estéril, 10 µl de *CutSmart*, 1 µl de BSA e 4 µl de enzima *I-Ceu I*). Depois de retirar o tampão TE 1x dos *ependorfs* com os discos, adicionou-se 100 µl de tampão de equilíbrio, seguindo-se um período de incubação de 10 minutos a 37°C, em banho-maria, após os quais se rejeitou o tampão e adicionou 100 µl da solução de restrição. Incubou-se a 37°C, em banho-maria, durante 16 horas. Para terminar a reação de restrição, esta foi colocada a 4°C.

PFGE: Preparou-se um gel de agarose 1,2% (*Agarose Seakem Gold*) e aplicou-se um disco por poço. Os parâmetros utilizados na corrida do gel foram: 6V/cm; ângulo de 120°; 24 horas; 11°C, pulso inicial 36 segundos; pulso final 0,1 segundos. No final da corrida, o gel foi colocado numa solução com tampão TBE 0,5x e Gel Red 10000x (Biotium), durante 20 minutos, seguindo-se um período de descoloração em água desmineralizada por 18 horas. Terminada esta fase, o gel foi fotografado no transiluminador (*Universal Hood II, Biorad*).

Extração e PCR do ADN presente no gel: a extração do ADN correspondente às bandas do gel foi feita com o *kit ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GA Healthcare)*, de acordo com as instruções do fabricante. Para cada ADN extraído, correspondente a uma banda, foi realizado o PCR específico para genes CTX-M do grupo 1 (Tabela 4). Um resultado positivo para o PCR indicava para a presença de um gene cromossómico.

4.4. Caracterização enzimática para análise da estrutura-função

4.4.1. Extração das enzimas CTX-M-1 e CTX-M-166 para estudo cinético

Os clones produtores das β -lactamases em estudo foram semeados em meio de gelose simples e, posteriormente, incubados a 37°C, *overnight*. De seguida, para cada extração, inoculou-se 6 L de meio LB com 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de cefotaxima, com um pré-inóculo de LB preparado com uma colónia isolada. As culturas bacterianas foram incubadas a 37°C e 180 rpm, *overnight*. A recolha das células foi realizada por centrifugação (4°C, 10 min, 10000 rpm), seguindo-se 3 lavagens das células (*pellets*), a primeira com água ultra pura (*Millipore-Milli Q*®), e as seguintes com MES-NaOH 20mM (pH 5,5). Após ressuspensão das células, em MES-NaOH 20mM (pH 5,5), seguiu-se a lise bacteriana por sonicação, utilizando-se 3 ciclos de 1 min com intervalos de 30 s (*UP 200s, Dr. Hielscher Ultrasonics, GmbH*). Por fim, e após uma centrifugação (4°C, 10 min, 10000 rpm) para clarificar a solução, foi recolhido o extrato proteico bruto (sobrenadante), utilizado nos ensaios enzimáticos. Adicionalmente, e após a centrifugação de clarificação, foi efetuada a precipitação do ADN através da incubação do extrato com espermina 0,2 M durante 20 min, em gelo. Terminado o tempo de incubação, realizou-se uma nova centrifugação de clarificação e recolheu-se o extrato proteico que, de seguida, foi submetido a diálise (*Cellu Sep*® T3), *overnight*, em MES-NaOH 20mM (pH 5,5) com agitação a 4°C. Para finalizar, o produto da diálise foi filtrado (*115mL filter unit, Nalgene*®).

Antes de prosseguir para os ensaios enzimáticos com o intuito de averiguar a atividade das β -lactamases, realizou-se o teste do Nitrocefim. Este teste é um teste colorimétrico, que consiste na alteração de cor do Nitrocefim (amarelo), ou não, conforme seja positivo ou negativo, respetivamente. Assim, a presença das β -lactamases foi confirmada pela alteração da cor do Nitrocefim para vermelho, após adição do extrato enzimático (incolor).

4.4.2. Purificação das β -lactamases CTX-M-1 e CTX-M-166

A purificação das β -lactamases extraídas, numa primeira etapa, foi realizada por cromatografia de troca iónica, na coluna HiLoad™ 26/10 SP Sepharose™ High Performance (*GE Healthcare*), seguida por cromatografia de filtração em gel, com a coluna HiPrep™ 16/60 Sephacryl™ S-100 (*GE Healthcare*). Por último, realizou-se uma reação de troca de tampão, na coluna HiPrep™ 26/10 Desalting (*GE Healthcare*). Estas três etapas foram realizadas num aparelho AKTA prime plus (*Amersham Biosciences*), de acordo com o descrito por Bonnet et al. (2001). No final de cada etapa o extrato proteico recolhido foi sujeito a um processo de

concentração e purificação (*Amicon Ultra-15, Millipore*), seguido do teste do Nitrocefin para confirmar a presença e atividade das β -lactamases CTX-M-1 ou CTX-M-166.

4.4.3. Quantificação e avaliação da pureza das β -lactamases extraídas

A concentração das enzimas obtidas após a purificação foi determinada com o *kit BCA Protein Assay (Pierce, Rockford)*, de acordo com as instruções do fabricante. Este procedimento tem como base a ação de ácido bicinconínico (*BCA – bichinoninic acid*), que possibilita a detecção e quantificação colorimétricas das proteínas totais presentes. Assim, criou-se uma curva padrão com diferentes concentrações conhecidas de albumina de soro bovino, sendo determinada, por comparação, a concentração das enzimas purificadas.

A pureza das duas β -lactamases extraídas foi determinada através da realização de um gel SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida – sulfato dodecil de sódio). Esta técnica foi executada de acordo com Bonnet et al. (2001), tendo ambos os géis, de concentração e de resolução, concentrações finais de acrilamida de 3 e 12% (p/v), respetivamente. A coloração das proteínas foi realizada com azul de Comassie R-250.

4.4.4. Determinação de parâmetros cinéticos

A determinação dos parâmetros cinéticos das β -lactamases CTX-M-1 e CTX-M-166 foi efetuada através de um método de acidimetria computadorizado (Labia, 1973), o qual tem por base a titulação do ácido penicilóico produzido durante a hidrólise dos antibióticos, mais concretamente através da análise das curvas de hidrólise e da regressão respetiva. A reação de hidrólise foi realizada em NaCl 100 mM, a pH 7.0, enquanto que para titular o ácido produzido foi utilizado NaOH 5 mM. Para tal, utilizou-se um acidómetro (*702 SM Titrino, Metrohm Swiss Made*) e um agitador magnético (*728 Stirrer, Metrohm*) associados ao *software* pHStat versão 3.30[®]. Os valores dos parâmetros cinéticos V_{max} (velocidade máxima da reação), K_m (constante de Michaelis), k_{cat} (constante de atividade catalítica) e K_{cat}/K_m (eficiência catalítica), foram calculados para um total de 12 substratos: amoxicilina, aztreoname, cefalotina, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, ceftiofur, cefuroxima, imipeneme, penicilina G, piperacilina e ticarcilina, cada um numa concentração de 2 mg/ml. Em todos os ensaios se seguiu o mesmo padrão: adição do substrato ao meio, estabilização do pH a 7.0 e, só depois, adição da enzima e titulação do ácido produzido na hidrólise do antibiótico.

Adicionalmente, determinaram-se as concentrações inibitórias de 50% da atividade enzimática para os inibidores de β -lactamases (IC_{50}): ácido clavulânico e tazobactame. Para

calcular o IC_{50} , utilizou-se como substrato a penicilina G, a 2 mg/ml, de acordo com Bonnet et al. (1999). Contrariamente aos ensaios cinéticos anteriormente abordados, para a determinação do IC_{50} , há um período de incubação de 5 min da β -lactamase com o inibidor que precede a adição da penicilina G. A análise da hidrólise do antibiótico é realizada tal como descrito anteriormente.

5. Mutagénese

Os mutantes do gene *bla*_{CTX-M-tipo} foram produzidos utilizando o protocolo disponibilizado no kit de mutagénese QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (*Agilent Technologies*). Com este kit realizou-se a mutagénese dirigida em ADN de dupla cadeia (Figura 4). Num primeiro passo foi necessário clonar o gene em estudo no plasmídeo pCR™-Blunt, utilizando o protocolo descrito no ponto 4.2.

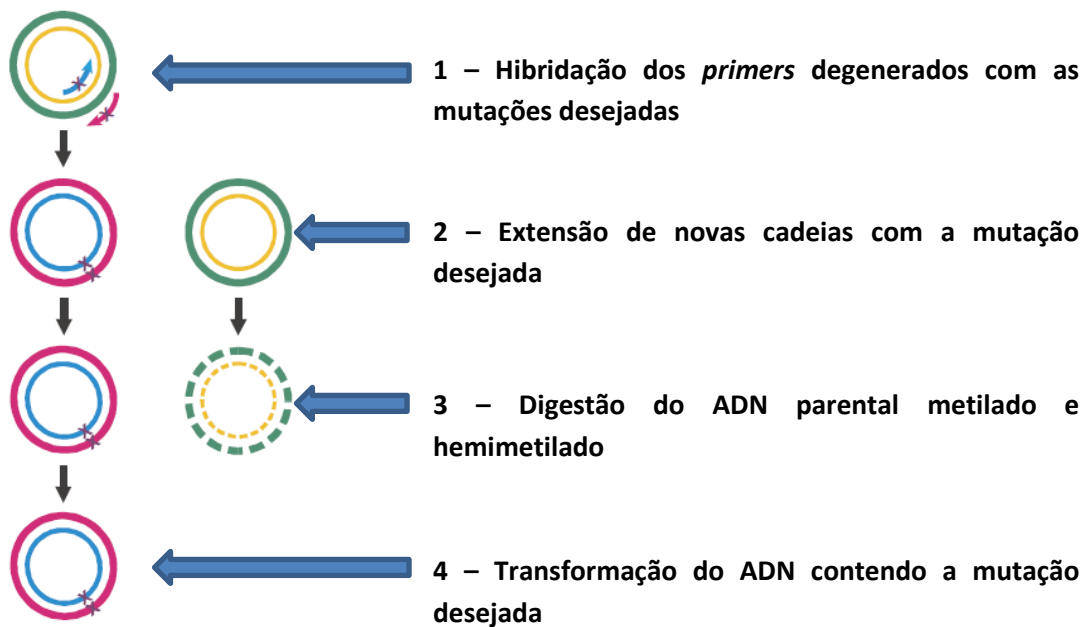


Figura 4: Representação das diferentes etapas do protocolo de mutagénese. As cadeias de cor verde e amarela representam o ADN parental. Por sua vez, as cadeias azuis e rosas representam as cadeias de ADN recém-formadas contendo a mutação X. Adaptado do protocolo do *kit* QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (*Agilent Technologies*).

A primeira etapa da mutagénese foi a síntese da cadeia mutada, com o auxílio de *primers* mutagénicos degenerados (Tabela 5), tendo como alvo o codão que codifica o aminoácido 69 (cisteína) do gene *bla*_{CTX-M-15}. Esta foi feita através de uma reação de PCR, na qual o ciclo de desnaturação, hibridação e extensão foi repetido 18 vezes, sendo o tempo de

extensão de 1 minuto por cada kilo-base do plasmídeo. Terminado o PCR, ocorreu a digestão do ADN parental metilado e hemimetilado, por ação da enzima de restrição *Dpn I* durante uma 1 hora, a 37°C. Por fim, foi realizada a transformação do ADN mutado em células competentes, com o *kit* utilizado para a clonagem, através de choque térmico (ver 4.1.2.2). Após 30 minutos em gelo, a reação de transformação foi colocada em banho de água a 42°C, durante 45 segundos, retornando ao gelo por mais 2 minutos. Por fim, adicionou-se 0,5 mL de meio NZY⁺, pré-aquecido a 42°C.

Após 1 hora de incubação, com agitação a 225 rpm e a uma temperatura de 37°C as reações de transformação foram plaqueadas em meio LB com CTX (0,5µl/ml) de forma a selecionar apenas os transformantes. As colónias que cresceram foram repicadas e inoculadas em 5 ml de BHI com o mesmo antibiótico e a mesma concentração. Posteriormente, fez-se a extração de ADN por fervura, de acordo com o descrito no ponto 3.1, e a confirmação da produção de mutações foi realizada por PCR seguida de sequenciação nucleotídica, utilizando os *primers* para o gene *bla*_{CTX-M} (Tabela 4).

Tabela 5: *Primers* degenerados utilizados para a mutagénesse do gene *bla*_{CTX-M-15}, na posição nucleotídica xxx (CTG), correspondente ao aminoácido cisteína 69.

Designação <i>primer</i>	Sequência (5'→3') ^a	Aminoácido obtido (codão) ^b
1F	5' CGCTTTGCGATG VTG AGCACCAGTAAAG 3'	L (CTG), M (ATG), ou V (GTG)
1R	5' CTTTACTGGTGCT CAB CATCGCAAAGCG 3'	
2F	5' CGCTTTGCGATG DTC AGCACCAGTAAAG 3'	F (TTC), I (ATC), ou V (GTC)
2R	5' CTTTACTGGTGCT GAH CATCGCAAAGCG 3'	
3F	5' CGCTTTGCGATG NCG AGCACCAGTAAAG 3'	S (TCG), P (CCG), T (ACG), ou A (GCG)
3R	5' CTTTACTGGTGCT CGN CATCGCAAAGCG 3'	
4F	5' CGCTTTGCGATG VAG AGCACCAGTAAAG 3'	Q (CAG), K (AAG), ou E (GAG)
4R	5' CTTTACTGGTGCT CTB CATCGCAAAGCG 3'	
5F	5' CGCTTTGCGATG NAC AGCACCAGTAAAG 3'	Y (TAC), H (CAC), N (AAC), ou D (GAC)
5R	5' CTTTACTGGTGCT GTN CATCGCAAAGCG 3'	
6F	5' CGCTTTGCGATG NGC AGCACCAGTAAAG 3'	C (TGC), R (CGC), S (AGC), ou G (GGC)
6R	5' CTTTACTGGTGCT GCN CATCGCAAAGCG 3'	
7F	5' CGCTTTGCGATG BGG AGCACCAGTAAAG 3'	W (TGG), R (CGG), ou G (GGG)
7R	5' CTTTACTGGTGCT CCV CATCGCAAAGCG 3'	

^a B = CGT, D = AGT, H = ACT, N = ACGT, V = ACG

^b Aminoácidos: A, Alanina; R, Arginina; N, Asparagina; D, Ácido aspártico; C, Cisteína; Q, Glutamina; E, Ácido glutâmico; G, Glicina; H, Histidina; I, Isoleucina; L, Leucina; K, Lisina; M, Metionina; F, Fenilalanina; P, Prolina; S, Serina; T, Treonina; W, Triptófano; Y, Tirosina; V, Valina;

III-Resultados

1. Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos

A caracterização fenotípica das 68 estirpes obtida através da realização de TSA, permitiu avaliar a sua suscetibilidade a antibióticos pertencentes a 5 classes diferentes: β -lactâmicos (n=18), fluoroquinolonas (n=3), aminoglicosídeos (n=3), sulfonamidas (n=1) e glicilciclinas (n=1).

1.1. Suscetibilidade aos antibióticos

Os resultados obtidos para a suscetibilidade aos antibióticos das estirpes de origem clínica e animal são apresentados na Tabela 6 e na Figura 5. Num panorama geral é de destacar a maior percentagem de estirpes de origem animal suscetíveis aos antibióticos testados, com exceção da ceftazidima.

No que diz respeito aos antibióticos β -lactâmicos, todas as estirpes são resistentes à ampicilina e piperacilina, apenas com a exceção de duas estirpes, uma de origem clínica e uma de origem animal. Analisando a subclasse das cefalosporinas verificou-se que 84% das estirpes (49 estirpes clínicas e 8 de origem animal) são resistentes à cefamicina e/ou a cefalosporinas de 2ª geração (isto é, cefoxitina e/ou cefuroxima). Em relação às cefalosporinas de 3ª geração estudadas, constatou-se que 94% das estirpes (49 estirpes clínicas e 15 de origem animal) têm suscetibilidade reduzida, pelo menos, a um dos seguintes antibióticos: cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftriaxona. Em relação às cefalosporinas de 4ª (cefepima) e 5ª geração (ceftarolina) 69% das estirpes (43 estirpes clínicas e 4 de origem animal) e 96% das estirpes (50 estirpes clínicas e 15 de origem animal) apresentaram suscetibilidade diminuída, respetivamente. Para o aztreoname, representante dos monobactames, observou-se que 79% das estirpes (42 estirpes clínicas e 12 de origem animal) apresentaram suscetibilidade diminuída. Verificou-se que 68% das estirpes (43 estirpes clínicas e 3 de origem animal) apresentaram suscetibilidade diminuída a, pelo menos, uma das combinações antibiótico-inibidor de β -lactamases testadas. Todas as estirpes analisadas quer de origem clínica, quer de origem animal, apresentam suscetibilidade aos carbapenêmes utilizados (doripeneme, ertapeneme, imipeneme e meropeneme).

Em relação ao grupo das fluoroquinolonas 88% das estirpes (47 estirpes clínicas e 13 de origem animal) apresentam suscetibilidade diminuída a, pelo menos, um dos seguintes antibióticos: ciprofloxacina, ofloxacina e levofloxacina.

Da mesma forma observa-se que 57% das estirpes (37 estirpes clínicas e 2 de origem animal) apresentam suscetibilidade diminuída a um dos três aminoglicosídeos: tobramicina, gentamicina e amicacina.

No que diz respeito às sulfonamidas (trimetoprim + sulfametoxazol) registou-se que 59% das estirpes (34 estirpes clínicas e 6 de origem animal) apresentaram suscetibilidade diminuída.

Respetivamente à tigeciclina, todas as estirpes de origem clínica e de origem animal foram suscetíveis.

Na Figura 5 é feita a comparação entre a percentagem de estirpes de origem clínica e animal com suscetibilidade reduzida aos antibiótico, onde é possível observar que as estirpes de origem clínica são menos suscetíveis que as de origem animal para a generalidade dos antibióticos estudados.

Tabela 6: Suscetibilidade de estirpes de origem clínica e animal, produtoras ou não de ESBL.

	Estirpes de origem clínica											Estirpes de origem animal															
	Não ESBL (n=4)				ESBL							Total (n=51)			Não ESBL (n=5)			ESBL							Total (n=17)		
	S	I	R		SHV-12 (n=1)			CTX-M (n=46)				S (%)	I (%)	R (%)	S	I	R	Não CTX-M (n=8)			CTX-M (n=4)				S (%)	I (%)	R (%)
AMP	1	-	3	0	-	1	0	-	46(100)	1(2)	-	50(98)	0	-	5	1	-	7	0	-	4	1(6)	-	16(94)			
PIP	1	0	3	0	0	1	0	0	46(100)	1(2)	0	50(98)	0	0	5	1	0	7	0	0	4	1(6)	0	16(94)			
AMC	1	-	3	0	-	1	19(41)	-	27(59)	20(39)	-	31(61)	5	-	0	7	-	1	4	-	0	16(94)	-	1(6)			
TCC	1	-	3	0	-	1	9(20)	-	37(80)	10(20)	-	41(80)	3	-	2	7	-	1	4	-	0	14(82)	-	3(18)			
TPZ	1	1	2	0	1	0	23(50)	15(33)	8(17)	14(47)	17(33)	10(20)	5	0	0	7	0	1	4	0	0	16(94)	0	1(6)			
FOX	3	-	1	0	-	1	42(91)	-	4(9)	45(88)	-	6(12)	5	-	0	7	-	1	4	-	0	16(94)	-	1(6)			
CXM	2	-	2	1	-	0	0	-	46(100)	3(6)	-	48(94)	4	-	1	5	-	3	0	-	4	9(53)	-	8(47)			
CTX	2	1	1	0	1	0	0	0	46(100)	2(4)	2(4)	47(92)	1	3	1	1	4	3	0	0	4	2(12)	7(41)	8(47)			
CPD	2	-	2	0	-	1	0	-	46(100)	2(4)	-	49(96)	1	-	4	1	-	7	0	-	4	2(12)	-	15(88)			
CAZ	3	0	1	0	0	1	8(17)	4(9)	34(74)	11(22)	4(8)	36(71)	1	0	4	1	0	7	2	0	2	4(24)	0	13(76)			
CRO	3	0	1	1	0	0	0	0	46(100)	4(8)	0	47(92)	1	3	1	3	5	0	0	0	4	4(24)	8(47)	5(29)			
FEP	3	0	1	1	0	0	4(9)	11(24)	31(67)	8(16)	11(22)	32(63)	5	0	0	8	0	0	0	3	1	13(76)	3(18)	1(6)			
CPT	1	-	3	0	-	1	0	-	46(100)	1(2)	-	50(98)	1	-	4	1	-	7	0	-	4	2(12)	-	15(88)			
ATM	3	0	1	0	0	1	6(13)	4(9)	36(78)	9(18)	4(8)	38(75)	2	0	3	2	1	5	1	1	2	5(29)	2(12)	10(59)			
DOR	4	0	0	1	0	0	46(100)	0	0	51(100)	0	0	5	0	0	8	0	0	4	0	0	17(100)	0	0			
IMP	4	0	0	1	0	0	46(100)	0	0	51(100)	0	0	5	0	0	8	0	0	4	0	0	17(100)	0	0			
MEM	4	0	0	1	0	0	46(100)	0	0	51(100)	0	0	5	0	0	8	0	0	4	0	0	17(100)	0	0			
ERT	4	0	0	1	0	0	46(100)	0	0	51(100)	0	0	5	0	0	8	0	0	4	0	0	17(100)	0	0			
CIP	1	0	3	0	0	1	3(7)	0	43(93)	4(8)	0	47(92)	1	0	4	4	0	4	1	0	3	6(35)	0	11(65)			
OFX	1	0	3	0	0	1	3(7)	0	43(93)	4(8)	0	47(92)	1	0	4	2	1	5	1	0	3	4(24)	1(6)	12(71)			
LEV	1	0	3	0	0	1	3(7)	0	43(93)	4(8)	0	47(92)	1	0	4	3	1	4	1	0	3	5(29)	1(6)	11(65)			
TMN	2	1	1	0	1	0	13(28)	4(9)	29(63)	15(29)	6(12)	30(59)	4	0	1	7	0	1	4	0	0	15(88)	0	2(12)			
GEN	2	0	2	0	0	1	23(50)	3(7)	20(43)	25(49)	3(6)	23(45)	4	0	1	8	0	0	4	0	0	16(94)	0	1(6)			
AN	3	0	1	1	0	0	36(78)	7(15)	3(7)	40(78)	7(14)	4(8)	5	0	0	8	0	0	4	0	0	17(100)	0	0			
SXT	2	0	2	0	0	1	15(33)	1(2)	30(65)	17(33)	1(2)	33(65)	3	0	2	5	0	3	3	0	1	11(65)	0	6(35)			
TGC	4	0	0	1	0	0	46(100)	0	0	51(100)	0	0	5	0	0	8	0	0	4	0	0	17(100)	0	0			

“-“ significa que não existe categoria intermédia de acordo com os *breakpoints* do EUCAST (2014) seguidos. Antibióticos utilizados: ampicilina (AMP); piperacilina (PIP); amoxicilina + ácido clavulânico (AMC); ticarcilina + ácido clavulânico (TCC); piperacilina + tazobactame (TPZ); cefoxitina (FOX); cefuroxima (CXM); cefotaxima (CTX); cefpodoxima (CPD); ceftazidima (CAZ); ceftriaxona (CRO); cefepima (FEP); ceftarolina (CPT); aztreoname (ATM); doripeneme (DOR); imipeneme (IMP); meropeneme (MEM); ertapeneme (ERT); ciprofloxacina (CIP); ofloxacina (OFX); levofloxacina (LEV); tobramicina (TMN); gentamicina (GEN); ampicilina (AN); trimetoprim + sulfametoxazol (SXT); tigeciclina (TGC). As percentagens apenas são referidas para um número de estirpes superior a 15.

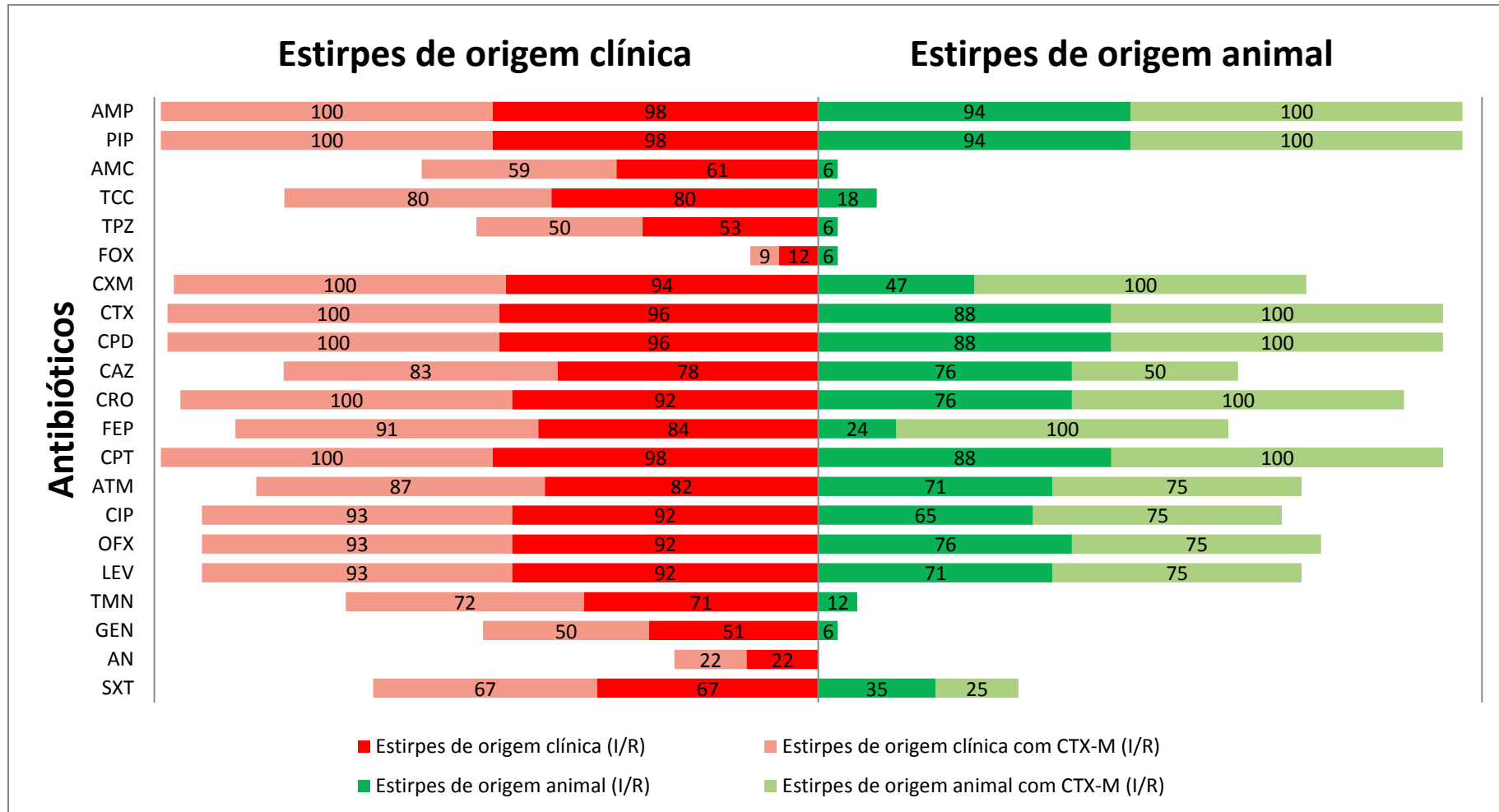


Figura 5: Representação gráfica da suscetibilidade diminuída, em percentagem, das estirpes de origem clínica (n=51) e animal (n=17), produtoras ou não de CTX-M. Está representada a percentagem de todas as estirpes (cores fortes) e das que apresentam genes *bla*_{CTX-M} (cores esbatidas). Na legenda, I e R representam suscetibilidade intermédia e resistência, respetivamente.

1.2. Multirresistência

No âmbito do presente estudo, uma estirpe foi considerada multirresistente se apresentou suscetibilidade diminuída a, pelo menos, três classes de antibióticos estruturalmente distintos testados: β -lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas e gliciliclinas (Magiorako et al., 2012).

Assim, 90,2% e 29,4% das estirpes de origem clínica e de origem animal foram consideradas multirresistentes, respetivamente (Tabela 7). Em relação às estirpes clínicas multirresistentes, é de salientar que pouco menos de metade, 21 em 46 (46%), tem suscetibilidade reduzida, pelo menos, a um antibiótico de 4 classes distintas.

Globalmente, foram detetados um total de 4 perfis de multirresistência distintos. Nos isolados de origem clínica, o perfil de multirresistência predominante incluiu suscetibilidade diminuída aos β -lactâmicos, às fluoroquinolonas, aos aminoglicosídeos e às sulfonamidas. Em relação aos isolados de origem animal, o perfil de multirresistência predominante foi caracterizado por suscetibilidade diminuída aos β -lactâmicos, às fluoroquinolonas e às sulfonamidas.

Tabela 7: Percentagem de estirpes multirresistentes, de acordo com o número de estirpes com suscetibilidade diminuída aos diferentes grupos de antibióticos.

	Classes de antibióticos com suscetibilidade diminuída				Total	% de estirpes multirresistentes
	β +A+S	β +A+Q	β +Q+S	β +A+Q+S		
Estirpes clínicas (n=51)	3	13	9	21	46	90,2%
Estirpes animais (n=17)	0	0	3	2	5	29,4%

β , A, Q e S representam, respetivamente, as classe dos antibióticos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfonamidas.

2. Caracterização genotípica dos isolados bacterianos

A leitura interpretativa do antibiograma dos 68 isolados em estudo, permitiu dirigir o estudo genotípico para famílias específicas de genes *bla*, assim como para genes que conferiam resistência às fluoroquinolonas. Os perfis genotípicos das estirpes de origem clínica e de origem veterinárias serão apresentados, em separado, para melhor compreensão dos mesmos.

2.1. Perfil genotípico: estirpes de origem clínica

A pesquisa de genes *bla* permitiu detetar 46 *bla*_{CTX-M}, 27 *bla*_{OXA}, 23 *bla*_{TEM}, um gene *bla*_{SHV}, dois *bla*_{CMY} e um *bla*_{DHA} (Figura 6), muitas vezes coexistindo num mesmo isolado. O gene *ampC* cromossómico de *E. coli* foi detetado em todas as estirpes, confirmando a identificação da espécie. Da pesquisa de genes de resistência às fluoroquinolonas foram detetados 26 genes *aac*.

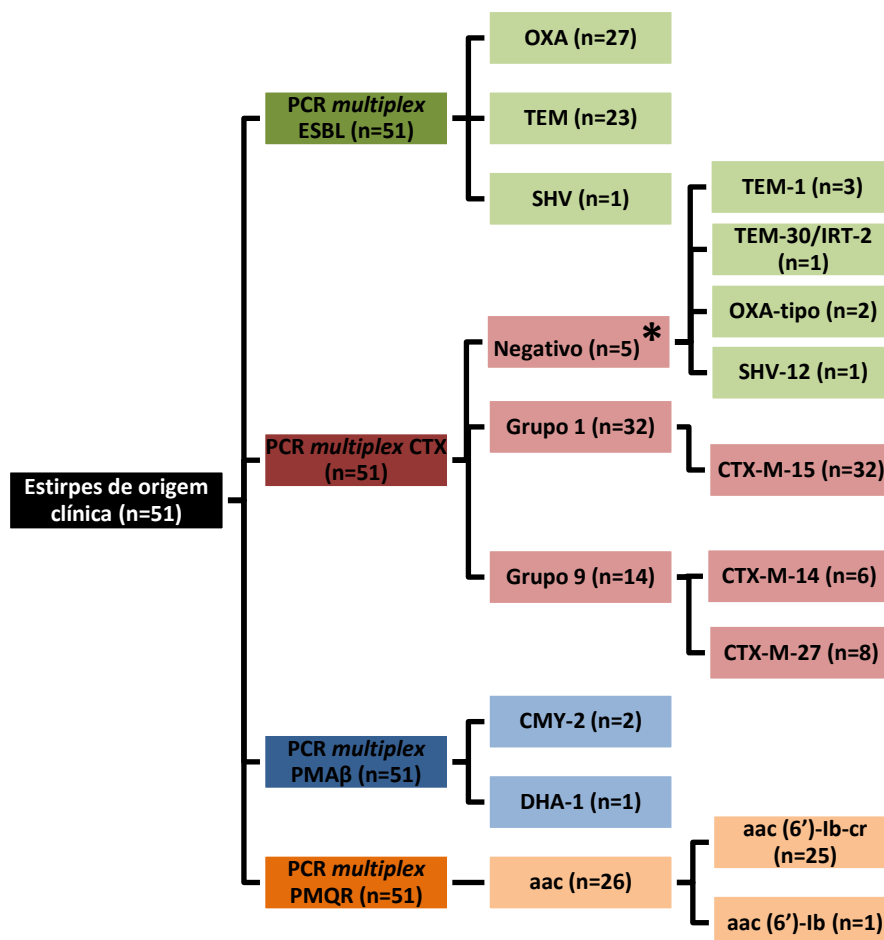


Figura 6: Diagrama com indicação dos genes detetados e identificados nas estirpes de origem clínica.

* Estes isolados foram posteriormente identificados a partir do PCR *multiplex* ESBL.

Após deteção por PCR, a sequenciação permitiu identificar os genes de resistência presentes nos isolados em estudo. Dos 46 genes *bla*_{CTX-M} identificados 32 são *bla*_{CTX-M-15}, pertencendo ao grupo 1. Os restantes 14 genes pertencem ao grupo 9, tratando-se neste caso de oito genes *bla*_{CTX-M-27} e seis *bla*_{CTX-M-14}. Para as estirpes que apresentavam um fenótipo ESBL, mas que não codificam nenhum gene *bla*_{CTX-M}, foi realizada a identificação por sequenciação dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} detetados, tendo-se obtido três genes *bla*_{TEM-1}, um *bla*_{TEM-30/IRT-2} e um

*bla*_{SHV-12}, que codificam β-lactamases do tipo parental, IRT e ESBL, respetivamente. Em relação aos genes que codificam AmpCs plasmídicas, foram identificados dois *bla*_{CMY-2} e um *bla*_{DHA-1}.

No que diz respeito aos genes que codificam a resistência às fluoroquinolonas, foram identificados 25 genes como sendo da variante *aac* (6′)-*Ib-cr*, e apenas um como *aac* (6′)-*Ib*.

A análise dos genes detetados permitiu a identificação de 16 perfis genotípicos distintos, que se encontram descritos na Tabela 8, sendo o perfil predominante *bla*_{CTX-M-15} + *bla*_{OXA-tipo} + *aac* (6′)-*Ib-cr*, presente em 18 isolados bacterianos

É de realçar que dos 32 genes *bla*_{CTX-M-15} identificados no presente estudo, 25 estão associados a genes *bla*_{OXA}. Nenhum dos restantes genes *bla*_{CTX-M} identificados está associado ao gene *bla*_{OXA}.

Em relação aos genes *bla*_{CTX-M-14} detetados verificou-se que todos estão englobados no mesmo perfil genotípico, o segundo mais comum (n=6), e sempre em associação com genes da família TEM.

Tabela 8: Perfis genotípicos das 51 estirpes de origem clínica.

Perfis genotípicos ^a	Nº de estirpes (n=51)
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{OXA-tipo} + <i>aac</i> (6′)- <i>Ib-cr</i>	18
<i>bla</i> _{CTX-M-14} + <i>bla</i> _{TEM-tipo}	6
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-tipo}	5
<i>bla</i> _{CTX-M-27} + <i>bla</i> _{TEM-tipo}	4
<i>bla</i> _{CTX-M-27}	4
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{OXA-tipo} + <i>bla</i> _{TEM-tipo} + <i>aac</i> (6′)- <i>Ib-cr</i>	3
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{OXA-tipo}	2
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{OXA-tipo} + <i>bla</i> _{CMY-2} + <i>aac</i> (6′)- <i>Ib-cr</i>	1
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{OXA-tipo} + <i>aac</i> (6′)- <i>Ib</i>	1
<i>bla</i> _{CTX-M-15} + <i>bla</i> _{TEM-tipo} + <i>aac</i> (6′)- <i>Ib-cr</i>	1
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	1
<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{OXA-tipo} + <i>bla</i> _{DHA-1} + <i>bla</i> _{SHV-12} + <i>aac</i> (6′)- <i>Ib-cr</i>	1
<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{OXA-tipo} + <i>aac</i> (6′)- <i>Ib-cr</i>	1
<i>bla</i> _{TEM-30/IRT-2} + <i>bla</i> _{CMY-2}	1
<i>bla</i> _{TEM-1}	1
Sem genes detetados	1

^a O gene *ampC* foi identificado em todas as estirpes.

2.2. Perfil genotípico: estirpes de origem animal

A pesquisa por PCR permitiu detetar sete genes *bla*_{SHV}, cinco genes *bla*_{TEM} e quatro genes *bla*_{CTX-M}. Além dos genes *bla*, foram detetados dois genes de resistência às fluoroquinolonas, um *qnrB* e um *aac*. Na Figura 7 estão representados todos os genes detetados à exceção do gene *ampC*, detetado em todas as estirpes, há exceção de uma.

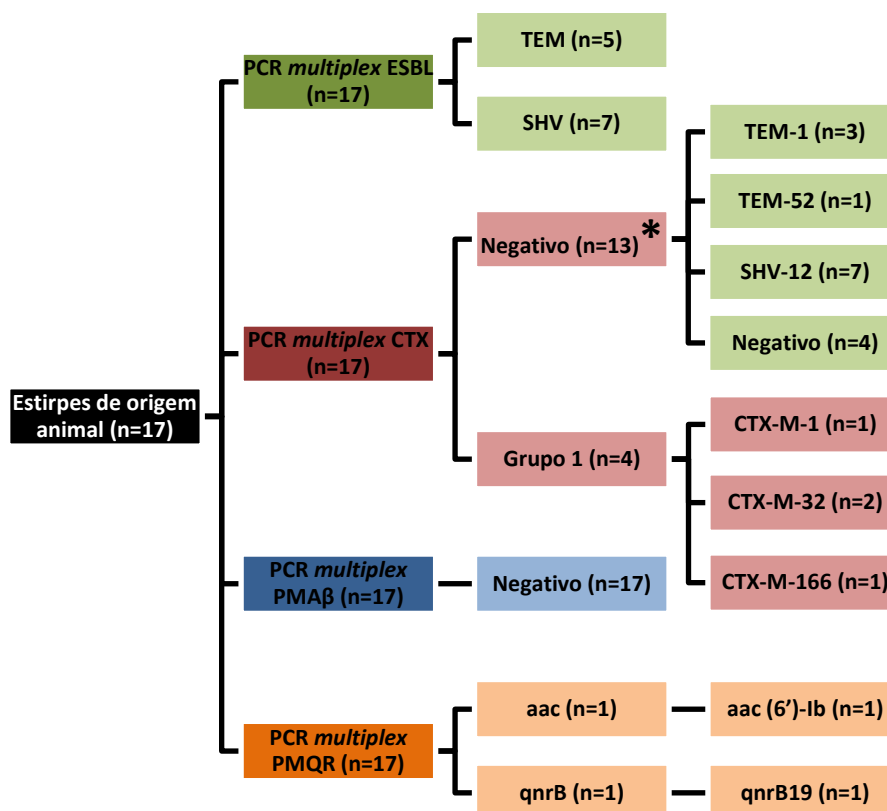


Figura 7: Diagrama com indicação dos genes detetados e identificados nas estirpes de origem animal.

* Estes isolados foram posteriormente identificados a partir do PCR *multiplex* ESBL.

Por sequenciação, foi possível identificar três bla_{TEM-1} , um bla_{TEM-52} e sete bla_{SHV-12} , sendo que os dois últimos codificam ESBLs.

Os quatro genes da família bla_{CTX-M} detetados pertencem todos ao grupo 1, tendo sido identificados como: $bla_{CTX-M-32}$ (n=2), $bla_{CTX-M-1}$ (n=1) e $bla_{CTX-M-166}$ (n=1). O gene $bla_{CTX-M-166}$ foi identificado pela primeira vez no presente estudo, diferindo apenas num nucleótido em relação ao gene $bla_{CTX-M-1}$. Esta nova variante do gene bla_{CTX-M} será estudada, detalhadamente, em pontos ulteriores. Os dois genes de resistência às fluoroquinolonas detetados foram identificados como $qnrB 19$ e $aac (6')-Ib$.

Foram registados 9 perfis genotípicos distintos, descritos na Tabela 9. O perfil encontrado numa frequência superior, identificado em cinco isolados de origem animal, é constituído apenas pelo gene bla_{SHV-12} .

Tabela 9: Perfis genotípicos das 17 estirpes^a de origem animal.

Perfis genotípicos	Nº de estirpes ^a (n=16)
<i>bla</i> _{SHV-12}	5
Apenas <i>ampC</i>	3
<i>bla</i> _{CTX-M-32}	2
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	1
<i>bla</i> _{CTX-M-166} + <i>bla</i> _{TEM-1}	1
<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-12}	1
<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-12} + <i>qnrB</i> 19	1
<i>bla</i> _{TEM-52}	1
<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>aac</i> (6')-Ib	1

^a Uma estirpe não apresentou genótipo de resistência aos antibióticos, inclusive não foi detetado o gene *ampC*.

As três estirpes para as quais apenas foi detetado o gene *ampC* apresentaram fenótipo ESBL. Para averiguar se na origem deste fenótipo estava uma mutação no gene *ampC* analisou-se a sua sequência, por comparação com o gene *ampC* da estirpe ATCC *E. coli* 25922. Verificou-se, após sequenciação com os *primers* AmpC presentes na Tabela 4, que os três genes detetados apresentaram duas mutações em comum nas posições nucleotídicas 574 e 625, dando origem às mutações aminoácidas Lis175Gln e Ser193Pro (Tabela 10). A substituição de uma prolina por uma serina na posição 193 situa-se no *loop* Ω da proteína. Para além destas mutações, existem outras em relação ao gene *ampC* padrão, no entanto, estas não estão presentes em simultâneo nos três genes analisados.

Tabela 10: Mutações aminoácidas (e nucleotídicas) identificadas nas sequências das β -lactamases AmpC.

Enzima	Posição do aminoácido (nucleótido)	
	175 (571)	193 (625)
ATCC 25922	Lys (A)	Ser (T)
Ec 10909	Gln (C)	Pro (C)
Ec 19991	Gln (C)	Pro (C)
Ec 26782	Gln (C)	Pro (C)

A – adenina; C – citosina; T – timina; Gln – glutamina; Lys – lisina; Pro – prolina; Ser – serina.

2.3. Genes *bla*_{CTX-M}

A pesquisa efetuada nos isolados de origem clínica e animal revelou a presença de seis genes *bla*_{CTX-M} distintos (Figuras 6 e 7). A comparação da sequência nucleotídica destes genes com a sequência dos genes parentais *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-9}, para genes do grupo 1 e do grupo 9, respetivamente, permitiu a identificação dos genes detetados neste estudo, após análise da

sequência nucleotídica de todas as β -lactamases identificadas até à data (www.lahey.org/Studies/).

Nas Tabelas 11 e 12 estão discriminadas as mutações pontuais presentes nas sequências nucleotídicas dos genes *bla*_{CTX-M} sequenciados, do grupo 1 e 9, respetivamente, assim como as alterações aminoacídicas a que dão origem.

Em relação às β -lactamases CTX-M do grupo 1, todas as enzimas CTX-M-15 foram detetados em isolados de origem clínica, as restantes três, incluindo a nova enzima CTX-M-166, foram encontradas em isolados de origem animal. A nova enzima CTX-M-166 difere da enzima parental CTX-M-1 apenas por uma substituição aminoacídica, Ala120Val.

Tabela 11: Mutações aminoacídicas (e nucleotídicas) identificadas nas sequências das β -lactamases (e genes que as codificam) do grupo 1, em isolados de origem humana e animal.

Enzima	Posição do aminoácido (nucleótido)					
	77 (239)	114 (349)	120 (368)	140 (427)	240 (725)	288 (865)
CTX-M-1 ^a	Val (T)	Gln (G)	Ala (C)	Ser (T)	Asp (A)	Asn (A)
CTX-M-15 ^b	Ala (C)	Asn (A)	-	Ala (G)	Gly (G)	Asp (G)
CTX-M-32 ^a	-	-	-	-	Gly (G)	-
CTX-M-166 ^a	-	-	Val (T)	-	-	-

^a Enzimas identificadas apenas em isolados de origem animal.

^b Enzima identificada apenas em isolados de origem clínica.

A – adenina; C – citosina; G – guanina; T – timina; Ala – alanina; Asn – asparagina; Asp – Aspartato; Gly – glicina; Gln – glutamina; Ser – serina; Val – valina.

As β -lactamases CTX-M do grupo 9 identificadas, CTX-M-14 e CTX-M-27, foram detetadas em isolados de origem clínica. Estas enzimas diferenciam-se entre si por uma alteração aminoacídica, Asp240Gly. O gene parental do grupo 9 utilizado, o gene *bla*_{CTX-M-9}, não foi detetado em nenhum dos isolados estudados.

Tabela 12: Mutações aminoacídicas (e nucleotídicas) identificadas nas sequências das β -lactamases (e genes que as codificam) do grupo 9, em isolados de origem humana.

Enzima	Posição do aminoácido (nucleótido)	
	231 (701)	240 (725)
CTX-M-9	Ala (C)	Asp (A)
CTX-M-14	Val (T)	-
CTX-M-27	Val (T)	Gly (G)

A – adenina; C – citosina; G – guanina; T – timina; Ala – alanina; Asp – Aspartato; Gly – glicina; ; Val – valina.

3. Fenótipo vs Genótipo

As Tabelas 13 e 14 apresentam a relação entre os perfis de resistência detetados e os genótipos e enzimas associados a cada perfil de resistência, em isolados de origem humana e animal, respetivamente.

3.1. Fenótipo vs Genótipo: estirpes de origem clínica

Em relação aos isolados de origem clínica foram detetados sete perfis de resistência distintos, dos quais quatro são perfis de multirresistência. Tal como já foi indicado, no ponto 1.2., 90,2% das estirpes de origem clínica são multirresistentes, nas quais estão incluídos os 18 isolados com o perfil genótipo predominante, *bla*_{CTX-M-15} + *bla*_{OXA-tipo} + *aac* (6')-Ib-cr. Concretamente, 8 isolados têm suscetibilidade diminuída aos antibióticos β-lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, os restantes 10 apresentam, adicionalmente, suscetibilidade diminuída às sulfonamidas.

Em termos de relação genótipo – fenótipo verifica-se que todos as estirpes que incluam no seu genótipo o gene *aac* apresentam suscetibilidade diminuída a, pelo menos, uma das fluoroquinolonas estudadas (Tabela 13). Contudo, o contrário não se verifica, ou seja, há estirpes com perfis de resistência que incluem as fluoroquinolonas, mas que não têm um gene *aac*.

Como seria expetável, todas as estirpes com genes *bla*_{CTX} são resistentes à cefotaxima. Contudo, em termos de resistência à ceftazidima verificam-se padrões de suscetibilidade distintos entre os vários genes *bla*_{CTX} identificados. Na presença dos genes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-27} e *bla*_{CTX-M-14}, verifica-se que, respetivamente, 88%, 75% e 0% dos isolados são resistentes à ceftazidima.

Tabela 13: Perfis de resistência aos antibióticos dos 51 isolados de *E. coli* de origem humana, associados aos genótipos e enzimas detetadas em cada isolado.

Perfis de resistência (nº de isolados)	Genótipo (nº de isolados)	Enzimas (nº de isolados)
$\beta + Q + S + A$ (21) ^a	<i>bla</i> _{CTX} (2)	CTX-M-15 (1) / CTX-M-27 (1)
	<i>bla</i> _{CTX} + <i>bla</i> _{TEM} (3)	CTX-M-14+TEM-tipo (2) / CTX-M-27+TEM-tipo (1)
	<i>bla</i> _{CTX} + <i>bla</i> _{OXA} (1)	CTX-M-15+OXA-tipo (1)
	<i>bla</i> _{CTX} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>aac</i> (10)	CTX-M-15+OXA-tipo+AAC (6')-Ib-cr (10)
	<i>bla</i> _{CTX} + <i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>aac</i> (2)	CTX-M-15+TEM-tipo+OXA-tipo+ AAC (6')-Ib-cr (2)
	<i>bla</i> _{CTX} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>bla</i> _{CMY} + <i>aac</i> (1)	CTX-M-15+CMY-2+OXA-tipo+AAC (6')-Ib-cr (1)
	<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>bla</i> _{DHA} + <i>aac</i> (1)	TEM-1+SHV-12+OXA-tipo+ DHA-1+ AAC (6')-Ib-cr (1)
$\beta + Q + A$ (13) ^a	<i>bla</i> _{CTX} + <i>bla</i> _{TEM} (1)	CTX-M-14+TEM-tipo (1)
	<i>bla</i> _{CTX} + <i>bla</i> _{OXA} (1)	CTX-M-15+OXA-tipo (1)
	<i>bla</i> _{CTX} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>aac</i> (9)	CTX-M-15+OXA-tipo+ AAC (6')-Ib (1) / CTX-M-15+OXA-tipo+ AAC (6')-Ib-cr (8)
	<i>bla</i> _{CTX} + <i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>aac</i> (1)	CTX-M-15+TEM-tipo+OXA-tipo+ AAC (6')-Ib-cr (1)
	<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>aac</i> (1)	TEM-1+ OXA-tipo+ AAC (6')-Ib-cr (1)
$\beta + Q + S$ (9) ^a	<i>bla</i> _{CTX} (3)	CTX-M-27 (3)
	<i>bla</i> _{CTX} + <i>bla</i> _{TEM} (5)	CTX-M-15+TEM-tipo (2) / CTX-M-14+TEM-tipo (3)
	<i>bla</i> _{CTX} + <i>bla</i> _{TEM} + <i>aac</i> (1)	CTX-M-15+TEM-tipo+AAC (6')-Ib-cr (1)
$\beta + S + A$ (3) ^a	<i>bla</i> _{CTX} + <i>bla</i> _{TEM} (3)	CTX-M-27+TEM-tipo (3)
$\beta + S$ (1)	<i>bla</i> _{TEM} (1)	TEM-1
$\beta + Q$ (3)	<i>bla</i> _{CTX} + <i>bla</i> _{TEM} (3)	CTX-M-15+TEM-tipo (3)
Q (1)	<i>ampC</i> (1) ^b	AmpC (1) ^b

^a Perfis de multirresistência.

^b Isolados onde apenas foi detetada a presença do gene *ampC*, que codifica a enzima AmpC cromossômica (presente em todos os isolados, embora não seja apresentada na tabela).

3.2. Fenótipo vs Genótipo: estirpes de origem animal

Nos isolados de origem animal foram detetados cinco perfis de resistência distintos, sendo dois de multirresistência.

O perfil genotípico predominante nas estirpes de origem animal, *bla*_{SHV-12} (n=5), está associado a três perfis de resistência diferentes, embora nenhum destes seja um perfil de multirresistência (Tabela 14). De destacar ainda que as três estirpes para as quais apenas foi detetada a presença do gene ubiquitário *ampC* apresentam três perfis de resistência distintos, sendo dois perfis de multirresistência. A estirpe para a qual não foi detetado nenhum gene de resistência a antibióticos apresenta resistência aos antibióticos β-lactâmicos, nomeadamente à amoxicilina e à ampicilina.

Todas as estirpes que têm no seu genótipo genes *bla*_{CTX} são resistentes à cefotaxima, mas apenas as duas estirpes com a enzima CTX-M-32 são também resistentes à ceftazidima.

Tabela 14: Perfis de resistência aos antibióticos dos 17 isolados de *E. coli* de origem animal, associados aos genótipos e enzimas detetadas em cada isolado.

Perfis de resistência (nº de isolados)	Genótipo (nº de isolados)	Enzimas (nº de isolados)
β + Q + S + A (2) ^a	<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV} (1) <i>ampC</i> (1) ^b	TEM-1+SHV-12 (1) AmpC (1) ^b
β + Q + S (3) ^a	<i>bla</i> _{CTX} + <i>bla</i> _{TEM} (1) <i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{SHV} + <i>qnrB</i> (1) <i>ampC</i> (1) ^b	CTX-M-166+TEM-1 (1) TEM-1+SHV-12+QnrB19 (1) AmpC (1) ^b
β + Q (7)	<i>bla</i> _{TEM} (1) <i>bla</i> _{TEM} + <i>aac</i> (1) <i>bla</i> _{CTX} (2) <i>bla</i> _{SHV} (2) <i>ampC</i> (1) ^b	TEM-52 (1) TEM-1+ AAC (6')-Ib (1) CTX-M-32 (2) SHV-12 (2) AmpC (1) ^b
Q + A (1)	<i>bla</i> _{SHV} (1)	SHV-12 (1)
β (4)	<i>bla</i> _{CTX} (1) <i>bla</i> _{SHV} (2) - (1) ^c	CTX-M-1 (1) SHV-12 (2) - (1) ^c

^a Perfis de multirresistência.

^b Isolados para os quais apenas foi detetada a presença do gene ubiquitário *ampC*, o qual codifica uma AmpC cromossômica. Embora não representado, este gene e enzima estão presentes em todos os isolados, exceto nos assinalados com ^c.

^c Isolado no qual não foi detetado nenhum gene de resistência aos antibióticos.

4. Transferência horizontal de genes

Como já foi referido anteriormente, durante a realização deste estudo foi identificada uma nova β -lactamases da família CTX, a enzima CTX-M-166. Com o objetivo de compreender as implicações que a nova mutação, localizada na posição aminoacídica 120 desta enzima, tem na hidrólise de antibióticos β -lactâmicos, procedeu-se à sua caracterização bioquímica. Tal como foi previamente indicado, a enzima CTX-M-1 foi utilizada para comparação no estudo enzimático. Assim, o primeiro passo foi a transferência dos genes $bla_{\text{CTX-M-1}}$ e $bla_{\text{CTX-M-166}}$, em separado, para um ambiente genético conhecido.

4.1. Conjugação

O primeiro método utilizado para tentar isolar os genes $bla_{\text{CTX-M-1}}$ e $bla_{\text{CTX-M-166}}$ foi a conjugação bacteriana. Primeiramente, realizou-se a conjugação entre as estirpes portadoras dos genes em estudo e a estirpe recetora *E. coli* J₅₃ NaN_{3R}. Este processo de conjugação foi bem sucedido apenas para o gene $bla_{\text{CTX-M-1}}$. Não tendo sido possível realizar a transferência do gene $bla_{\text{CTX-M-166}}$, tentou-se a conjugação com a estirpe recetora *E. coli* C600 Rif_R. Contudo, não foi possível, mais uma vez, realizar a transferência do gene $bla_{\text{CTX-M-166}}$ para a estirpe recetora. Após várias tentativas de conjugação e a utilização de células recetoras distintas, colocou-se de parte a conjugação bacteriana, avançando-se, assim, para a outra técnica de transferência de ADN.

4.2. Transformação

Em alternativa à conjugação bacteriana, foi realizada a transferência direta de ADN plasmídico, extraído a partir das estirpes portadoras das enzimas CTX-M-1 e CTX-M-166, para as células competentes One Shot® TOP10, por transformação com choque térmico. Igualmente, a transferência apenas ocorreu com sucesso para o ADN plasmídico contendo o gene $bla_{\text{CTX-M-1}}$.

4.3. Clonagem

Os genes $bla_{\text{CTX-M-1}}$ e $bla_{\text{CTX-M-166}}$, foram clonados, em separado, com sucesso, no vetor $pCR^{\text{®}}$ -Blunt, que, posteriormente, foi transformado por choque térmico em células *E. coli* competentes, One Shot® TOP10. Desta forma foi possível isolar os genes em estudo num ambiente genético conhecido (isogénico), possibilitando, assim, prosseguir com a caracterização bioquímica e com o estudo cinético da nova enzima CTX-M-166.

5. β -lactamase CTX-M-166

A enzima CTX-M-166 identificada no decorrer deste trabalho apresenta a seguinte sequência aminoacídica, onde está destacada a valina na posição 120 (a vermelho).

MVKKSLRQFT	LMATATVTLL	LGSVPLYAQT	ADVQQKLAEL	ERQSGGRLGV	ALINTADNSQ
ILYRADERFA	MCSTSKVMAV	AAVLKKESE	PNLLNQRVEI	KKSDLVNYNP	IAEKHVDGTM
SLV EL SAAAL	QYSDNVAMNK	LISHVGGPAS	VTAFARQLGD	ETFRLDRTEP	TLNTAIPGDP
RDTTSPRAMA	QTLRNLTGK	ALGDSQRAQL	VTWMKGNTTG	AASIQAGLPA	SWVVGDKTGS
GDYGTTNDIA	VIWPKDRAPL	ILVTYFTQPQ	PKAESRRDVL	ASAAKIVTNG	L

Na Figura 8, está apresentada a modelização 3D da β -lactamase CTX-M-166 obtida com o programa Phyre2 (Protein Homology / analogY Recognition Engine V 2.0). Aí se verifica que a substituição Ala120Val, a única diferença entre a nova enzima e a enzima parental CTX-M-1, não está situada nem no local de ligação do substrato, nem nos locais responsáveis pela catálise, ou seja, os sítios catalíticos.

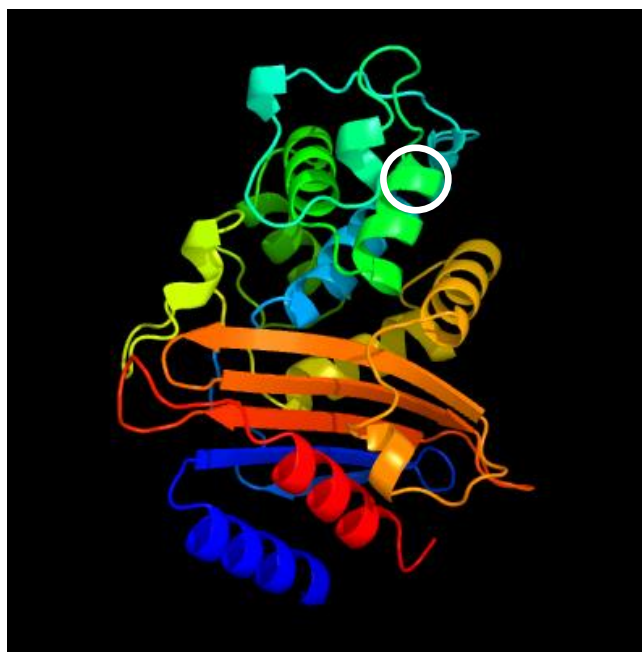


Figura 8: Estrutura 3D da enzima CTX-M-166. O círculo branco na figura representa a localização da mutação identificada, neste caso a valina na posição 120.

6. CIMs enzimas CTX-M-1 e CTX-M-166

Para inferir qual o efeito que a mutação Ala120Val tem em termos de suscetibilidade aos antibióticos realizou-se um TSA, por difusão em disco, para as células transformadas com os genes *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-166} (Tabela 15). A comparação entre os resultados obtidos para as enzimas CTX-M-1 e CTX-M-166 permitiu verificar que a nova enzima apenas perdeu a capacidade de conferir resistência ao monobactame aztreoname. Verificou-se ainda que as CIMs estimadas para a nova enzima diminuíram em relação às CIMs estimadas para a enzima parental, nomeadamente nos antibióticos seguintes: piperacilina, cefotaxima, cefepima e aztreoname. As CIMs estimadas para a ceftazidima e ceftriaxona apenas têm uma diluição de diferença, pelo que não deverá ser considerada. O ceftiofur, por ser uma cefalosporina de 3ª de geração utilizada exclusivamente em animais, não tem *breakpoints* estabelecidos pelo EUCAST (2014), tendo sido aplicados os *breakpoints* do CA-SFM (*Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*) para a veterinária; assim, neste caso, não foi possível calcular as CIMs para este antibiótico.

Tabela 15: Resultados dos testes de suscetibilidade realizados com as células *E. coli* TOP10 transformadas com os genes *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-166}.

Antibiótico	<i>E. coli</i> TOP10 (<i>bla</i> _{CTX-M-1})			<i>E. coli</i> TOP10 (<i>bla</i> _{CTX-M-166})		
	Diâmetro ^a	Suscetibilidade ^b	CIM ^c	Diâmetro ^a	Suscetibilidade ^b	CIM ^c
Ampicilina	6	R	>8	6	R	>8
Piperacilina	7	R	256	8	R	128 ↓
Cefuroxima	6	R	>8	6	R	>8
Cefotaxima	6	R	32	14	R	4 ↓
Ceftazidima	23	S	1	24	S	0.5
Cefpodoxima	6	R	>1	9	R	>1
Ceftriaxona	15	R	8	19	R	4
Ceftiofur	18	I ^d	-	20	I ^d	-
Cefepima	24	S	1	45	S	<0.06 ↓
Ceftarolina	6	R	>0.5	7	R	>0.5
Aztreoname	18	R	16	27	S	0.25 ↓
Imipeneme	45	S	<0.06	45	S	<0.06

^a Diâmetro dos halos de inibição, em milímetros, registados nos TSAs realizados por difusão em disco.

^b Categoria de suscetibilidade de acordo com os *breakpoints* definidos pelo EUCAST, 2015.

^c CIMs, em µg/ml, estimadas computacionalmente a partir dos diâmetros dos halos de inibição registados.

^d Categoria de suscetibilidade de acordo com os *breakpoints* definidos pelo CA-SFM, 2014.

S, I, R – Suscetível, suscetibilidade intermédia, resistência (respetivamente).

↓ - Indicação de que as CIMs estimadas para a nova enzima diminuíram em relação às CIMs estimadas para a enzima parental.

7. Propriedades bioquímicas da nova enzima CTX-M-166

7.1. Purificação das enzimas e avaliação da pureza por SDS-PAGE

A enzima CTX-M-166, assim como a enzima CTX-M-1 utilizada para comparação, foram extraídas e purificadas a partir das células *One Shot® TOP10* transformantes, que possuíam os genes $bla_{CTX-M-166}$ e $bla_{CTX-M-1}$, respetivamente, com o objetivo de caracterizar a nova β -lactamase.

A purificação foi realizada por cromatografia de troca iónica, cromatografia de filtração em gel e por uma reação de troca de tampão. A contribuição de cada etapa da purificação, assim como, a pureza final das enzimas foi determinada através da realização de um SDS-PAGE. A realização desta eletroforese permitiu ainda determinar/confirmar o peso molecular das enzimas, por comparação com o marcador de pesos moleculares utilizado. Ambas as enzimas apresentaram o mesmo peso molecular, de aproximadamente 28 kD. Contudo, a eficiência da purificação foi diferente entre enzimas, com 95% para a enzima CTX-M-166 e 75% para a CTX-M-1. A concentração dos dois extratos proteicos purificados foi de 2428 $\mu\text{g/ml}$ para a enzima CTX-M-166 e de 2184 $\mu\text{g/ml}$ para a enzima CTX-M-1.

7.2. Parâmetros cinéticos da enzima CTX-M-166

Os parâmetros cinéticos k_{cat} , K_m e a razão k_{cat}/K_m da enzima CTX-M-166 e da enzima parental CTX-M-1 são apresentados na Tabela 16. Globalmente, para os 12 antibióticos β -lactâmicos testados, os níveis de atividade catalítica da β -lactamase CTX-M-166 são menores do que os níveis observados para a enzima CTX-M-1, tal como indicado pelos valores de k_{cat} . Em termos de afinidade da enzima CTX-M-166 (K_m), verificou-se um aumento (correspondente a um valor de K_m inferior) para a penicilina G, piperacilina, cefotaxima e ceftiofur, e diminuição de afinidade (K_m superior) para a amoxicilina, cefalotina, cefuroxima, cefepima e aztreoname, em relação à afinidade registada para CTX-M-1. Porém, a enzima CTX-M-166 apresentou uma eficiência catalítica (k_{cat}/K_m), menor para todos os antibióticos, em relação aos valores apresentados pela enzima parental CTX-M-1. Esta redução da eficiência catalítica resulta da combinação entre a diminuição da atividade catalítica e da afinidade para os antibióticos β -lactâmicos.

A cefalotina, cefalosporina de 1ª geração, foi o antibiótico para o qual ambas as β -lactamases estudadas apresentaram maior atividade catalítica, 598,4 s^{-1} e 81,1 s^{-1} para CTX-M-1 e CTX-M-166, respetivamente. No que diz respeito à nova enzima, os três antibióticos onde se registou maior eficiência catalítica foram, por ordem decrescente, penicilina G, cefalotina e

piperacilina. Os três antibióticos onde se registou menor eficiência catalítica foram, por ordem crescente, aztreoname, cefepima e ticarcilina. No extremo oposto encontram-se a ceftazidima e o imipeneme, uma cefalosporina de 3ª geração e um carbapenéme, para os quais não houve qualquer hidrólise enzimática.

Para além dos parâmetros cinéticos da nova enzima, calculou-se também a eficiência global que esta apresenta em relação à enzima parental. Esta eficiência foi calculada a partir da comparação entre as eficiências catalíticas (k_{cat}/K_m) determinadas para ambas as enzimas, e considerando os valores da enzima CTX-M-1 como 100%. Desta forma foi possível quantificar a redução de eficiência já abordada. Assim, verifica-se que o antibiótico para o qual a enzima CTX-M-166 perdeu mais eficiência foi a amoxicilina, mantendo apenas 2,7% da eficiência da enzima parental. Por outro lado, o ceftiofur foi o antibiótico para o qual a nova enzima perdeu menos eficiência, apresentando 30,2% da eficiência da β -lactamase CTX-M-1.

Tabela 16: Parâmetros cinéticos e respetivos desvios-padrão para as β -lactamases CTX-M-1 e CTX-M-166.

Substrato	CTX-M-1			CTX-M-166			Eficiência ^a (%)
	kcat (s ⁻¹)	Km (μ M)	kcat/Km (μ M ⁻¹ .s ⁻¹)	kcat (s ⁻¹)	Km (μ M)	kcat/Km (μ M ⁻¹ .s ⁻¹)	
Penicilina G	87,7 \pm 1,8	14 \pm 0,5	6,453	8,2 \pm 0,2	8 \pm 0,03	0,996	15,4
Amoxicilina	31,4 \pm 0,6	10 \pm 0,3	3,097	3,1 \pm 0,1	37 \pm 0,6	0,084	2,7
Ticarcilina	7,3 \pm 0,4	21 \pm 0,1	0,354	0,5 \pm 0,002	21 \pm 0,03	0,024	6,8
Piperacilina	32,7 \pm 1,2	6 \pm 0,5	5,512	2,4 \pm 0,01	3 \pm 0,2	0,685	12,4
Cefalotina	598,4 \pm 95,1	57 \pm 3,0	10,683	81,1 \pm 1,4	85 \pm 2,3	0,954	8,9
Cefuroxima	77,6 \pm 2,7	17 \pm 0,5	4,543	8,0 \pm 0,7	36 \pm 0,5	0,225	5,0
Cefotaxima	129,9 \pm 0,6	127 \pm 1,9	1,021	8,3 \pm 0,3	69 \pm 1,8	0,124	12,2
Ceftazidima	<0,01	170 \pm 2,5	0,000	<0,01	ND	ND	ND
Ceftiofur	5,5 \pm 0,4	46 \pm 1,1	0,120	0,6 \pm 0,004	15 \pm 0,3	0,036	30,2
Cefepima	2,3 \pm 0,6	26 \pm 0,6	0,089	1,6 \pm 0,2	102 \pm 3,0	0,015	17,3
Aztreoname	2,1 \pm 0,006	29 \pm 0,7	0,073	0,2 \pm 0,005	41 \pm 0,1	0,005	7,0
Imipeneme	<0,01	107 \pm 8,7	0,000	<0,01	ND	ND	ND

^a Eficiência de CTX-M-166 relativamente a CTX-M-1, cuja eficiência foi fixada em 100%.

ND – não determinável

A IC_{50} foi também determinada para ambas as enzimas a partir da velocidade inicial de hidrólise da penicilina G à concentração de 2 mg/ml e do volume de inibidor utilizado em cada reação enzimática para CTX-M-1 e CTX-M-166, Figura 9 e 10, respectivamente.

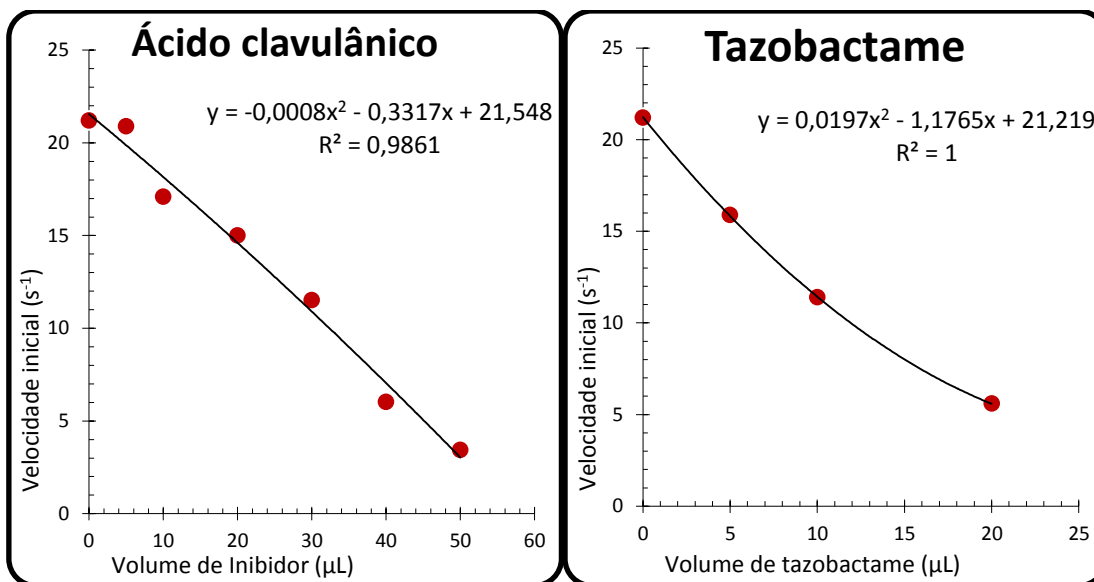


Figura 9: Correlação entre a velocidade inicial de hidrólise da penicilina G pela enzima parental CTX-M-1 e o volume de inibidor utilizado, ácido clavulânico à esquerda e tazobactame à direita.

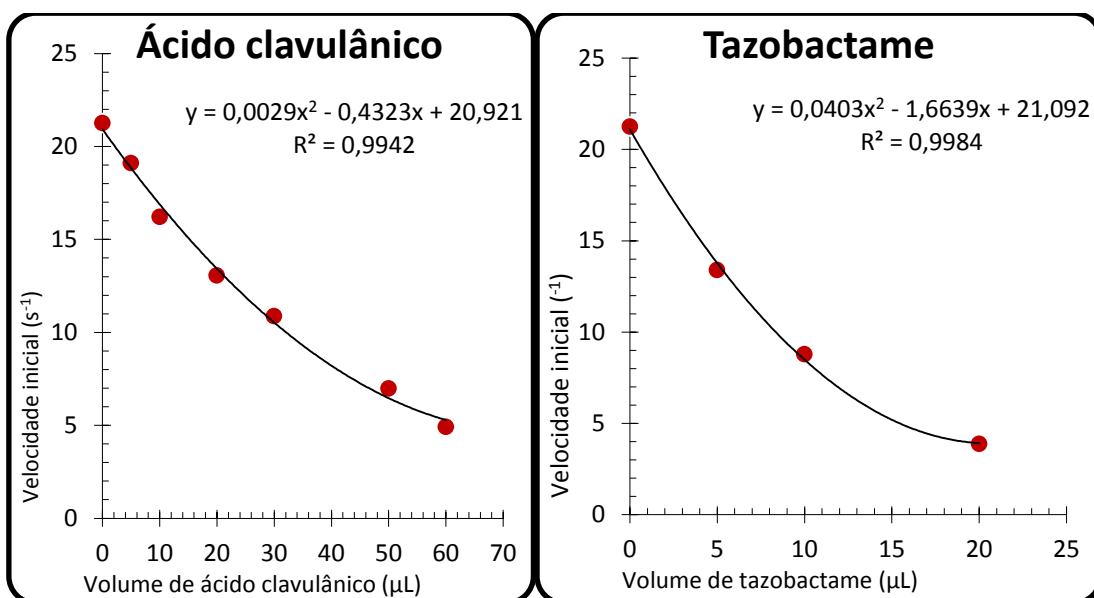


Figura 10: Correlação entre a velocidade inicial de hidrólise da penicilina G pela enzima CTX-M-166 e o volume de inibidor utilizado, ácido clavulânico à esquerda e tazobactame à direita.

Os valores de IC_{50} obtidos para as β -lactamases CTX-M-1 e CTX-M-166 são apresentados na Tabela 17. Para ambos os inibidores estudados, não se verificam alterações significativas dos valores de IC_{50} da nova enzima em relação à enzima parental.

Tabela 17: Valores de IC_{50} para as enzimas CTX-M-1 e CTX-M-166, para os inibidores de β -lactamases ácido clavulânico e tazobactame.

Inibidor de β -lactamase	IC_{50} (μM)	
	CTX-M-1	CTX-M-166
Ácido clavulânico	0,031	0,030
Tazobactame	0,07	0,005

8. Mutagénese do gene $bla_{CTX-M-15}$

Do grupo dos genes bla_{CTX-M} detetados e identificados, o gene $bla_{CTX-M-15}$ foi o mais prevalente. Assim, o processo de mutagénese dirigida teve como alvo o aminoácido 69 (cisteína) do gene $bla_{CTX-M-15}$. Terminado o processo de mutagénese obtiveram-se diversas colónias resistentes à cefotaxima, no entanto, após extração de ADN e sequenciação do gene bla_{CTX-M} presente, verificou-se que se tratava do gene $bla_{CTX-M-15}$ original, sem mutações. O processo de mutagénese foi repetido diversas vezes e em diferentes condições, porém, o resultado foi idêntico, não tendo sido, assim, possível a criação de mutantes no tempo disponível para estudo.

IV-Discussão

Nos dias de hoje, a situação relativa à problemática da resistência aos antibióticos é alarmante, e põe em causa a capacidade de tratar infeções, tanto a nível comunitário como a nível hospitalar. Esta ineficácia de tratamento promove o aumento da morbidade e mortalidade associadas às infeções bacterianas (Rossolini et al., 2014), com a agravante que infeções comuns, tratadas com facilidade, podem deixar de ser tratáveis ou, pelo menos, deixar de ser tratadas facilmente, passando desta forma a representar sérios riscos para a saúde humana (WHO, 2015). Este é um problema que afeta todas as classes de antibióticos existentes, observando-se que o consumo de antibióticos está diretamente relacionado com o desenvolvimento de mecanismos de resistência (Bell et al., 2014; Rossolini et al., 2014).

As *Enterobacteriaceae*, bactérias de Gram-negativo, são responsáveis por grande parte das infeções adquiridas na comunidade e nosocomiais existentes, verificando-se uma grande prevalência, com tendência a aumentar, de *E. coli* produtoras de ESBL, nomeadamente a nível da comunidade (Rossolini et al., 2014; Vasoo et al., 2015). A família CTX-M é a família com maior prevalência dentro do grupo das ESBLs, sendo *E. coli* o agente patogénico, produtor de CTX-M, que apresenta maior expressão (Cantón et al., 2012). Desta forma, a amostra em estudo é constituída exclusivamente por bactérias pertencentes à espécie *E. coli*, uma bactéria comensal no homem e nos animais (Tadesse et al., 2012).

No presente estudo, avaliou-se a suscetibilidade de 51 estirpes de origem clínica e 17 de origem animal a antibióticos pertencentes a classes estruturais distintas, permitindo, portanto, também, a análise da multirresistência. A suscetibilidade foi determinada com 26 antibióticos, dos quais 18 são antibióticos β -lactâmicos. A resistência a esta classe de antibióticos devido à produção de β -lactamases constitui um grave problema, devido à sua grande utilização a nível clínico (Bush, 2013). De facto, os antibióticos β -lactâmicos são a classe de antibióticos mais utilizada a nível hospitalar, em Portugal e noutros países (ESAC-Net, 2014).

A percentagem de isolados de *E. coli* resistentes aos antibióticos, na Europa, tem aumentado nos últimos anos conforme reportado pela Rede Europeia de Vigilância da Resistência Antimicrobiana – EARS-Net (EARS-Net, 2014). De facto, os resultados do presente estudo demonstraram que todas as estirpes estudadas são resistentes a, pelo menos, uma classe de antibióticos; 97%, apresentam resistência às penicilinas. Sabendo que o consumo de antibióticos conduz ao aparecimento de mecanismos de resistência (Bell et al., 2014), a elevada percentagem de estirpes resistentes às penicilinas estará correlacionada com o elevado consumo de antibióticos deste grupo. De acordo com a Rede Europeia de Vigilância do Consumo de Antimicrobianos – ESAC-Net, as penicilinas, em 2013, tal como em anos anteriores, foram o grupo de antibióticos mais consumido em Portugal, assim como nos restantes países da União Europeia (ESAC-Net, 2014). Em Portugal, a amoxicilina, uma

penicilina, foi o antibiótico mais utilizado na prática clínica e veterinária, entre 2010 e 2011 (Almeida et al., 2014).

Em relação às cefalosporinas de 3ª geração, foi detetada uma grande percentagem de estirpes com suscetibilidade diminuída a, pelo menos, um desses antibióticos (entre os ensaiados): 96% das estirpes de origem clínica e 88% das de origem animal. A elevada percentagem de estirpes de origem humana resistentes às cefalosporinas de 3ª geração detetada vai ao encontro dos dados da EARS-Net, que, no período entre 2010 e 2013, registou um aumento significativo de resistência a esta categoria de antibióticos, em *E. coli* (EARS-Net, 2014). No que diz respeito às cefalosporinas de 4ª geração, concretamente à cefepima, a suscetibilidade diminuída foi detetada em 84% das estirpes de origem humana e apenas 24% das estirpes de origem animal.

De acordo com os resultados obtidos, todas as estirpes estudadas são suscetíveis aos carbapenêms, os quais se apresentam como possíveis alternativas terapêuticas a infeções causadas por isolados produtores de ESBL resistentes a outros antibióticos β -lactâmicos, tais como, as cefalosporinas de 3ª e 4ª geração. Estes resultados estão de acordo com um estudo levado a cabo, em Portugal durante 2004 e 2006, onde apenas o imipeneme e meropeneme mantinham a sua efetividade contra isolados de *E. coli* produtores de ESBL (Mendonça et al., 2007). Apesar de não ter sido detetada diminuição de suscetibilidade aos carbapenêms naquele período de estudo, posteriormente, em Portugal, já foram detetados isolados de *E. coli* de origem clínica produtores de KPC-3 (Manageiro et al., 2015a) e OXA-48 (Manageiro et al., 2014b), assim como, no ambiente, estirpes de *E. coli* produtoras de KPC-2 (Poirel et al., 2012b) e GES-5 (Manageiro et al., 2014a). Contudo, o nível de resistência aos carbapenêms, em isolados invasivos de *E. coli*, apesar de estar a aumentar na Europa, mantém-se num nível reduzido (EARS-Net, 2014). A utilização de carbapenêms não é autorizada em medicina veterinária, excetuando circunstâncias específicas, tais como a presença de *Enterobacteriaceae* multirresistentes em animais de companhia e cavalos (Woodford et al., 2014). Contudo, más práticas de utilização destes antibióticos podem contribuir para a seleção e disseminação de estirpes resistentes. Desta forma, vários estudos do sector veterinário já reportaram a presença de bactérias produtoras de OXA-48 (Stolle et al., 2013; Seiffert et al., 2014; Woodford et al., 2014).

A resistência/suscetibilidade diminuída às combinações entre antibióticos β -lactâmicos e inibidores de β -lactamases foi identificada em 84% dos isolados de origem clínica. No entanto, apenas 18% dos isolados de origem animal apresentavam esse fenótipo. Foi identificada uma estirpe de origem humana produtora de TEM-30/IRT-2, isto é, uma β -lactamase capaz de explicar este fenótipo. De facto, o TSA da estirpe onde foi detetada esta enzima, apresentou

halos de inibição com menor diâmetro para as três combinações antibiótico/inibidor utilizadas. Contudo, este fenótipo pode ser explicado por outros mecanismos, entre os quais se destacam a produção de enzimas AmpC (Cantón et al., 2008; Jacoby, 2009; Drawz e Bonomo, 2010; Tang et al., 2014) e a produção de enzimas OXA-tipo (Cantón et al., 2008), também detetadas no presente estudo. A hiperprodução de enzimas TEM e SHV parentais (Rice et al., 2000; Cantón et al., 2008; Drawz e Bonomo, 2010) e a redução da permeabilidade (Cantón et al., 2008), podem, igualmente, explicar o fenótipo de resistência aos inibidores.

Desde a introdução das fluoroquinolonas no mercado, que se tem vindo a verificar a sua crescente utilização à escala mundial (Aldred et al., 2014; Redgrave et al., 2014). Associado a este consumo está o aumento da identificação de bactérias de Gram-positivo e Gram-negativo resistentes às fluoroquinolonas, isoladas quer em humanos quer em animais (Strahilevitz et al., 2009; Dalhoff, 2012; EARS-Net, 2014; Aldred et al., 2014; Redgrave et al., 2014). Neste trabalho detetaram-se 88% de estirpes com suscetibilidade reduzida a pelo menos uma das fluoroquinolonas ensaiadas (92% nas estirpes de origem clínica e 76% nas estirpes de origem animal). Os níveis de resistência/suscetibilidade reduzida observados são justificados, em parte, pela presença dos genes plasmídicos *qnr* e *aac* detetados, particularmente o gene *aac(6')-Ib-cr*, o qual corresponde a uma acetil-transferase com capacidade de conferir resistência, para além das fluoroquinolonas, à amicacina, gentamicina e tobramicina (Robicsek et al., 2006; Strahilevitz et al., 2009). Os fenótipos observados nos isolados onde não foram detetados quaisquer genes de resistência às fluoroquinolonas podem ter origem noutros mecanismos, nomeadamente cromossómicos, onde se englobam mutações nas proteínas alvo destes antibióticos (ADN girase e topoisomerase IV) (Dalhoff, 2012; Aldred et al., 2014; Redgrave et al., 2014), diminuição da permeabilidade (por sub-regulação dos genes codificantes de porinas) (Aldred et al., 2014; Redgrave et al., 2014) e ação de bombas de efluxo cromossomais (AcrAB-TolC) (Dalhoff, 2012; Redgrave et al., 2014).

Em relação aos aminoglicosídeos observou-se uma grande diferença entre a percentagem de estirpes de origem clínica e de origem animal com suscetibilidade diminuída, 73% e 12%, respetivamente. Para os aminoglicosídeos, tal como para as sulfonamidas (trimetoprim/tulfametoxazol), para as quais 59% dos isolados apresentaram suscetibilidade diminuída, não foi realizada a pesquisa de genes de resistência específicos. A suscetibilidade observada pode dever-se à diminuição na permeabilidade de ambas as classes de antibióticos através da membrana celular (Cambau e Guillard, 2012; Lambert, 2012), ou ainda outros mecanismos, como modificação enzimática no caso dos aminoglicosídeos (Lambert, 2012) e produção de proteínas alvo resistentes à ação do antibiótico, no caso das sulfonamidas (Cambau e Guillard, 2012).

Em termos quantitativos, as estirpes de origem clínica demonstraram ser menos suscetíveis do que as estirpes de origem animal para todos os antibióticos ensaiados, especialmente em relação à classe de aminoglicosídeos e nas combinações de antibióticos com inibidores de β -lactamases. Esta discrepância deve-se ao facto dos aminoglicosídeos usados no presente estudo (amicacina, gentamicina e tobramicina) serem utilizados maioritariamente em medicina clínica, ao contrário do que acontece em medicina veterinária (Lambert, 2012). Em relação aos inibidores de β -lactamases verifica-se que apenas uma das combinações (amoxicilina/ácido clavulânico) tem aprovação para ser utilizada em medicina veterinária (FDA, 2015).

Globalmente, 90% dos isolados de origem clínica e 29% dos isolados de origem animal apresentam fenótipos de multirresistência aos antibióticos. Aquelas percentagens elevadas estão de acordo com a informação do aumento progressivo de multirresistência em *E. coli*, na Europa (Allocati et al., 2013; EARS-Net, 2014). O perfil de multirresistência mais vezes registado engloba suscetibilidade diminuída às seguintes classes de antibióticos: β -lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e sulfonamidas. Os resultados obtidos de 74% de estirpes clínicas com fenótipo de multirresistência são concordantes com os dados divulgados pela EARS-Net, que, entre 2010 e 2013, detetou um aumento do número de isolados de *E. coli* com resistência a antibióticos β -lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, simultaneamente (EARS-Net, 2014).

Tendo em conta as consequências da resistência aos antibióticos β -lactâmicos e a contribuição que têm em fenótipos de multirresistência, foram investigados os mecanismos/genes associados à produção de β -lactamases e à resistência às fluoroquinolonas. Globalmente, foram detetados 50 genes *bla*_{CTX-M}, 28 genes *bla*_{TEM}, 27 genes *bla*_{OXA}, 8 genes *bla*_{SHV}, 2 *bla*_{CMY}, 1 *bla*_{DHA}, 27 genes *aac* e 1 *qnr*.

As ESBLs CTX-M foram descritas pela primeira vez no final da década de 80. A partir desse momento estas enzimas alastraram-se, atingindo um elevado nível de disseminação global, tornando-se nas ESBLs predominantes em *Enterobacteriaceae*, substituindo, assim, as ESBLs da família TEM e SHV (Cantón et al, 2012; D'Andrea et al, 2013; Lahlaoui et al., 2014). Os resultados obtidos no presente estudo corroboram a elevada prevalência destas enzimas, pois 90% e 24% dos isolados de origem clínica e animal, respetivamente, transportavam um gene *bla*_{CTX-M}. Nos isolados de origem animal foi detetada também a presença de um gene que codifica uma enzima descrita, neste estudo, pela primeira vez, a enzima CTX-M-166. De facto, a disseminação de enzimas CTX-M não se restringe aos humanos, sendo estas enzimas também encontradas em animais e no ambiente (Cantón et al, 2012; D'Andrea et al, 2013; Lahlaoui et al., 2014).

Neste trabalho, foram identificadas β -lactamases CTX-M dos grupos 1 e 9, sendo a enzima CTX-M-15, do grupo 1, a β -lactamase predominante, pois foi detetada em 63% dos isolados de origem clínica. Esta enzima tem uma disseminação global, sendo, frequentemente, detetada em *E. coli* (Hawkey e Jones, 2009; Cantón et al, 2012; D'Andrea et al, 2013; Lahlaoui et al., 2014; Shaikh et al, 2015). Em Portugal, tem sido identificada com elevada prevalência em isolados clínicos obtidos no âmbito de diferentes estudos, e que incluem isolados coletados entre os anos 2003 e 2010 (Machado et al., 2006; Mendonça et al., 2007; Caniça et al., 2011; Fróis e Silva, 2011; Fernandes et al., 2014; Jones-Dias et al., 2014). De realçar que, em estudos efetuados por Mendonça *et al.* (2007) e Jones-Dias *et al.* (2014), a enzima CTX-M-15 foi detetada em 60% e 66% dos isolados de *Enterobacteriaceae* analisados, respetivamente, o que está de acordo com o identificado no presente trabalho.

A elevada prevalência de ESBLs CTX-M, particularmente, da enzima CTX-M-15, deve-se à presença do gene que a codifica em vários elementos genéticos móveis, nomeadamente em plasmídeos do grupo de incompatibilidade FII (Cantón et al, 2012; D'Andrea et al, 2013), e/ou à associação a sequências de inserção, com particular destaque para a *ISEcp1*, encontrada, frequentemente, em regiões a montante do gene *bla*_{CTX-M-15} (Bonnet, 2004; Mendonça et al., 2007; Cantón et al, 2012; D'Andrea et al, 2013; Lahlaoui et al., 2014).

Outro mecanismo que contribui para a disseminação dos genes *bla*_{CTX-M} é a dispersão clonal. O melhor exemplo é o clone ST131 de *E. coli* que transporta, frequentemente, plasmídeos com o gene *bla*_{CTX-M-15}, cujo sucesso de disseminação tem sido alvo de estudo (Cantón et al, 2012; D'Andrea et al, 2013; Lahlaoui et al., 2014). A presença de genes de resistência a outras classes de antibióticos, em plasmídeos com o gene *bla*_{CTX-M}, pode constituir uma vantagem seletiva para as bactérias que os transportam e, assim, contribuir para a manutenção e propagação das enzimas CTX-M (Cantón et al, 2012).

As enzimas CTX-M do grupo 9 foram detetadas no presente estudo apenas em isolados de origem clínica. Foram identificadas as enzimas CTX-M-14 e CTX-M-27, com maior prevalência desta última (12% e 16%, respetivamente). A enzima CTX-M-14 é a β -lactamase do grupo 9 que maior disseminação e prevalência apresenta a nível mundial (Hawkey e Jones, 2009; Cantón et al, 2012; Lahlaoui et al., 2014). Em Portugal, desde a primeira identificação do gene *bla*_{CTX-M-14} em 2003, por Machado *et al.* (2004), esta β -lactamase tem também sido identificada como a mais prevalente neste grupo (Mendonça et al., 2007; Caniça et al., 2011; Manageiro et al., 2012; Fernandes et al., 2014; Jones-Dias et al., 2014; Rodrigues et al., 2015). Em relação à enzima CTX-M-27, esta foi identificada pela primeira vez no ano 2000 em França, diferenciando-se da enzima CTX-M-14 pela mutação Asp240Gly (Bonnet, 2003; Bonnet, 2004). Desde então foi identificada por todo o Mundo, mas com baixa incidência (Matsumura et al.,

2015). Contudo, em anos recentes têm-se verificado um aumento de clones ST131 produtores desta enzima em países Europeus (Blanc et al., 2014; Micenková et al., 2014) e Asiáticos (Adler et al., 2012; Xia et al., 2014; Matsumura et al., 2015). Em Portugal, por sua vez, a enzima CTX-M-27 foi recentemente detetada em clones ST131 isolados de humanos saudáveis (Rodrigues et al., 2015). A elevada prevalência da enzima CTX-M-27 registada neste trabalho sugere uma mudança no paradigma epidemiológico das enzimas CTX-M do grupo 9 a nível nacional, alertando para a necessidade da monitoração dos genótipos ESBLs circulantes no nosso país. Como complemento ao presente trabalho, será importante verificar se os isolados onde foram detetados os genes *bla*_{CTX-M-27} pertencem ao clone ST131.

Nos isolados de origem animal, foram detetados genes *bla*_{CTX-M} pertencentes apenas ao grupo 1, nomeadamente *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-32} e *bla*_{CTX-M-166}, este último identificado pela primeira vez neste trabalho. Em Portugal, os genes *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-32} foram reportados em estudos incluindo amostras quer de animais da cadeia alimentar, quer de animais selvagens (Costa et al., 2004; Costa et al., 2009; Poeta et al., 2008; Simões et al., 2010; Clemente et al., 2013).

Para além das ESBLs pertencentes à família CTX-M, foram também identificadas ESBLs do tipo TEM e SHV: TEM-30, TEM-52 e SHV-12. A enzima SHV-12 foi detetada em isolados de origem clínica (n=1) e animal (n=7), enquanto que as enzimas TEM-30 e TEM-52 foram detetadas apenas num isolado de origem clínica e num de origem animal, respetivamente. Em Portugal, as ESBLs TEM-52 e SHV-12 têm sido identificadas em humanos (Caniça et al., 2011; Manageiro et al., 2012; Fernandes et al., 2014; Jones-Dias et al., 2014), animais (Costa et al., 2004; Costa et al., 2006; Poeta et al., 2008; Costa et al., 2009; Carneiro et al., 2010; Simões et al., 2010; Gonçalves et al., 2012) e ambiente (Alves et al., 2014). A enzima TEM-30, também denominada de IRT-2, de acordo com o seu fenótipo de resistência aos inibidores de β-lactamases, foi identificada em Portugal pela primeira vez num isolado clínico coletado em 1999 (Caniça et al., 2002). Todas as estirpes onde foram identificados os genes *bla*_{TEM-52} e *bla*_{SHV-12} apresentam resistência aos antibióticos β-lactâmicos, inclusive à ceftazidima, à exceção de uma estirpe onde se identificou o gene *bla*_{SHV-12}. Esta estirpe é suscetível a todos os antibióticos β-lactâmicos testados, inclusivamente às penicilinas, o que sugere que, ou o gene não está a ser transcrito, ou é alvo de processos pós-transcricionais que impedem a sua tradução. Qualquer que seja a causa, tudo indica que a enzima SHV-12 não está presente na sua forma ativa, na referida estirpe.

No presente trabalho foram detetadas enzimas não ESBL, concretamente, a penicilinase TEM-1, produzida isoladamente ou em coprodução com outras β-lactamases. No grupo onde não existia coprodução com ESBLs identificaram-se dois isolados, um de origem clínica e um de

origem animal, com fenótipos ESBL, sugerindo que estas enzimas parentais estão a ser sobre-expressas, o que pode ocorrer através de mutações nucleotídicas na região do promotor e/ou pela presença de plasmídeos multicópia com o gene *bla* (Jacoby e Munoz-Price, 2005; Drawz e Bonomo, 2010). O fenótipo ESBL pode ainda ser explicado pela baixa expressão de OMPs em associação com a produção das enzimas TEM-1 detetadas (Wu et al., 2001).

A distinção entre β -lactamases AmpC cromossómicas e plasmídicas é importante do ponto de vista da suscetibilidade aos antibióticos, principalmente em *Enterobacteriaceae*. Em *E. coli* a AmpC cromossómica não é indutível e apresenta um nível de expressão basal baixo; no entanto, na presença de PMA β s podem ocorrer fenótipos de resistência a vários antibióticos β -lactâmicos, tais como ceftazidima e cefotaxima (Jacoby e Munoz-Price, 2005; Jacoby, 2009). As PMA β s têm sido identificadas por todo o Mundo, sendo a enzima CMY-2 a mais disseminada; esta enzima, ao contrário da PMA β DHA-1, não é indutível (Philippon et al., 2002; Jacoby, 2009). A identificação de isolados portadores destas enzimas é epidemiológica e clinicamente relevante devido às escassas opções de tratamento (Manageiro et al., 2015b).

No presente trabalho foram detetadas as enzimas CMY-2 (n=2) e DHA-1 (n=1), ambas em isolados de origem clínica. Em Portugal, estas enzimas têm vindo a ser detetadas em isolados de *Enterobacteriaceae* quer de origem clínica (Manageiro et al., 2012; Freitas et al., 2014; Jones-Dias et al., 2014), origem veterinária (Antunes et al., 2010) ou ambiental (Alves et al., 2014; Manageiro et al., 2014a). Isolados produtores de PMA β s são, frequentemente, co-produtores de outras β -lactamases, incluindo ESBLs, o que dificulta a sua deteção (Philippon et al., 2002). Tal verificou-se com as enzimas identificadas, pois cada um dos isolados produtores de CMY-2 continha também os genes *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{TEM-30/IRT-2}, respetivamente. O isolado onde foi detetada a enzima DHA-1 co-produzia também uma ESBL, a enzima SHV-12. Em termos de suscetibilidade aos antibióticos, nomeadamente à cefoxitina, verificou-se que os isolados portadores destas enzimas foram os mais resistentes. Contudo, verificou-se a presença de algumas estirpes com suscetibilidade reduzida à cefoxitina para as quais não foi detetada a presença de PMA β s, podendo este fenótipo, em *E. coli*, ser devido à perda de porinas na membrana externa (Jacoby, 2009). Assim, no presente estudo, identificaram-se estirpes de *Enterobacteriaceae* com resistência à cefoxitina, que, contudo, não eram produtoras de PMA β s, pelo que, apesar da cefoxitina ser um bom indicador fenotípico da sua presença, é necessária a confirmação através de PCR e sequenciação.

Nos isolados de origem animal, foram detetados três isolados com fenótipo ESBL, nos quais se identificou apenas a β -lactamase AmpC cromossómica. Devido à recente descrição de AmpCs de espectro estendido em animais, procedeu-se à sequenciação dos três genes *ampC* (Haenni et al., 2014). Após comparação com a sequência da *ampC* cromossómica da *E. coli*

ATCC 25922 verificou-se que nenhuma mutação coincidiu com mutações previamente descritas associadas a AmpCs de espectro estendido (Mammeri et al., 2006; Haenni et al., 2014). No entanto, encontraram-se duas substituições aminoacídicas comuns entre os três genes analisados; Lys175Gln e Ser193Pro. A primeira mutação, Lys175Gln, já foi previamente descrita, não estando associada ao aumento do espectro de ação da enzima AmpC (Mammeri et al., 2006). Em relação à mutação Ser193Pro, não foi ainda descrita, no entanto, esta mutação encontra-se localizada no *loop* Ω da enzima AmpC, podendo interferir em processos específicos da enzima, como o processo de catálise, a ligação do substrato e o reconhecimento molecular (Fetrow, 1995). Estudos cinéticos terão de ser realizados para avaliar a causa do fenótipo observado nestes três isolados.

No que diz respeito ainda aos isolados de origem animal, salienta-se o facto de que num isolado, resistente ao grupo das penicilinas e suscetível aos restantes antibióticos, não foi detetado o gene *ampC* cromossómico. No entanto, foi identificado, fenotipicamente como *E. coli*, com 99% de probabilidade e níveis de confiança excelentes. A não deteção do gene cromossómico *ampC* pode dever-se a mutações presentes na região de hibridação dos *primers* utilizados.

Neste estudo, a presença de genes *bla*_{CTX-M} esteve sempre associada à resistência aos antibióticos β -lactâmicos, nomeadamente às cefalosporinas de 3^a geração. Estes dados estão de acordo com o notório aumento da frequência de resistência às cefalosporinas de 3^a geração resultante, em parte, da difusão mundial de ESBLs CTX-M, com particular incidência em *E. coli* (Cantón et al., 2008; Park, 2014). Como esperado, a presença dos genes *aac* e *qnr* resultou sempre num fenótipo de resistência às fluoroquinolonas, levando em todos os casos à resistência aos três antibióticos estudados (ciprofloxacina, ofloxacina e levofloxacina). O perfil genotípico mais prevalente incluiu os genes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-tipo} e *aac (6')-Ib-cr*. A presença destes genes, em 45% dos isolados de origem clínica, evidência que este mecanismo de resistência é importante em Portugal, visto que, a ocorrência simultânea destes genes, em isolados clínicos, já foi também observada noutros trabalhos desenvolvidos a nível nacional (Machado et al., 2006; Mendonça et al., 2007; Jones-Dias et al., 2014), assim como, em vários países europeus (Coque et al., 2008). A presença simultânea destes genes pode ser explicada pela circunstância deste três genes estarem presentes no mesmo plasmídeo, facilitando assim a sua disseminação conjunta (Machado et al., 2006; Coque et al., 2008; Lahlaoui et al., 2014).

A nova β -lactamase CTX-M-166 (www.lahey.org/Studies), difere da enzima parental CTX-M-1 por uma substituição aminoacídica na posição 120, apresentando uma valina no lugar de uma alanina, ambos resíduos hidrófobos apolares, diferindo no tamanho da cadeia lateral.

A transferência horizontal do gene $bla_{\text{CTX-M-166}}$, para um ambiente isogénico, foi tentada por conjugação bacteriana e por transformação direta de ADN plasmídico, sem resultados positivos nos dois ensaios. O facto de o gene $bla_{\text{CTX-M-1}}$ ter sido transferido com sucesso, levou à pesquisa de uma eventual localização cromossómica do gene $bla_{\text{CTX-M-166}}$ por digestão do ADN cromossómico com a endonuclease *I-Ceu I*. Concluiu-se que o gene $bla_{\text{CTX-M-166}}$, tal como o gene $bla_{\text{CTX-M-1}}$, não é cromossómico; desta forma, tudo indica que o novo gene era transportado por um plasmídeo não conjugativo. Assim, seria importante investigar as sequências flanqueantes do gene $bla_{\text{CTX-M-166}}$ para avaliar a sua capacidade de disseminação horizontal através de elementos genéticos móveis, tal como, fazer o estudo da clonalidade da estirpe portadora deste gene.

A análise da estrutura tridimensional da enzima permitiu concluir que a mutação Ala120Val não se situa nem no centro catalítico, nem nos locais de ligação dos substratos. Assim, o efeito que esta mutação tem na hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos foi avaliado através da determinação das suas constantes cinéticas em comparação com as respetivas constantes da enzima parental CTX-M-1. Essa análise permitiu identificar uma maior afinidade de CTX-M-166 para as penicilinas (K_m , 3-37 μM) do que para as cefalosporinas (K_m , 15-170 μM), com exceção do ceftiofur (K_m , 15 μM). Efetivamente, o aumento de afinidade mais significativo foi observado para o ceftiofur, com redução do valor de K_m em três vezes. A cefalotina, uma cefalosporina de 1ª geração, e como tal, pouco ativa em bactérias de Gram-negativo, foi o melhor substrato para ambas as enzimas (CTX-M-1 e CTX-M-166), com um valor de k_{cat} para a cefalotina foi 7 e 10 vezes superior ao registado para a penicilina G, respetivamente.

A atividade catalítica de ambas as enzimas CTX-M para a cefotaxima (k_{cat} , 8.3-129.9 s^{-1}) foi superior à observada para a ceftazidima (k_{cat} , $<0.01 \text{ s}^{-1}$) e aztreoname (k_{cat} , 0.2-2.1 s^{-1}), corroborando os dados previamente descritos para outras enzimas CTX-M (Bonnet, 2003).

Globalmente, a enzima CTX-M-166 registou uma redução da eficiência catalítica (k_{cat}/K_m), em comparação aos valores observados para a enzima parental, devido, em grande parte, à diminuição da atividade catalítica (k_{cat}), ou seja, à diminuição da capacidade de hidrolisar os antibióticos β -lactâmicos. Na nova enzima não foi possível registar atividade hidrolítica contra a ceftazidima e o imipeneme, tal como acontece, no caso deste último, para a maioria das ESBLs de classe A (Bonnet, 2004). A enzima CTX-M-166 manteve, aproximadamente 30% da eficiência da enzima CTX-M-1, em oposição à amoxicilina que foi o antibiótico mais afetado pela mutação Ala120Val, mantendo 2,7% da eficiência da enzima parental. O ceftiofur é o único dos substratos testados cujo uso é exclusivo da medicina veterinária (FDA, 2015). Os resultados obtidos no presente estudo são muito importantes, pois sugerem que a mutação Ala120Val contribui mais para a estabilidade da enzima do que para a

catálise ou ligação do substrato. Assim, a pressão seletiva do uso de antibióticos, particularmente do ceftiofur em ambiente veterinário, pode contribuir decisivamente para a emergência de mutações responsáveis pelo aumento da atividade catalítica e consequente resistência a antibióticos.

Os resultados da suscetibilidade aos antibióticos das estirpes contendo os genes *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-166}, foram concordantes com a redução generalizada da eficiência catalítica da enzima CTX-M-166, ou seja, verificou-se uma diminuição das CIMs nas células transformadas com o gene *bla*_{CTX-M-166}. A enzima CTX-M-166 apenas perdeu a capacidade de conferir resistência ao aztreoname; apesar de ter ocorrido uma diminuição do nível de resistência a todos os antibióticos testados.

Quanto à ação dos inibidores de β -lactamases testados verificaram-se valores semelhantes de atividade na β -lactamase CTX-M-166, em relação à enzima CTX-M-1. Como na generalidade das ESBLs de classe A, as enzimas CTX-M são inibidas por inibidores de β -lactamases, tal como, pelo sulbactame, ácido clavulânico e tazobactame, por ordem crescente de atividade (Bonnet, 2004). Assim, o inibidor tazobactame foi o que apresentou maior atividade para ambas as enzimas (IC_{50} , 0.005-0.007 μ M), seguindo-se o ácido clavulânico (IC_{50} , 0.030-0.031 μ M); os valores obtidos estão de acordo com os valores previamente descritos para as enzimas CTX-M (Bonnet, 2004).

V-Conclusão

Globalmente, a análise da suscetibilidade aos antibióticos revelou um cenário preocupante no que diz respeito à multirresistência, na amostra estudada, com 90% e 29% dos isolados de origem clínica e animal, respetivamente, multirresistentes.

O presente trabalho, identificou o gene *bla*_{CTX-M-15} como o mais prevalente nos isolados em estudo. Este gene, responsável pela resistência às cefalosporinas de 3ª geração, surgiu associado aos genes *bla*_{OXA-tipo} e *aac(6')-Ib-cr*, constituindo assim o perfil genotípico mais comum, responsável pela multirresistência observada. Nos isolados de origem animal foi ainda identificada uma nova variante do gene *bla*_{CTX-M}, denominada *bla*_{CTX-M-166}.

Este trabalho evidenciou que os carbapenêmes, apesar da emergência de mecanismos de resistência a estes antibióticos quer em reservatórios humanos, como animais, ainda representam uma alternativa terapêutica válida para o tratamento de infeções causadas por bactérias de Gram-negativo multirresistentes. A deteção prévia destes mecanismos de resistência contribui para uma melhor escolha de terapêutica, permitindo preservar antibióticos considerados de última geração. Se o aparecimento de novos mecanismos/genos de resistência forem detetados com antecedência poderá ser prevenida a sua disseminação, nomeadamente, o aparecimento de surtos que envolvam bactérias com esses genes.

Este estudo salienta a importância dos animais como reservatórios de estirpes de *E. coli* portadoras de genes que codificam β -lactamases de espectro estendido e do tipo AmpC plasmídicas, as quais podem ser transmitidas ao homem por contacto direto ou através da cadeia alimentar. Desta foram, os animais poderão constituir uma fonte importante de genes de resistência, transferível para outros microrganismos, nomeadamente patogénicos ou comensais de humanos. No que concerne à suscetibilidade aos antibióticos, apesar de terem sido estudados mecanismos de resistência a diferentes classes de antibióticos, é de salientar que, devido à grande variedade dos mesmos alguns ficaram ainda por estudar neste trabalho.

Como evidenciado, a produção de β -lactamases é um dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, sendo identificadas cada vez mais enzimas com diferentes propriedades hidrolíticas. De facto, atualmente são cada vez mais escassos os antibióticos com capacidade de atuar em bactérias de Gram-negativo sem serem inativados por este mecanismo. A determinação das constantes cinéticas da nova β -lactamase CTX-M-166 permitiu compreender quais os efeitos que a substituição aminoacídica Ala120Val produziu nas propriedades catalíticas da enzima e, assim, contribuir para a melhor compreensão da relação entre mutações e propriedades catalíticas na família CTX-M.

Efetivamente, o presente estudo sugere que a substituição Ala120Val pode implicar uma maior estabilidade da enzima, constituindo um primeiro passo na evolução das enzimas CTX-M em conferir resistência aos antibióticos, nomeadamente ao ceftiofur, em ambiente veterinário.

Globalmente, o uso de cefalosporinas em animais deve, tal como no homem, ser cuidadosamente considerado, tendo em conta a sua importância na terapêutica e a plasticidade das bactérias produtoras de ESBLs, que conferem resistência àqueles antibióticos. De salientar a importância do potencial zoonótico associado às estirpes de *E. coli* com genes *bla*_{ESBL}.

Considerando a importância do estudo e dos resultados obtidos, julgamos que os mesmos darão um contributo muito válido para a área em que se inserem: a resistência aos antibióticos, a compreensão dos mecanismos que lhe estão associados, nomeadamente a sua disseminação, e os níveis de estrutura-função das enzimas que medeiam o principal mecanismo de resistência em bactérias de Gram-negativo.

Perspetivam-se estudos de dinâmica molecular e criação de mutantes, por mutagénese dirigida do gene *bla*_{CTX-M-15} identificado, de forma a prever o potencial evolutivo das enzimas CTX-M em conferir hidrólise da classe de antibióticos mais recentemente afetada, os carbapenêmes, sendo estes, muitas vezes, o único tratamento eficaz em infeções causadas por bactérias produtoras dessas enzimas.

VI-Bibliografia

- Adler, A., Gniadkowski, M., Baraniak, A., Izdebski, R., Fiett, J., Hryniewicz, W., Malhotra-Kumar, S., Goossens, H., Lammens, C., Lerman, Y., Kazma, M., Kotlovsky, T., Carmeli, Y., MOSAR WP5, WP2 study groups, 2012. Transmission dynamics of ESBL-producing *Escherichia coli* clones in rehabilitation wards at a tertiary care centre. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 497-505.
- Aldred, K.J., Kerns, R.J., Osheroff, N., 2014. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry.* 53, 1565-1574.
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M.F., Di Ilio, C., 2013. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 10, 6235-6254.
- Almeida, A., Duarte, S., Nunes, R., Rocha, H., Pena, A., Meisel, L., 2014. Human and Veterinary Antibiotics Used in Portugal—A Ranking for Ecosurveillance. *Toxics.* 2, 188-225.
- Alves, M.S., Pereira, A., Araújo, S.M., Castro, B.B., Correia, A.C., Henriques, I., 2004. Seawater is a reservoir of multi-resistant *Escherichia coli*, including strains hosting plasmid-mediated quinolones resistance and extended-spectrum beta-lactamases genes. *Front. Microbiol.* 5:426.
- Antunes, P., Coque, T.M., Peixe, L., 2010. Emergence of an Incly plasmid encoding CMY-2 β -lactamase associated with the international ST19 OXA-30-producing β -lactamase *Salmonella typhimurium* multidrug-resistant clone. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2097-2100.
- Bell, B.G., Schellevis, F., Stobberingh, E., Goossens, H., Pringle, M., 2014. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infect. Dis.* 14:13.
- Bisht, R., Katiyar, A., Singh, R., Mittal, P., 2009. Antibiotic resistance – a global issue of concern. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2, 34-39.
- Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J., 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 42-51.
- Blanc, V., Leflon-Guibout, V., Blanco, J., Haenni, M., Madec, J.Y., Rafignon, G., Bruno, P., Mora, A., Lopez, C., Dahbi, G., Dunais, B., Anastay, M., Branger, C., Moreau, R., Pradier, C., Nicolas-Chanoine, M.H., 2014. Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1231-1237.
- Bockstael, K., Van Aerschot, A., 2009. Antimicrobial resistance in bacteria. *Cent. Eur. J. Med.* 4, 141-155.
- Bonnet, R., 2004. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1-14.
- Bonnet, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Labia, R., Sirot, J., 1999. Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2671-2677.
- Bonnet, R., Dutour, C., Sampaio, J.L., Chanal, C., Sirot, D., Labia, R., De Champs, C., Sirot, J., 2001. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-Gly. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2269-2275.
- Bonnet, R., Recule, C., Baraduc, R., Chanal, C., Sirot, D., De Champs, C., Sirot, J., 2003. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 29-35.
- Bush, K., 2012. Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. *Rev. Sci. Tech.* 31, 43-56.

- Bush, K., 2013. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1277, 84-90.
- Bush, K., Jacoby, G.A., 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 969-976.
- Cambau, E., Guillard, T., 2012. Antimicrobials that affect the synthesis and conformation of nucleic acids. *Rev. Sci. Tech.* 31, 77-87.
- Caniça, M., Ferreira, M., Ferreira, E., Cabral, L., 2002. Phenotype and molecular characterization of the first inhibitor-resistant TEM-derived beta-lactamase identified in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3688-3689.
- Caniça, M., Clemente, L., Jones-Dias, D., Manageiro, V., Themudo, P., Albuquerque, T., Francisco, A.P., Louro, D., Ferreira, E., 2011. Epidemiology and zoonotic potential of *Escherichia coli* CTX-M-15-producing isolates in Portugal. 5th Congress of the Portuguese Society of Veterinary Sciences. P8.
- Cantón, R., Morosini, M.I., de la Maza, O.M., de la Pedrosa, E.G., 2008. IRT and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 53-62.
- Cantón, R., González-Alba, J.M., Galán, J.C., 2012. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front. Microbiol.* 3:110.
- Carneiro, C., Araújo, C., Gonçalves, A., Vinué, L., Somalo, S., Ruiz, E., Uliyakina, I., Rodrigues, J., Igrejas, G., Poeta, P., Torres, C., 2010. Detection of CTX-M-14 and TEM-52 Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Fecal *Escherichia coli* Isolates of Captive Ostrich in Portugal. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 991-994.
- Clemente, L., Manageiro, V., Ferreira, E., Jones-Dias, D., Correia, I., Themudo, P., Albuquerque, T., Caniça, M., 2013. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases among isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from food-producing animals and food products, in Portugal. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 221-228.
- Coque, T.M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Baquero, F., Cantón, R., Nordmann, P., 2008. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 195-200.
- CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie), 2015. *Recommandations 2015.*
- Correia, S., Pacheco, R., Radhouani, H., Diniz, J.C., Ponce, P., Jones-Dias, D., Caniça, M., Igrejas, G., Poeta, P., 2012. High prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* isolates among hemodialysis patients in Portugal: appearance of ST410 with the *bla*_{CTX-M-14} gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 74, 423-425.
- Costa, D., Poeta, P., Briñas, L., Sáenz, Y., Rodrigues, J., Torres, C., 2004. Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 960-961.
- Costa, D., Poeta, P., Sáenz, Y., Vinué, L., Rojo-Bezares, B., Jouini, A., Zarazaga, M., Rodrigues, J., Torres, C., 2006. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M,

- TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 1311-1312.
- Costa, D., Vinué, L., Poeta, P., Coelho, A.C., Matos, M., Sáenz, Y., Somalo, S., Zarazaga, M., Rodrigues, J., Torres, C., 2009. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Vet. Microbiol.* 138, 339-344.
- D'Andrea, M.M., Arena, F., Pallecchi, L., Rossolini, G.M., 2013. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 305-317.
- Dalhoff, A., 2012. Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* ID:976273.
- Dautzenberg, M.J., Wekesa, A.N., Gniadkowski, M., Antoniadou, A., Giamarellou, H., Petrikos, G.L., Skiada, A., Brun-Buisson, C., Bonten, M.J., Derde, L.P., Mastering hospital Antimicrobial Resistance in Europe Work Package 3 Study Team, 2015. The association between colonization with carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and overall ICU mortality: an observational cohort study. *Crit. Care Med.* 43, 1170-1177.
- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417-433.
- D'Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N., Wright, G.D., 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature.* 477, 457-461.
- Diene, S.M., Rolain, J.M., 2014. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 831-838.
- Djahmi, N., Dunyach-Remy, C., Pantel, A., Dekhil, M., Sotto, A., Lavigne, J.P., 2014. Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. *Biomed, Res, Int.* ID:305784.
- Drawz, S.M., Bonomo, R.A., 2010. Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 160-201.
- ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control, 2014. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. Disponível em www.ecdc.europa.eu/.
- ESAC-Net, European Centre for Disease Prevention and Control, 2014. Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union. Disponível em www.ecdc.europa.eu/.
- EUCAST (European Committee on Susceptibility Testing), 2014. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 4.0, 2014.
- FDA (Food and Drug Administration), 2015. Approved Animal Drug Products (Green Book): Section 2 - Active ingredients. Disponível em www.fda.gov/.
- Fernandes, R., Amador, P., Prudêncio, C., 2013. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev. Med. Microbiol.* 24, 7-17.
- Fernandes, R., Amador, P., Oliveira, C., Prudêncio, C., 2014. Molecular characterization of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in northern Portugal. *ScientificWorldJournal.* ID:782897.

- Fetrow, J.S., 1995. Omega loops: nonregular secondary structures significant in protein function and stability. *FASEB J.* 9, 708-717.
- Freitas, F., Machado, E., Ribeiro, T.G., Novais, Â., Peixe, L., 2014. Long-term dissemination of acquired AmpC β -lactamases among *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* in Portuguese clinical settings. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 551-558.
- Fróis, M., da Silva, G.J., 2011. Molecular characterisation of CTX-M-type extended spectrum β -lactamases of *Escherichia coli* isolated from a Portuguese University Hospital. *EJHP Science.* 17, 1-5.
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., Pavilonis, A., 2011. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas).* 47, 137-146.
- Gonçalves, A., Igrejas, G., Radhouani, H., Estepa, V., Pacheco, R., Monteiro, R., Brito, F., Guerra, A., Petrucci-Fonseca, F., Torres, C., Poeta, P., 2012. Iberian wolf as a reservoir of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* of the TEM, SHV, and CTX-M groups. *Microb. Drug Resist.* 18, 215-219.
- Guan, X., Xue, X., Liu, Y., Wang, J., Wang, Y., Wang, J., Wang, K., Jiang, H., Zhang, L., Yang, B., Wang, N., Pan, L., 2013. Plasmid-mediated quinolone resistance--current knowledge and future perspectives. *J. Int. Med. Res.* 41, 20-30.
- Guimarães, D.O., Momesso, L.S., Pupo, M.T., 2010. Antibiotics: Therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents. *Quim. Nova.* 33, 667-679.
- Gupta, N.N., Lakhe, M.M., 2010. Brief overview of antibacterial agents. *J. Assoc. Physicians India.* 58, 8-12.
- Haenni, M., Châtre, P., Madec, J.Y., 2014. Emergence of *Escherichia coli* producing extended-spectrum AmpC β -lactamases (ESAC) in animals. *Front. Microbiol.* 5:53.
- Hawkey, P.M., Jones, A.M., 2009. The changing epidemiology of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 3-10.
- INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge), 2010. Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos. Disponível em www.insa.pt/.
- Jacoby, G.A., Munoz-Price, L.S., 2005. The new beta-lactamases. *N. Engl. J. Med.* 352, 380-391.
- Jacoby, G.A., 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 161-182.
- Jones-Dias, D., Manageiro, V., Ferreira, E., Louro, D., Antibiotic Resistance Surveillance Program in Portugal (ARSIP) participants, Caniça, M., 2014. Diversity of extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* isolates from Portuguese health care facilities. *J. Microbiol.* 52, 496-503.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Collins, J.J., 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 423-435.
- Kong, K.F., Schneper, L., Mathee, K., 2010. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS.* 118, 1-36.
- Kotra, L.P., Haddad, J., Mobashery, S., 2000. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3249-3256.

- Lahlaoui, H., Ben Haj Khalifa, A., Ben Moussa, M., 2014. Epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL). *Med. Mal. Infect.* 44, 400-404.
- Lambert, T., 2012. Antibiotics that affect the ribosome. *Rev. Sci. Tech.* 31, 57-64.
- Leclercq, R., 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.* 34, 482-492.
- Leistner, R., Sakellariou, C., Gürntke, S., Kola, A., Steinmetz, I., Kohler, C., Pfeifer, Y., Eller, C., Gastmeier, P., Schwab, F., 2014. Mortality and molecular epidemiology associated with extended-spectrum β -lactamase production in *Escherichia coli* from bloodstream infection. *Infect. Drug Resist.* 7, 57-62.
- Levy, S.B., Marshall, B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10, 122-129.
- Liu, S.L., Hessel, A., Sanderson, K.E., 1993. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 6874-6878.
- Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Sousa, J.C., Peixe, L., 2004. Emergence of CTX-M beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Portugal: report of an *Escherichia coli* isolate harbouring *bla*_{CTX-M-14}. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 755-757.
- Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Baquero, F., Sousa, J.C., Peixe, L., Portuguese Resistance Study Group, 2006. Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3220-3221.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268-281.
- Mammeri, H., Poirel, L., Fortineau, N., Nordmann, P., 2006. Naturally occurring extended-spectrum cephalosporinases in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2573-2576.
- Manageiro, V., Ferreira, E., Jones-Dias, D., Louro, D., Pinto, M., Diogo, J., Caniça, M., 2012. Emergence and risk factors of β -lactamase-mediated resistance to oxyimino- β -lactams in *Enterobacteriaceae* isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 72, 272-277.
- Manageiro, V., Ferreira, E., Caniça, M., Manaia, C.M., 2014a. GES-5 among the β -lactamases detected in ubiquitous bacteria isolated from aquatic environment samples. *FEMS Microbiol. Lett.* 351, 64-69.
- Manageiro, V., Ferreira, E., Pinto, M., Caniça, M., 2014b. First description of OXA-48 carbapenemase harbored by *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* from a single patient in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7613-7614.
- Manageiro, V., Ferreira, E., Almeida, J., Barbosa, S., Simões, C., Antibiotic Resistance Surveillance Program in Portugal (ARSIP), Bonomo, R.A., Caniça, M., 2015a. Predominance of KPC-3 in a survey for

- carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 3588-3592.
- Manageiro, V., Ferreira, E., Pinto, M., Fonseca, F., Ferreira, M., Bonnet, R., Caniça, M., 2015b. Two novel CMY-2-type β -lactamases encountered in clinical *Escherichia coli* isolates. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 14:12.
- Marshall, B.M., Levy, S.B., 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 718-733.
- Masoud, M.S., Ali, A.E., Nasr, N.M., 2014. Chemistry, classification, pharmacokinetics, clinical uses and analysis of beta-lactam antibiotics: A review. *J. Chem. Pharm. Res.* 6, 28-58.
- Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., Frère, J.M., 1998. Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochem. J.* 330, 581-598.
- Matsumura, Y., Johnson, J.R., Yamamoto, M., Nagao, M., Tanaka, M., Takakura, S., Ichiyama, S., Kyoto-Shiga Clinical Microbiology Study Group, Kyoto-Shiga Clinical Microbiology Study Group, 2015. CTX-M-27- and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* of the H30 subclonal group within ST131 drive a Japanese regional ESBL epidemic. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1639-1649.
- Mendonça, N., Leitão, J., Manageiro, V., Ferreira, E., Caniça, M., 2007. Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1946-1955.
- Micenková, L., Sišková, P., Bosák, J., Jamborová, I., Cernohorská, L., Smajs, D., 2014. Characterization of human uropathogenic ESBL-producing *Escherichia coli* in the Czech Republic: spread of CTX-M-27-producing strains in a university hospital. *Microb. Drug Resist.* 20, 610-617.
- Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., Bonomo, R.A., 2011. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4943-4960.
- Park, S.H., 2014. Third-generation cephalosporin resistance in gram-negative bacteria in the community: a growing public health concern. *Korean J. Intern. Med.* 29, 27-30.
- Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G.A., 2002. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1-11.
- Poeta, P., Radhouani, H., Igrejas, G., Gonçalves, A., Carvalho, C., Rodrigues, J., Vinué, L., Somalo, S., Torres, C., 2008. Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7439-7441.
- Poirel, L., Cattoir, V., Nordmann, P., 2012a. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. *Front. Microbiol.* 3:24.
- Poirel, L., Barbosa-Vasconcelos, A., Simões, R.R., Da Costa, P.M., Liu, W., Nordmann, P., 2012b. Environmental KPC-producing *Escherichia coli* isolates in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1662-1663.

- Ramos, S., Igrejas, G., Silva, N., Jones-Dias, D., Capelo-Martinez, J-L., Caniça, M., Poeta, P., 2013. First report of CTX-M producing *Escherichia coli*, including the new ST2526, isolated from beef cattle and sheep in Portugal. *Food Control*. 31, 208-210.
- Redgrave, L.S., Sutton, S.B., Webber, M.A., Piddock, L.J., 2014. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends. Microbiol.* 22, 438-445.
- Rice, L.B., Carias, L.L., Hujer, A.M., Bonafede, M., Hutton, R., Hoyen, C., Bonomo, R.A., 2000. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 beta-lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 362-367.
- Robicsek, A., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.* 6, 629-640.
- Rodrigues, C., Machado, E., Fernandes, S., Montenegro, C., Peixe, L., Novais, Â., 2015. An update on faecal carriage of ESBL-producing by Portuguese healthy humans: the emergence of B2-ST131 H30 subclone producing CTX-M-27. Here, there and everywhere: epidemiology of Gram-negatives. 25th ECCMID Copenhagen, Denmark, P188.
- Rolain, J.M., Cornaglia, G., 2014. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: the magnitude of a worldwide concern. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 819-820.
- Rossolini, G.M., Arena, F., Pecile, P., Pollini, S., 2014. Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 18, 56-60.
- Seiffert, S.N., Carattoli, A., Tinguely, R., Lupo, A., Perreten, V., Endimiani, A., 2014. High prevalence of extended-spectrum β -Lactamase, plasmid-mediated AmpC, and carbapenemase genes in pet food. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 6320-6323.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S.M., Kamal, M.A., 2015. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi. J. Biol. Sci.* 22, 90-101.
- Shlaes, D.M., 2013. New β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations in clinical development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1277, 105-114.
- Siddheshwar, S.S., Pattan, S.R., Wabale, N.B., Pattan, J.S., Dighe, S.B., Bhavar, S.B., Gude, R.S., 2013. Need and Scope of Development of β -Lactams. *Int. J. Pharm. Natural. Med.* 1, 52-62.
- Simões, R.R., Poirel, L., Da Costa, P.M., Nordmann, P., 2010. Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 110-112.
- Stolle, I., Prenger-Berninghoff, E., Stamm, I., Scheufen, S., Hassdenteufel, E., Guenther, S., Bethe, A., Pfeifer, Y., Ewers, C., 2013. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 2802-2808.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Robicsek, A., 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 664-689.
- Tadesse, D.A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M.J., McDermott, P.F., 2012. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 741-749.

- Tang, S.S., Apisarnthanarak, A., Hsu, L.Y., 2014. Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 78, 3-13.
- Vasoo, S., Barreto, J.N., Tosh, P.K., 2015. Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician. *Mayo Clin. Proc.* 90, 395-403.
- Walsh, T.R., 2010. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 36, 8-14.
- Woodford, N., Wareham, D.W., Guerra, B., Teale, C., 2014. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae* from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 287-291.
- Wu, T.L., Siu, L.K., Su, L.H., Lauderdale, T.L., Lin, F.M., Leu, H.S., Lin, T.Y., Ho, M., 2001. Outer membrane protein change combined with co-existing TEM-1 and SHV-1 beta-lactamases lead to false identification of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 755-761.
- Xia, S., Fan, X., Huang, Z., Xia, L., Xiao, M., Chen, R., Xu, Y., Zhuo, C., 2014. Dominance of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset and hospital-onset infection in China. *PLoS One.* 9, e100707.
- WHO (World Health Organization), 2015. Antimicrobial resistance. Fact sheet n^o 194. Disponível em www.who.int/.