

Ana Sofia Gonçalves Teixeira Macedo

Caracterização de *Enterococcus* spp. resistentes
isolados de águas não tratadas destinadas ao
consumo humano

Universidade Fernando Pessoa

Porto

2011

Ana Sofia Gonçalves Teixeira Macedo

Caracterização de *Enterococcus* spp. resistentes
isolados de águas não tratadas destinadas ao
consumo humano

Universidade Fernando Pessoa

Porto

2011

Declaração de Originalidade

Declaro que este trabalho foi realizado na íntegra por mim e que todo o material proveniente de outras fontes foi devidamente referenciado na sua totalidade.

Autor: _____

(Ana Sofia Macedo nº15274)

Orientador: _____

(Prof. Doutora Cristina Abreu)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para conclusão do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Resumo

A água não tratada é constantemente desvalorizada como fonte de resistências a antibióticos em países desenvolvidos. Para averiguar este problema de saúde pública, neste trabalho isolaram-se *Enterococcus* spp. como bactérias indicadoras de contaminação fecal de poços, fontes e minas que fornecem água a diversas comunidades em Portugal e caracterizou-se o seu perfil de resistência a antibióticos, tanto a nível de fenótipo como de genótipo. Testou-se a susceptibilidade aos antibióticos pelo método de difusão em disco com os seguintes antibióticos: vancomicina, teicoplanina, ampicilina, tetraciclina, minociclina, eritromicina, quinupristina-dalfopristina, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, estreptomina, nitrofurantoína e linezolida. A identificação das espécies de enterococos, genes de resistência e factores de virulência foi feita por métodos moleculares (PCR).

Das 75 espécies de enterococos isolados, mais de 50% eram resistentes a pelo menos à ciprofloxacina, tetraciclina e quinupristina-dalfopristina e 57% eram multirresistentes a mais de 3 antibióticos de diferentes famílias simultaneamente. Os genes de resistência às tetraciclina, eritromicina e gentamicina foram encontrados em várias espécies de enterococos (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* e outros *Enterococcus* spp.) nas seguintes proporções: *tetM*-46%, *tetL*-14%, *tetS*-5%, *ermB*-22%, *aac(6)-Ie-aph(2)*-12%. Os factores de virulência *gel* e *asaI* estavam presentes em 28% e 16% dos isolados.

Este estudo posiciona os focos de água não tratada destinada ao consumo humano no espectro dos nichos ecológicos que actuam como reservatórios ou veículos de disseminação de enterococos multirresistentes e genes de resistência.

Os dados obtidos neste estudo são de grande importância como primeiro passo na avaliação da disseminação de enterococos multirresistentes entre humanos e animais, através da ingestão de água contaminada.

Abstract

Untreated drinking water is frequently overlooked as a source of antibiotic resistance in developed countries. To gain further insight on this topic, we isolated the indicator bacteria *Enterococcus* spp. from water samples collected in wells, fountains and natural springs supplying different communities across Portugal, and characterized their antibiotic resistance profile with both phenotypic and genetic approaches.

Susceptibility to antibiotics was tested by disk diffusion to vancomycin, teicoplanin, ampicillin, erythromycin, tetracycline, minocycline, quinupristin–dalfopristin, ciprofloxacin, chloramphenicol, nitrofurantoin, linezolid, gentamicin and streptomycin.

The identification of enterococci species, resistance genes and virulence factors was performed by molecular methods (PCR).

There were isolated 75 enterococci from different species and we found various rates of resistance to seven antibiotic families. Over 50% of the isolates were resistant to at least ciprofloxacin, tetracyclines or quinupristin–dalfopristin and 57% were multidrug resistant to ≥ 3 antibiotics from different families. Multiple enterococcal species (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* and other *Enterococcus* spp.) from different water samples harbored genes encoding resistance to tetracyclines, erythromycin or gentamicin [*tetM*-46%, *tetL*-14%, *tetS*-5%, *ermB*-22%, *aac(6')-Ie-aph(2)*-12%] and putative virulence factors [*gel*-28%, *asaI*-16%].

The present study places untreated drinking water within the spectrum of ecological niches that may be reservoirs of or vehicles for antibiotic resistant enterococci/genes. These findings are important as the first step to evaluate the spread of antibiotic resistant enterococci to humans and animals through water ingestion.

Agradecimentos

À Universidade Fernando Pessoa pelo apoio financeiro e disponibilização do material e instalações necessários à realização deste estudo;

À Prof. Doutora Cristina Abreu pelo apoio à realização deste trabalho e pela sua boa disposição;

À Prof. Doutora Carla Novais pela sua importante contribuição neste trabalho;

Ao Dr. Ricardo Silva, técnico do laboratório da investigação, pela prontidão com que me ajudou sempre que necessitei;

Às amigas que nasceram na Faculdade e que são, felizmente, demasiadas para nomear individualmente;

Às amigas que têm continuado a prosperar, apesar do tempo e da distância, sendo também escusado nomeá-las;

À minha família, por todo o apoio.

Índice

I.	Introdução.....	1
II.	A Célula Bacteriana	4
III.	<i>Enterococcus</i> spp	8
IV.	Antibióticos.....	11
	1. História da Antibioterapia.....	11
	2. Antibióticos Antiparietais	13
	3. Antibióticos Inibidores da Síntese Proteica	15
	4. Tetraciclinas e Gliciclinas	17
	5. Cloranfenicol.....	17
	6. Macrólidos	18
	7. Estreptograminas A+B.....	18
	8. Oxazolidinonas.....	19
	9. Nitrofurantoína	19
	10. Quinolonas	20
V.	Resistência de <i>Enterococcus</i> a agentes antimicrobianos	21
	1. Resistência Intrínseca	21
	2. Resistência Adquirida.....	22
VI.	Factores de Virulência	26
VII.	Material e Métodos.....	27
	1. Recolha e Processamento das Amostras	27
	2. Identificação.....	28
	3. Teste de Susceptibilidade aos Antibióticos	29
	4. Caracterização de resistência a antibióticos e factores de virulência.....	29
	5. Visualização dos resultados da amplificação	30

VIII. Resultados.....	31
1. Isolamento de Bactérias	31
2. Espécies Bacterianas e Susceptibilidade.....	32
3. Caracterização de genes de resistência	40
4. Caracterização dos factores de virulência	45
IX. Discussão	46
X. Conclusão	48
Bibliografia.....	50

Índice de Figuras

Figura 1: Diferenças estruturais entre bactérias de Gram positivo e de Gram negativo	6
Figura 2 : Árvore filogenética baseada na análise das sequências genéticas de 16S rRNA de várias espécies de <i>Enterococcus</i>	10
Figura 3: Características de IS; DR- repetição directa; IR- repetição inversa	23
Figura 4: Distribuição das amostras recolhidas em percentagem	31
Figura 5: Distribuição dos isolados por espécie em percentagem	32
Figura 6: Distribuição do fenótipo de resistência a antibióticos em <i>E. faecalis</i> em percentagem	38
Figura 7: Distribuição do fenótipo de resistência a antibióticos em <i>E. faecium</i> em percentagem	38
Figura 8: Distribuição do fenótipo de resistência a antibióticos em <i>E. hirae</i> em percentagem....	39
Figura 9: Distribuição do fenótipo de resistência a antibióticos em <i>E. casseliflavus</i> em percentagem.....	39
Figura 10 - Distribuição do fenótipo de resistência a antibióticos em <i>Enterococcus</i> spp em percentagem.....	40
Figura 11- Genes de Resistência presentes em <i>E. faecalis</i>	43
Figura 12- Genes de Resistência encontrados em <i>E. faecium</i>	43
Figura 13 - Genes de resistência presentes em <i>E. hirae</i>	44
Figura 14 - Genes de resistência presentes em <i>E. casseliflavus</i>	44
Figura 15 - Genes de Resistência presentes em <i>Enterococcus</i> spp.	45
Figura 16- Distribuição dos genes de virulência em <i>Enterococcus</i> em percentagem.	46

Índice de Tabelas

Tabela 1: Descoberta e origem de antibióticos	12
Tabela 2: Perfil de resistência a antibióticos em enterococci de várias espécies isoladas de várias fontes de águas de consumo em Portugal.	37
Tabela 3: Distribuição dos genes de resistência a antibióticos de várias espécies de enterococos isolados de amostras de águas de consumo	42

Abreviaturas

6-APA – Ácido 6-aminopenicilâmico

7-APA – Ácido aminocefalosporânico

BHI - Brain Heart Infusion

bp - Pares de bases

CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute

CMI – Concentração Mínima Inibitória

DNA - Ácido desoxiribonucleico

HLR – High Level Resistance

IR – Inverted Repeat

IS – Insertion Sequences

LPS – Liposacarídeos

MC – Membrana Citoplasmática

NAG – N-acetilglucosamina

NAM – N-acetil-murâmico

OM – Outer Membrane

PBP – Penicillin Binding Protein

PCR - Polymerase Chain Reaction

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

TAE – Tris-Acetato-EDTA

TSB – Tryptic Soy Broth

VRE – Vancomycin Resistant *Enterococcus*

I. Introdução

É cada vez mais comum a emergência e o aumento da prevalência de bactérias resistentes a antibióticos que podem originar estados clínicos muito reservados ou mesmo infecções não tratáveis. A grande utilização de antibióticos no tratamento de humanos e animais pode aumentar a resistência aos antibióticos que são utilizados diariamente para a terapêutica de infecções (controle de infecções), profilaxia (prevenção de doenças) e em doses subterapêuticas como promotores de crescimento (Koike *et al.*, 2007).

Assim, surge a necessidade de monitorizar o aparecimento de resistências em bactérias de origem animal, humana e presentes no meio-ambiente. Estas últimas são bons indicadores de contaminação e, por conseguinte, das resistências mais disseminadas, uma vez que estão presentes em diversos nichos ecológicos, permitindo que haja a comparação entre os diversos ecossistemas e o estudo da pressão selectiva exercida pelos antibióticos (Huycke *et al.*, 1998).

Desta maneira, a preocupação com a qualidade da água consumida tem sido constante e concentra-se na ocorrência de bactérias indicadoras de contaminação e/ou patogénias, como os enterococos. Os *Enterococcus* spp são bactérias presentes no intestino de todos os mamíferos e aves, fazendo parte da flora comensal.

Nos últimos anos, os enterococos têm sido reconhecidos como uma das principais causas de infecções nosocomiais, infecções pós-operatórias e do trato urinário. Existem dois tipos de enterococos que podem causar infecções: os que são oriundos da flora comensal do intestino, cuja probabilidade de possuírem resistências para além das intrínsecas ao género é muito baixa, assim como há baixa probabilidade de disseminação através do contacto entre doentes. O outro tipo são isolados que possuem múltiplas resistências e aptos a transmissão nosocomial (Huycke *et al.*, 1998).

Os *Enterococcus* spp. são extremamente resistentes. Toleram grandes amplitudes de temperatura, meios hipotónicos, hipertónicos, alcalinos e ácidos. A azida sódica e sais biliares, que inibem o crescimento da maioria dos microrganismos, são

bem tolerados pelos enterococos e utilizados como meio selectivos. Os enterococos encontram-se no intestino humano, sendo encontrados em quase todos os animais de sangue quente e a proporção entre as espécies varia ao longo da vida. Estão presentes em vários ecossistemas, desde na vegetação, solo, água de superfície e produtos alimentares. Devido à sua ecoresistência torna-se difícil a sua eliminação, aumentando a probabilidade de se formarem reservatórios (Huycke *et al.*, 1998). Por exemplo, a água natural não tratada é utilizada em muitos países da Europa do Sul para consumo, confecção de alimentos, higiene pessoal e na agricultura. Em Portugal, é frequente utilizar a água não tratada exclusivamente ou em associação com água canalizada. Para além de muitas fontes públicas estarem contaminadas com bactérias, muitos poços, fontes, furos artesianos e nascentes ainda se encontram em propriedades privadas. Nestes casos, as fontes água não estão sujeitas a controlo sanitário oficial e podem estar localizadas na proximidade de reservatórios de bactérias e genes de resistência a antibióticos como tanques sépticos, aviários, armazéns de fertilizantes, etc.

Das cerca de 14 ou mais espécies de enterococos, apenas *E.faecalis* e *E.faecium* colonizam e infectam humanos em concentrações detectáveis. *E.faecalis* é isolado em 80% das infecções e *E.faecium* nas restantes. As infecções causadas por outras espécies são raras (Huycke *et al.*, 1998).

Os enterococos são intrinsecamente resistentes a muitos antibióticos e adquirem muitas vezes resistências pela troca de genes que codificam resistências transportados em transposões conjugativos e plasmídeos, o que limita e dificulta a abordagem terapêutica. Alguns autores defendem que o uso de antibióticos exerce uma pressão selectiva nas bactérias, aumentando as suas resistências e que este facto se encontra interligado com o aumento do número de infecções hospitalares. Os estudos epidemiológicos e de microbiologia molecular sugerem que a disseminação é feita entre pacientes, provavelmente por dispositivos médicos ou técnicos de saúde e entre hospitais por pacientes colonizados (Huycke *et al.*, 1998). Por outro lado, os genes de resistência podem ser transferidos a outras bactérias da flora comensal ou bactérias patogénicas (Huycke *et al.*, 1998).

O meio aquático funciona como reservatório de genes de resistência e bactérias que os transportam como os enterococos, contribuindo para a evolução e emergência de novas plataformas genéticas com não só consequências clínicas, mas também alterações na flora aquática autóctone. É necessária mais informação sobre vários aspectos da

qualidade da água, tanto para o público geral como para a indústria (Macedo *et al.*, 2010).

Em Portugal, o consumo de água contaminada com bactérias resistentes a antibióticos ainda não é reconhecido como importante contribuinte para epidemiologia das resistências a antibióticos, quando na verdade, deveria ser encarado como um problema de saúde pública. Tanto em Portugal como noutros países desenvolvidos, há falta de informação relativamente à contaminação fecal de água destinada ao consumo humano (Caplin, 2008 e Łuczkiwicz *et al.*, 2010).

Neste contexto, este trabalho tem como objectivos:

- a) Identificar espécies do género *Enterococcus* em amostras de água recolhidas em 2006 e 2008 na zona Norte e Centro de Portugal;
- b) Caracterizar fenotipicamente as resistências aos antibióticos: vancomicina (30 µg), teicoplanina (30 µg), ampicilina (10 µg), eritromicina (15 µg), tetraciclina (30 µg), minociclina (30 µg), quinupristina–dalfopristina (15 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), linezolid (30 µg), elevadas concentrações (HLR) de gentamicina (120 µg) e HLR de estreptomicina (300 µg);
- c) Determinar através de PCR quais os genes de resistência albergados pelas bactérias;
- d) Determinar através de PCR a presença de genes que codificam factores de virulência (*gel*, *asa1*, *cyl*, *esp* e *hyl*);

Recorreu-se a testes presuntivos, como a coloração de Gram para verificar se de facto as bactérias se tratavam de cocos de Gram positivo, a catalase, escurecimento do meio contendo bÍlis-esculina e crescimento em NaCl a 6,5%.

Seguidamente foram realizados antibiogramas, pelo teste de Kirby Bauer da difusão em placa com os antibióticos descritos anteriormente.

Por último, recorreu-se a métodos moleculares para identificar as espécies de enterococos, os genes que conferem resistência a determinados antibióticos e os factores de virulência. A técnica utilizada foi a reacção em cadeia da polimerase, na qual são amplificados ácidos nucleicos.

O trabalho experimental foi iniciado em Março de 2009 e concluído em Julho do mesmo ano, tendo sido executado no CEBIMED (Centro de Estudos em Biomedicina). A pesquisa bibliográfica foi iniciada em Dezembro de 2009.

Das 75 espécies de enterococos isolados, mais de 50% eram resistentes a pelo menos à ciprofloxacina, tetraciclinas e quinupristina-dalfopristina e 57% eram multirresistentes a mais de 3 antibióticos de diferentes famílias simultaneamente. Os genes de resistência às tetraciclinas, eritromicina e gentamicina foram encontrados em várias espécies de enterococos (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* e outros *Enterococcus* spp) nas seguintes proporções: *tetM*-46%, *tetL*-14%, *tetS*-5%, *ermB*-22%, *aac(6')-Ie-aph(2)*-12%. Os factores de virulência *gel* e *asaI* estavam presentes em 28% e 16% dos isolados.

II. A Célula Bacteriana

As células são a unidade básica de vida, desde a bactéria até às plantas e animais. As células de animais, plantas e fungos são eucariótas e possuem o DNA envolvido num invólucro. As bactérias são procariótas, não possuem núcleo individualizado, nem organelos membranares, nem aparelho mitótico. Verifica-se a existência de um cromossoma haplóide, não associado a histonas, em contacto íntimo com o citoplasma (o nucleóide). Está também presente DNA plasmídico que confere características adicionais, como as resistências que podem ser passadas intra e inter-espécies. Possuem ribossomas 70S e, a maioria, possui uma parede celular com peptidoglicano que envolve a membrana celular, protegendo a bactéria de um ambiente hostil (Murray *et al.*, 2001 e Sousa, 2006).

A parede celular é uma estrutura que reveste externamente a célula bacteriana, anexa à estrutura citoplasmática, excepto em *Mycoplasma* e *Ureaplasma*. Os antibióticos antiparietais actuam nesta estrutura, impedindo a sua síntese. É esta estrutura que garante a sobrevivência das bactérias em ambientes com condições não

fisiológicas, pelo que um antibiótico que comprometa a integridade da parede celular causa a sua lise e consequente morte celular (Sousa, 2006).

A parede celular determina a forma da célula bacteriana e é composta por polímeros de peptidoglicano. A porção glicana é constituída por duas subunidades de monossacarídeos de N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetil-murânico (NAM), dispostos revezadamente, ligados por ligações glicosídicas β 1-4. Já a porção peptídica é composta por uma cadeia pequena de 4 aminoácidos. Estes aminoácidos realizam ligações cruzadas entre o 3º aminoácido de uma cadeia com o 4º aminoácido da cadeia vizinha, originando uma malha resistente (Sousa, 2006 e Strohl *et al.*, 2001).

A estrutura da parede celular bacteriana permite explicar o comportamento face à coloração Gram, sendo que algumas bactérias coram de roxo (Gram positivo) e outras de vermelho (Gram negativo) devido às diferenças químicas e morfológicas entre as paredes celulares dos dois tipos. Na figura 1 estão representadas as diferenças estruturais entre bactérias de Gram positivo e de Gram negativo.

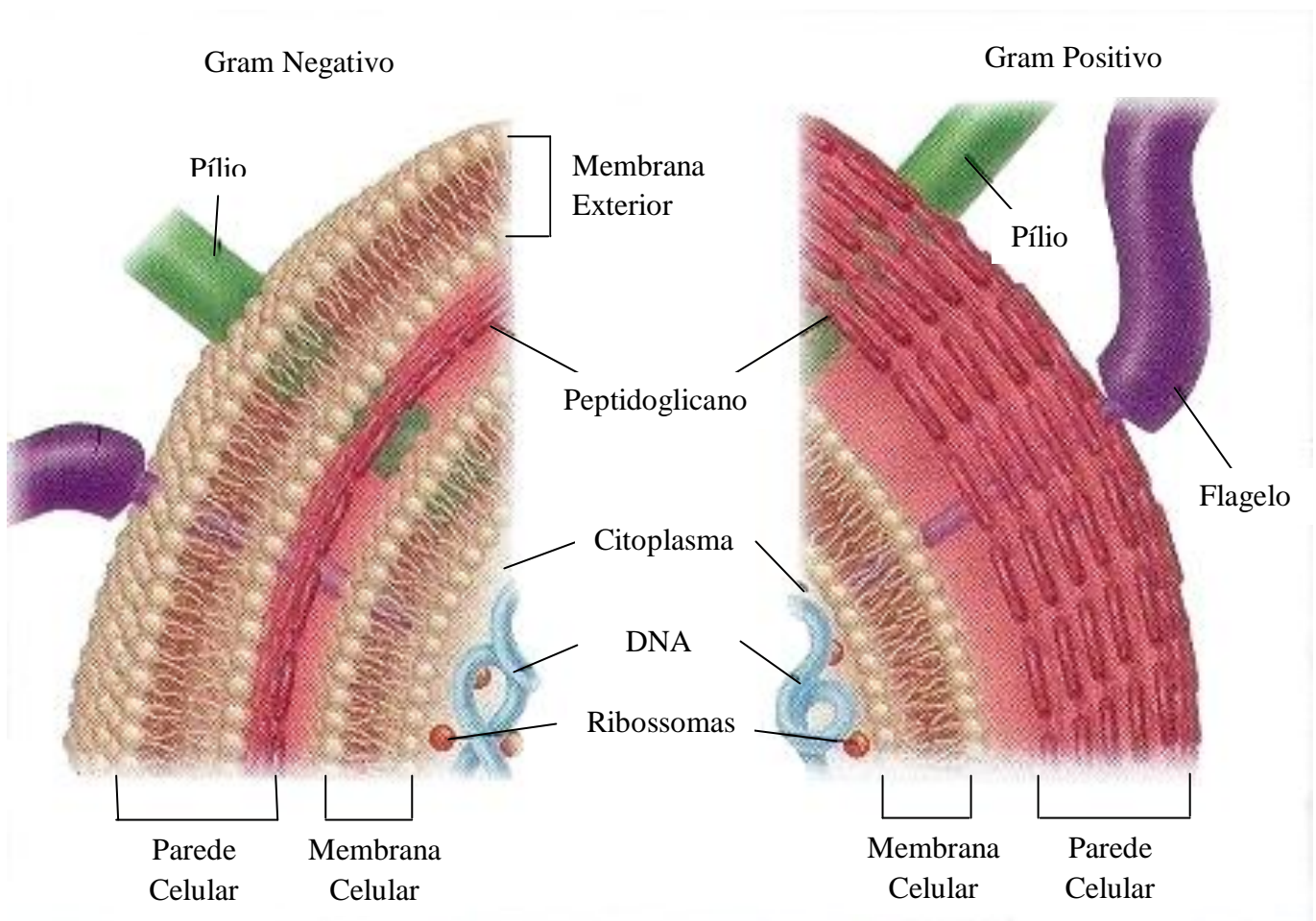


Figura 1: Diferenças estruturais entre bactérias de Gram positivo e de Gram negativo (adaptado de Read, 2010).

As bactérias de Gram positivo possuem uma parede celular bastante espessa, externa à membrana celular, com uma grande quantidade de peptidoglicano. Na maioria das espécies de bactérias de Gram positivo o peptidoglicano encontra-se ligado covalentemente ao ácido teicóico (Strohl *et al.*, 2001).

Os ácidos teicóicos são polímeros solúveis na água e são constituídos por resíduos de ribitol ou glicerol, unidos por ligações fosfodiéster e admite-se que estejam distribuídos por toda a parede celular. Há uma pequena porção dos ácidos teicóicos com glicerol que estão associados ao folheto exterior da membrana celular, denominados ácidos lipoteicóicos que se prolongam até a superfície da parede celular, constituindo os antígenos (Sousa, 2006).

As paredes celulares das bactérias de Gram negativo são estruturalmente mais complexas. Apresentam uma quantidade inferior de peptidoglicano que está localizado na camada R. Externamente, possuem uma bicamada fosfolípida, com lipoproteínas, lipopolissacarídeos e polissacáridos (membrana externa - OM). O espaço periplasmático, situado entre a membrana citoplasmática e parede celular, é um compartimento para enzimas hidrolíticas, que clivam macromoléculas do metabolismo. As enzimas podem ser proteases, fosfatases, lipases, nucleases, etc. No caso de bactérias de Gram negativo patogénicas podem encontrar-se colagenases, hialuronidasas, proteases e β -lactamases. Não existem ácidos teicóicos ou lipoteicóicos (Sousa, 2006 e Strohl *et al.*, 2001).

O peptidoglicano das bactérias de Gram negativo é muito semelhante ao das Gram positivo. No entanto, apresenta menos pontes interpeptídicas, que se estabelecem entre o grupo amina do ácido-meso-diaminopimélico e o grupo carboxilo da D-alanina da cadeia peptídica vizinha. A membrana exterior é impermeável a macromoléculas a resistente a compostos que intervêm na defesa do hospedeiro, como a lisozima, β -lisinas e proteínas dos leucócitos, sais biliares e enzimas digestivas, impede a entrada dos antibióticos por difusão e contém receptores para bacteriófagos e colicinas.

Os lipopolissacarídeos (LPS), também designados por endotoxinas, são poderosos estimuladores do sistema imunitário. Os LPS estimulam a activação dos linfócitos B e induzem a libertação de interleucina-1 e interleucina-6 e factores de necrose tumoral, é responsável pelo aumento da temperatura corporal, inflamação e pelo choque séptico. O LPS é uma molécula anfifílica, possuindo duas regiões: uma hidrófoba que está ancorada na OM e outra hidrófila que se estende para o exterior da célula, pelo que é responsável pela carga electronegativa à superfície da célula. Assim, os catiões bivalentes interagem com a porção hidrófila, aumentando a estabilidade da OM e diminuindo a penetração dos antibióticos, detergentes e corantes (Sousa, 2006).

Os fosfolípidos compreendem a fosfaditilcolina, o fosfaditilglicerol e a cardiolipina. A OM e a membrana citoplasmática por vezes estabelecem zonas de contacto, as zonas de adesão, que permitem o transporte de macromoléculas entre o citoplasma e a membrana externa e de fosfolípidos da membrana citoplasmática para a membrana externa. Estas zonas de adesão podem ainda apresentar receptores para

bacteriófagos, assim como ser uma via de entrada de compostos a utilizar no metabolismo bacteriano (Sousa, 2006).

As proteínas existentes na membrana externa estão presentes em grande quantidade e acumulam diversas funções. Estas proteínas, onde se incluem lipoproteínas, porinas, proteínas OmpA, permitem a difusão de moléculas hidrófilas de tamanho pequeno e por outro lado são uma barreira a antibióticos hidrófobos e enzimas como a lisozima. Podem ainda ser encontradas proteínas da família OprM relacionadas com o efluxo de substâncias da célula. As lipoproteínas representam as proteínas mais abundantes na OM. (Sousa, 2006).

As porinas são proteínas que se organizam de forma a formar poros ou canais que permitem a passagem de pequenas moléculas hidrófilas, de tamanho inferior a 700 daltons. Encontram-se distribuídas por toda a OM e são responsáveis pelo influxo de nutrientes. Desta forma, as porinas podem representar uma boa via de influxo de antibióticos, no entanto, nesta perspectiva, bactérias com reduzido número de canais de porinas ou porinas de pequeno tamanho apresentam uma resistência intrínseca a antibióticos (Sousa, 2006).

As autolisinas são enzimas hidrolíticas sintetizadas pela própria bactéria que actuam no peptidoglicano, de forma a regular o crescimento bacteriano. Nas bactérias de Gram positivo, os antibióticos inibidores da síntese do peptidoglicano são bacteriostáticos, visto que inibem apenas o crescimento, sendo que a lise celular ocorre devido à acção das autolisinas (Sousa, 2006).

III. *Enterococcus* spp

Os *Enterococcus* foram inicialmente identificados como cocos de Gram positivo de origem entérica, e incluídos no género *Streptococcus*. Nos anos 30, com a implementação dos testes serológicos de Lancefield, os *Enterococcus* foram classificados como *Streptococcus* do grupo D e foram diferenciados dos *Streptococcus* do grupo D de origem não entérica, como o *Streptococcus bovis*, através de

características bioquímicas. Sherman propôs, em 1937, uma árvore filogenética para caracterizar os enterococos e mais ainda, propôs que fossem apenas designados por “*Enterococcus*” os *Streptococcus* que crescessem a 10 e 45°C, a pH de 9.6, e num meio com concentração de 6,5% de NaCl e sobrevivessem durante 30 min à temperatura de 60°C. Estes organismos possuem ainda a capacidade de hidrolisar a esculina na presença de bÍlis (Cetinkaya *et al.*, 2000 e Huycke *et al.*, 1998).

Em 1980, os *Enterococcus* foram removidos do género dos *Streptococcus* e passaram a ser considerados também como um género, devido às diferenças genéticas existentes. As espécies anteriormente identificadas passariam agora a ser precedidas de *Enterococcus* em vez de *Streptococcus*. A análise filogenética do género de cocos de Gram positivo, catalase negativa baseada na comparação de sequências de genes de 16S rRNA demonstrou que os *Enterococcus* estão mais próximos dos *Vagococcus*, *Tetragenococcus* e *Carnobacterium* do que dos *Streptococcus* e *Lactococcus*, aos quais se encontravam associados (Murray, 1990). Na figura 2 está representada a relação filogenética entre várias espécies.

Apesar de terem sido identificadas várias espécies, apenas algumas são mais prejudiciais ao Homem, na medida em que são frequentemente causadoras de infecções, como o *E. faecalis* e *E. faecium* (Huycke *et al.*, 1998).

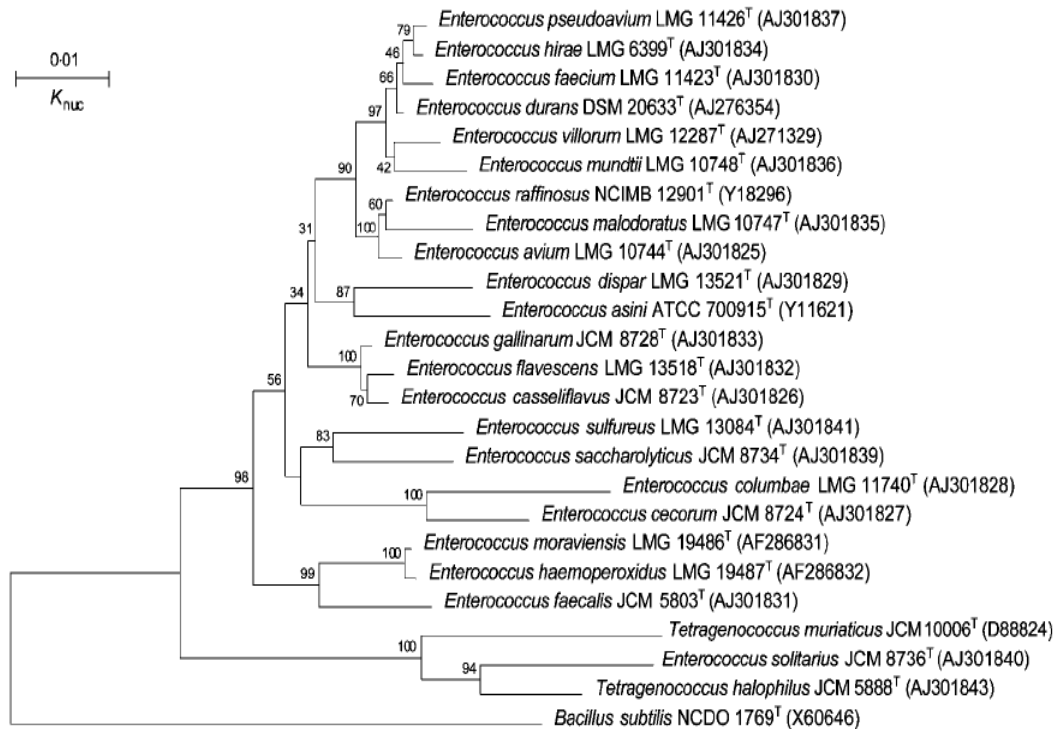


Figura 2 : Árvore filogenética baseada na análise das sequências genéticas de 16S rRNA de várias espécies de *Enterococcus* (adaptado de Ennahar e Cai, 2005).

Os membros do género *Enterococcus*, como referido anteriormente, são cocos de Gram positivo, catalase negativa, que se podem agrupar em cadeias curtas ou surgir isolados. Após 24h do isolamento em gelose sangue é possível visualizar colónias com cerca de 1 a 2 mm de diâmetro, apesar de haver colónias com diâmetro inferior. A grande maioria das espécies são α -hemolíticas ou não hemolíticas, à excepção do *E. faecalis* que pode ser β -hemolítico em meios que contém sangue de coelho, cavalo e humano e *E. durans* que apresenta β -hemólise independentemente do meio.

Os *Enterococcus* são geralmente anaeróbios facultativos e produzem ácido láctico resultante da fermentação da glicose, não produzem gás e possuem um crescimento óptimo a 35°C, podendo subsistir a outras temperaturas. Além da hidrólise da esculina na presença de bÍlis, podem ainda hidrolisar a leucina- β -naftilamida pela produção de leucina aminopeptidase. Algumas espécies apresentam mobilidade (*E. casseliflavus* e *E. gallinarum*) e outras são pigmentadas (*E. cassilflavus*, *E. gilvus*, *E.* (Murray, 1990 e Cetinkaya *et al.*, 2000).

IV. Antibióticos

1. História da Antibioterapia

Os antibióticos têm sido usados há vários séculos. Há relatos de que o Homem pré-histórico já utilizava uma grande variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas no tratamento da enfermidade, através do conhecimento empírico.

Foi apenas no século XIX que os cientistas começaram a examinar mais atentamente várias substâncias para desvendar exactamente como e porquê eram eficazes. Nesta época, as doenças infecciosas consideradas mortais (sífilis, lepra, tuberculose, infecções pulmonares e meningite bacteriana) alastravam a um ritmo galopante, pelo que era necessário tomar medidas (Sousa, 2006).

Em 1889 surge o termo *antibiótico*, criado por Vuillemin. Alguns anos mais tarde em 1944, Waskman utiliza este termo para classificar antibióticos naturais, obtidos através de reacções metabólicas de microrganismos como fungos. Em 1928, por acidente, Alexander Fleming descobre a penicilina (Tabela 1), o primeiro antibiótico natural produzido por um fungo do solo, o *Penicillium notatum*, que impede o crescimento bacteriano ou causa a sua morte celular (Rolinson, 1998, Sousa, 2006).

Antibióticos	Data da sua descoberta	Origem
Penicilina	1928	<i>Penicillium notatum</i>
Sulfanilamida	1935	<i>Síntese química</i>
Estreptomicina	1944	<i>Streptomyces griseus</i>
Gramicidina	1944	<i>Bacillus brevis</i>
Bacitracina	1945	<i>Bacillus licheniformis</i>
Cloranfenicol	1947	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Polimixina	1948	<i>Bacillus polymyxin</i>
Cefalosporinas	1952	<i>Cephalosporium</i> spp
Eritromicina	1953	<i>Streptomyces erythreus</i>
Tetraciclina	1956	<i>Streptomyces</i> spp
Vancomicina	1957	<i>Streptomyces orientalis</i>
Rifampicina	1962	<i>Streptomyces mediterranei</i>
Ácido Fusídico	1962	<i>Fusidium coccineum</i>
Gentamicina	1963	<i>Micromonospora purpura</i>

Tabela 1: Descoberta e origem de antibióticos (adaptado de Sousa, 2006).

A estreptomicina foi também descoberta a partir de culturas de *Streptomyces griseus* por Waksman e outras moléculas se seguiram. A geração pós-Segunda Grande Guerra foi a primeira a beneficiar de um sistema de saúde moderno, cujo objectivo era a eliminação da dor e desconforto de muitas doenças infecciosas que dizimavam populações no passado (Bennet, 2008).

Nos anos 50 e 60 apareceram novas moléculas e, devido aos avanços técnicos, passou a ser possível sintetizar e modificar quimicamente moléculas já existentes. Um exemplo disso é o ácido 6-aminopenicilâmico (6-APA), que surgiu da digestão enzimática da benzilpenicilina e permitiu obter novos antibióticos semi-sintéticos a partir da modificação das cadeias laterais do núcleo de penemo. A partir do 7-APA (ácido aminocefalosporânico) foi possível obter derivados da cefalosporina C, por introdução de radicais químicos nas cadeias laterais de núcleo de cefemo (Sousa, 2006).

O aparecimento de antibióticos e a sua aplicação no tratamento de infecções revolucionou a Medicina. No entanto, a sua utilização em grande escala promoveu o

aparecimento de resistências, o que diminuiu as opções terapêuticas. Logo após o uso da penicilina foram identificadas estirpes de *Staphylococcus* resistentes. Hoje em dia, cerca de 80% das estirpes de *Staphylococcus* são resistentes à penicilina (Sousa, 2006). Em 1953, foi encontrada a primeira *Shigella* resistente a sulfanilamidas. Assim, ainda nos anos 60, surgiu uma segunda geração de antibióticos, os derivados da penicilina. São antibióticos semi-sintéticos, sintetizados com o objectivo de ultrapassar os problemas ligados ao aparecimento de resistência à penicilina, como a meticilina e ampicilina. Isolaram-se, mais tarde, outros compostos, como o ácido clavulânico em 1976, que inibe as β -lactamases. Em 1981, associou-se este composto à amoxicilina para aumentar o seu espectro de acção. A década de 90 assistiu à emergência de superbactérias, bactérias que resistem a todos os tipos de antibióticos conhecidos. A tuberculose tornou-se então uma infecção extremamente difícil de tratar e, neste momento, é a maior causa de morte por doenças infecciosas em todo o Mundo (Sousa, 2006).

O principal desafio dos dias de hoje reside numa busca rápida de compostos eficazes e que excedam a capacidade bacteriana de mutar e adquirir resistências.

2. Antibióticos Antiparietais

Os antibióticos antiparietais actuam em diversas fases da síntese do peptidoglicano. Apenas os antibióticos que actuam na fase citoplasmática necessitam de atravessar a membrana bacteriana. Actuam na fase membranar como a vancomicina, bacitracina e ristocetina e outros, como os β -lactâmicos, actuam na fase parietal da síntese do peptidoglicano. Em bactérias de Gram positivo, como *Enterococcus* spp, a penetração de antibióticos na membrana celular está facilitada, comparativamente com as bactérias de Gram negativo, cuja composição química e coeficiente de partilha da parede celular representam um obstáculo. Não obstante, esta classe de antibióticos possui apenas actividade bacteriostática em bactérias em crescimento e em ambiente hipotónico, sendo que o efeito bacteriolítico é uma consequência da activação do efeito autolítico endógeno bacteriano (Sousa, 2006).

A vancomicina e a teicoplanina são ambos antibióticos bacteriolíticos, com um mecanismo de acção muito semelhante. São ambos glicopeptídeos que inibem a síntese de peptidoglicano na fase membranar, activos contra bactérias em crescimento, sendo a teicoplanina mais activa contra *Enterococcus* e *Staphylococcus*. Estes antibacterianos ligam-se, através de ligações de hidrogénio e interacções hidrofóbicas, aos péptidos D-alanil-D-alanina precursores do peptidoglicano, impedindo a transferência destas unidades para a matriz parietal, culminando na lise da célula bacteriana que se encontra em crescimento, por acção das autolisinas endógenas (Sousa, 2006 e Jung *et al.*, 2009).

De um modo geral, a vancomicina e a teicoplanina não possuem actividade contra bactérias de Gram negativo, pois não conseguem atravessar os canais de porina na membrana externa. Algumas bactérias de Gram positivo adquiriram resistência a estes antibióticos através de um ou vários mecanismos. Ainda não está completamente clarificada a origem dos genes de resistência à vancomicina. Alguns organismos na natureza (*Amycolatopsis orientalis*, *Streptomyces toyacaensis*) são naturalmente produtores de glicopeptídeos, pelo que possuem genes de resistência à vancomicina. Estes genes podem ter sido transferidos de alguma forma para *Enterococcus*. Por outro lado, a disseminação de *Enterococcus* Resistentes à Vancomicina (VRE) podem ter sido disseminada entre os humanos através do uso da vancomicina na prática clínica ou pela utilização de avoparcina na alimentação animal como promotor de crescimento. Até hoje, foram identificados seis genótipos de resistência aos glicopéptido em *Enterococcus*: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* e *vanG*. Em organismos resistentes à vancomicina os compostos intermediários do peptidoglicano são alterados D-alanil-D-lactato (*vanA*, *vanB* e *vanD*) ou D-alanil-D-serina (*vanC*, *vanE* e *vanG*) ao invés de D-alanil-D-alanina, reduzindo assim a afinidade da vancomicina e aumentando a CMI. (Sousa, 2006, Cetinkaya *et al.*, 2000, Levine, 2006).

Os antibióticos β -lactâmicos são antibióticos muito utilizados, pois só actuam na síntese do peptidoglicano, sendo altamente específicos para células bacterianas e eficazes com baixa toxicidade. Os antibióticos pertencentes ao grupo dos β -lactâmicos possuem um anel β -lactâmico constituído por três átomos de carbono e um de nitrogénio com radicais substituintes. Nas cefalosporinas, o anel β -lactâmico encontra-se fundido com um anel dihidrotiazina (nas penicilinas está fundido com um anel de

tiazolidina). Pela modificação dos radicais ligados aos anéis pode-se alterar o espectro de acção, aumentar a resistência ao suco gástrico e até a farmacocinética, aumentando a sua absorção. As penicilinas ligam-se às D-D-carboxipeptidases-transpeptidases, que são enzimas que promovem as pontes interpeptídicas entre cadeias peptídicas vizinhas do peptidoglicano na fase parietal. As D-D-carboxipeptidases são denominadas colectivamente por PBP (Penicillin-Binding-Proteins). As bactérias desenvolveram mecanismos para escapar ao efeito bacteriolítico dos antibióticos: por produção de β -lactamases, por modificação dos PBPs e por bombas de efluxo (Sousa, 2006).

As β -lactamases são enzimas excretadas pelas bactérias que hidrolizam o anel β -lactâmico, inactivando o antibiótico. Dependendo da sua especificidade, as β -lactamases podem ser chamadas penicilases, cefalosporinases e carbapenemases e são as principais determinantes da resistência bacteriana (Sousa, 2006).

Outra forma de as bactérias escaparem à acção dos antibióticos é pela modificação dos PBPs, através de mutações nos genes produtores de PBPs, recombinações homólogas entre os genes de PBPs com síntese de novos PBPs com pouca afinidade para os β -lactâmicos, conferindo assim resistência a esta classe de antibióticos (Sousa, 2006).

Um outro factor importante de resistência é a presença de proteínas de efluxo na membrana, designadas de bombas de efluxo. A sua função é exportar moléculas através do envelope bacteriano, impedindo a acumulação de compostos tóxicos intracelulares. Se estas bombas estiverem presentes em grande quantidade podem ser responsáveis por resistência cruzada, já que conferem, pelo mesmo mecanismo, resistência a vários antibióticos (Sousa, 2006).

3. Antibióticos Inibidores da Síntese Proteica

Uma vez que existem diferenças entre as unidades ribossomais bacterianas e das células humanas, é possível utilizar antibióticos que inibam a síntese proteica sem efeitos adversos graves para o hospedeiro. No entanto, como as mitocôndrias das células eucariótas possuem ribossomas 70S, podem ser susceptíveis a antibióticos, especialmente se se tratar de moléculas muito lipófilas, cuja concentração intracelular é

muito elevada, podendo provocar a inibição da síntese proteica mitocondrial (Sousa, 2006).

O complexo ribossomal 70S é formado pela associação das subunidades 30S e 50S, sendo que as diversas moléculas de antibióticos actuam numa subunidade ou na outra. De um modo geral, o mecanismo de acção é bacteriostático (Sousa, 2006).

Os antibióticos aminoglicosídeos-aminociclitolis pertencem a esta classe. São constituídos por 2 ou mais açúcares aminados unidos por ligações glicosídicas a um núcleo aminociclitol. Para que estes antibióticos exerçam acção ao nível do ribossoma é necessário que haja a penetração através do invólucro bacteriano (Sousa, 2006).

A estreptomicina é um antibiótico aminoglicosídeo-aminociclitol obtido a partir de culturas de *Streptomyces griseus*. Uma vez no citoplasma, a estreptomicina liga-se à proteína da subunidade 30S dos ribossomas, evitando a formação de complexos de iniciação. A síntese proteica está assim impedida pela formação destes complexos anormais irreversíveis que se acumulam nas células bacterianas (Sousa, 2006).

A gentamicina é produzida por *Micromonospora purpurea* e é constituída por vários produtos.

As resistências podem ocorrer por:

- Inactivação enzimática – quando diversas enzimas mediadas por plasmídeos, transposões e integrões modificam as moléculas dos antibióticos pela acetilação dos grupos –NH₂, fosforilação dos grupos – OH e nucleotidilação dos grupos – OH;
- Alterações dos ribossomas por mutação – quando ocorre uma mutação ao nível das unidades 30S e 50S, deixando de haver afinidade entre os ribossomas e os antibióticos;
- Reduzida difusão através dos invólucros bacterianos – as moléculas do aminoglicosídeo têm de atravessar o invólucro bacteriano, chegar ao citoplasma e actuar nos ribossomas;
- Protecção ribossomal por metilação do 16S rRNA – impedem a acção dos antibióticos na subunidade 30S pela produção de metilases (Sousa, 2006).

4. Tetraciclina e Gliciclina

As tetraciclina são um grupo de antibióticos que contêm um núcleo hidroxinaftaceno, constituído por 4 anéis benzénicos fundidos e possuem um mecanismo bacteriostático, quando utilizadas em dose terapêutica, e bactericida em concentrações mais elevadas. As tetraciclina inibem primariamente a síntese proteica bacteriana, actuando ao nível da subunidade 30S dos ribossomas à semelhança dos aminoglicosídeos (Chopra e Roberts, 2001).

As resistências às tetraciclina são devidas à mutação ribossómica, à fraca incorporação celular e ao efluxo de antibiótico e à protecção ribossomal. A fraca incorporação do antibiótico é especificado por diferentes determinantes genéticos de resistência (genes *tet*), que codificam proteínas TET (Chopra e Roberts, 2001).

5. Cloranfenicol

O cloranfenicol é um antibiótico de largo espectro, eficaz tanto em bactérias de Gram positivo e de Gram negativo. É um antibiótico bastante solúvel, o que permite a sua excelente difusão nos tecidos e fluidos corporais, pelo que penetre a barreira hematoencefálica. Infelizmente, possui efeitos adversos como trombocitopenias e anemias aplásticas irreversíveis, que condicionam o seu uso (Sousa, 2006).

O cloranfenicol actua por inibição da síntese proteica, na subunidade 50S ribossomal, tendo uma actividade bacteriostática. Atravessam a MC por solubilização e difusão e atingem o citoplasma bacteriano sem a intervenção de transportadores (Sousa, 2006).

O mecanismo de resistência mais frequente é a inactivação enzimática do antibiótico, sendo que as resistências também ocorrem por impermeabilização dos invólucros bacterianos, alteração ribossómica e bombas de efluxo (Sousa, 2006).

6. Macrólidos

Os macrólidos são uma família de antibióticos heterosídicos cujas geninas ou agliconas apresentam funções lactónicas. A eritromicina foi o primeiro antibiótico importante a ser isolado. Quimicamente é um macrólido cujo anel lactónico possui 14 átomos, sendo que existem macrólidos de 14, 15 e 16 átomos de carbono do anel lactónico. Devido às suas características moleculares, a eritromicina liga-se extensivamente às proteínas, tendo uma boa distribuição pelos tecidos e é eficaz contra bactérias de Gram positivo e algumas de Gram negativo (Sousa, 2006).

Os macrólidos exercem a sua actividade antimicrobiana nos ribossomas procariotas, ao nível da subunidade 50S, com efeitos bacteriostáticos, inibindo a transpeptidases/translocação. À semelhança das outras famílias de antibióticos inibidores da síntese proteica, necessitam de atravessar a parede celular e a membrana citoplasmática para que ocorra efeito bacteriostático. Os mecanismos de resistência são os mesmos descritos anteriormente para o cloranfenicol (Sousa, 2006).

7. Streptograminas A+B

As streptograminas A+B mais utilizadas são a dalfopristina associada à quinupristina, ambas derivadas da pristinamicina. Estas moléculas possuem um efeito bactericida quando utilizadas em associação e bacteriostático usadas isoladamente.

A associação quinupristina-dalfopristina liga-se irreversivelmente à subunidade 50S ribossomal, formando um complexo terciário quinupristina-ribossoma-dalfopristina. O seu mecanismo é muito semelhante ao dos macrólidos já que actua na inibição da síntese proteica ao nível da peptidil-transferase.

As estirpes bacterianas apresentam mecanismos de resistência diferentes para cada uma das moléculas:

- As estirpes resistentes à quinupristina apresentam resistência aos macrólidos, mediada pelo gene *erm*.
- As estirpes resistentes à dalfopristina possuem acetiltransferases, mediadas pelos genes *vatA*, *vatB* e *vatC*, que acetilam a molécula de –OH, tornando-a inactiva. Pode dever-se também à presença dos genes *vgaA* e *vgaB* que codificam bombas de efluxo.

A presença destas resistências limita o uso clínico do antibiótico uma vez que a sua acção passa a ser somente bacteriostática (Sousa, 2006).

8. Oxazolidinonas

As oxazolidinonas são uma nova classe terapêutica descoberta na década de 80. Através de modificações estruturais foi sintetizada a linezolida. O linezolida é um composto de síntese química, inibidor da síntese proteica, que não exhibe reacções cruzadas com outros antibióticos. Os seus efeitos são essencialmente bacteriostáticos (Sousa, 2006).

O linezolida é um composto com afinidade para a subunidade 50S, na interface com a subunidade 30S, impedindo que o complexo de iniciação, ou seja impedindo que a subunidade 30S se associe à subunidade 50S. Como consequência impossibilita a ligação e leitura do RNAm (Sousa, 2006).

As mutações que culminam em resistências estão associadas exclusivamente ao local activo da peptidiltransferase (Sousa, 2006).

9. Nitrofurantoína

A nitrofurantoína é um composto específico para o tratamento e profilaxia da infecção urinária baixa (cistite). É um antibiótico com boa absorção oral e com eliminação rápida urinária. Possui um poder bacteriostático, no entanto, como atinge concentrações muito elevadas na urina ácida, adquire um efeito bactericida contra

agentes etiológicos da infecção urinária baixa (*E.coli*, *S.saprophyticus*, *Enterobacter* spp., etc.) (Sousa, 2006).

O mecanismo de acção da nitrofurantoína não é bem conhecido, no entanto, perturba vários sistemas enzimáticos bacterianos, com prejuízo do metabolismo, síntese de DNA e RNA. Desta forma a nitrofurantoína tem um mecanismo de acção multifactorial, o que explica a baixa resistência bacteriana apesar dos vários anos de utilização terapêutica (Sousa, 2006).

10. Quinolonas

A ciprofloxacina é uma 6-fluoroquinolona à qual foi adicionada um ciclo aminado com a finalidade de aumentar o espectro antibacteriano, quando comparada com o ácido nalidíxico, a molécula original. É activa contra bactérias de Gram negativo, não tendo, no entanto, grande actividade contra bactérias de Gram positivo (Sousa, 2006).

As quinolonas actuam na topoisomerase IV, nas bactérias de Gram positivo. A DNA girase remove os superenrolamentos à frente da forquilha de replicação e a topoisomerase IV abre a molécula de DNA antes da forquilha de replicação. Assim, a acção das topoisomerases asseguram o correcto desdobramento do DNA para a replicação. As quinolonas inibem a acção da topoisomerase, comprometendo, desta forma, a replicação do DNA, que culmina na morte celular, o que justifica o efeito bactericida desta classe de antibióticos (Sousa, 2006).

As resistências podem ocorrer por efluxo do antibiótico, por mutação das enzimas-alvo e por acetilação do radical piperazina, ocorrem rapidamente durante a utilização de fluoroquinolonas em terapêutica, sendo por isso de uso limitado (Sousa, 2006).

V. Resistência de *Enterococcus* a agentes antimicrobianos

Tem sido dada especial atenção aos *Enterococcus* não só pelo aumento da relevância em infecções nosocomiais, como também devido ao aumento de resistências a agentes antimicrobianos. Estes dois factores encontram-se intimamente ligados, uma vez que a existência de resistências permite aos *Enterococcus* sobreviverem num ambiente em que os antibióticos são extensivamente utilizados e, por outro lado, a vasta utilização de antibióticos nos hospitais exercem pressão selectiva uma vez que eliminam as bactérias susceptíveis e disseminam as resistentes através de infecções nosocomiais (Murray, 1990).

A resistência a antibióticos pode dividir-se em intrínseca e adquirida. A resistência inerente ou intrínseca é um tipo de resistência característica das espécies presente na maioria das variantes dessa espécie. Já a resistência adquirida resulta de uma mutação no DNA ou aquisição de novo DNA. As resistências intrínsecas mais comuns expressas por *Enterococcus* incluem a resistência a penicilinas semisintéticas resistentes a penicilases, cefalosporinas, baixa resistência a aminoglicosídeos e clindamicina. As resistências adquiridas incluem resistência ao cloranfenicol, eritromicina, resistência a concentrações elevadas de clindamicina, tetraciclina, resistência a concentrações elevadas de aminoglicosídeos, à penicilina através da produção de penicilinases, fluoroquinolonas e vancomicina (Murray, 1990).

1. Resistência Intrínseca

(i) β -lactâmicos

Os enterococos possuem como característica do Género a resistência a antibióticos β -lactâmicos, isto é, são resistentes a todos os β -lactâmicos e sobrevivem a concentrações superiores à concentração mínima inibitória. Este facto deve-se à fraca afinidade entre os seus PBPs e os β -lactâmicos. (Murray, 1990 e Cetinkaya *et al.*, 2000). São isolados excepcionalmente enterococos produtores de β -lactamases, sendo no entanto não indutíveis e dependentes da quantidade de inóculo (Cetinkaya *et al.*, 2000).

(ii) Aminoglicosídeos

Relativamente aos aminoglicosídeos, os *Enterococcus* spp são pouco resistentes. Os baixos níveis de resistência em *E. faecalis* parecem dever-se à baixa penetração dos antibióticos. Quando se é administrado antibióticos inibidores da síntese da parede celular, como a penicilina ou vancomicina, a penetração de aminoglicosídeos é aumentada, sendo a morte celular uma consequência do sinergismo presente entre estas duas classes de antibióticos (Murray, 1990).

2. Resistência Adquirida

Como referido anteriormente, a resistência a antibacterianos pode ser adquirida através de mutação de DNA ou aquisição de novo DNA. Geralmente a aquisição de novo DNA ocorre por transformação, transdução ou conjugação. Apenas se conhece a conjugação como o processo de aquisição de resistências em *Enterococcus* spp, a qual pode ocorrer de três formas distintas: plasmídeos de espectro ampliado, plasmídeos de espectro curto ou por transposões conjugativos (Murray, 1990 e Harbottle *et al.*, 2006).

A conjugação é um processo que envolve o contacto célula a célula para que haja a disseminação de elementos móveis (plasmídeos e transposões) e mobilizáveis (plasmídeos, transposões, integrões/cassetes de genes) que podem ser incluídos nos meios móveis (Murray, 1990).

(i) Plasmídeos

Os plasmídeos são moléculas de DNA de cadeia dupla circular que contêm informação genética que codifica a resistência a antibióticos, genes de replicação, metabolismo, fertilidade, resistência a bacteriocinas e bacteriófagos. Os plasmídeos podem ser considerados conjugativos, quando são móveis, ou não conjugativos quando são mobilizáveis. Determinados plasmídeos são aptos a ser transferidos entre apenas um restrito número de espécies bacterianas, enquanto outros são mobilizados entre múltiplas espécies (Bennet, 2008 e Harbottle *et al.*, 2006).

É comum o mesmo plasmídeo transportar genes que oferecem resistência a várias classes de antibióticos, tornando a estirpe bacteriana multirresistente. Podem também existir células bacterianas com vários plasmídeos em que cada um codifica um

tipo de resistência diferente (Bennet, 2008 e Harbottle *et al.*, 2006). A transferência de plasmídeos, associados ou não a elementos genéticos móveis (integrões e transposões), entre diversas espécies bacterianas, provoca a disseminação de resistências (Bennet 2008 e Harbottle *et al.*, 2006).

É de referir que os plasmídeos não são necessários à sobrevivência das bactérias, aliás, na ausência da pressão causada pelos antibióticos podem mesmo desaparecer. (Bennet, 2008 e Harbottle *et al.*, 2006).

(ii) Transposões e sequências de inserção

Os transposões são sequências de DNA que se movem entre plasmídeos, do plasmídeo para o cromossoma e do cromossoma para o plasmídeo contribuindo para a expressão e disseminação de genes de resistência a antibióticos. Os transposões podem mover-se entre células bacterianas através de plasmídeos ou podem autotransferirem-se, sendo denominados transposões conjugativos (Bennet, 2008 e Harbottle *et al.*, 2006).

Os transposões apresentam-se sob várias formas estruturais, de proximidade genética e mecanismos de transposição, podendo albergar vários genes de resistência. Estes elementos móveis ainda compreendem elementos mais pequenos denominados por sequências de inserção (IS), representados na Figura 3 (Bennet, 2008).

As IS são pequenos elementos móveis, com cerca de 0,8 a 2,5 kpb e possuem apenas a informação genética necessária à transposição. As IS estão frequentemente ligadas a pequenas sequências que se repetem, orientadas invertidamente (IR) (Depardieu *et al.*, 2007).

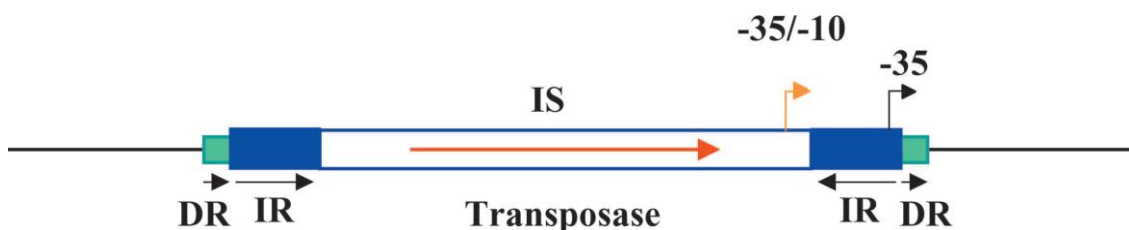


Figura 3: Características de IS; DR- repetição directa; IR- repetição inversa (adaptado de Depardieu *et al.*, 2007).

(iii) Cloranfenicol

A resistência ao cloranfenicol está disseminada entre os enterococos. Aliás, cerca de 20 a 42% dos enterococos são resistentes ao cloranfenicol. Esta resistência é mediada por acetiltransferases (Murray, 1990).

(iv) Eritromicina

A resistência à eritromicina ocorre como parte do fenótipo de resistência aos macrólidos-lincosamidas-estreptogramina, que adicionalmente está relacionado com um alto grau de resistência à clindamicina. O mecanismo envolve a metilação de um resíduo de adenosina presente no 23S rRNA. O gene responsável pela resistência é o *ermB*, transportado pelo transposição Tn917, disseminado nos animais como no homem (Murray, 1990).

(v) Tetraciclina

Foram encontrados vários genes que conferem resistência às tetraciclinas: o *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetK* e *tetS*. Estes genes conferem resistências através de dois mecanismos diferentes: *tetL* media o efluxo activo da tetraciclina para o exterior das células, enquanto *tetM* confere protecção aos ribossomas da inibição da tetraciclina. Um facto curioso é o de o plasmídeo pAM α 1, que transporta o gene *tetL*, ser amplificado quando o hospedeiro se desenvolve em concentrações subinibitórias de tetraciclinas (Chopra e Roberts, 2001 e Murray, 1990).

(vi) Aminoglicosídeos

De acordo com o que foi mencionado anteriormente, os enterococos possuem uma resistência intrínseca baixa a aminoglicosídeos. Se esta for a única resistência expressa, então a adição de um composto inibidor da síntese da parede celular aumentaria a taxa de morte das células bacterianas por efeito sinérgico (Murray, 1990).

No entanto, algumas estirpes de enterococos adquiriram resistências a aminoglicosídeos e, conseqüentemente, ao efeito sinérgico também. As resistências mais encontradas são à estreptomicina e gentamicina e podem ocorrer por dois mecanismos: resistência ribossomal e modificação enzimática na adeniltransferase (Cetinkaya *et al.*, 2000, Murray, 1990, Harbottle *et al.*, 2006).

(vii) *Enterococcus* produtores de β -lactamases

Na maioria das vezes o gene que codifica a produção de β -lactamase está inserido num plasmídeo que também codifica a resistência à gentamicina. Muitas vezes é difícil detectar a produção de β -lactamase em testes de susceptibilidade, uma vez que, quando o inóculo está em pequena quantidade, o resultado é negativo para a produção de β -lactamases (efeito do inóculo); isto deve-se ao facto de que as células bacterianas, em baixo número, não produzirem β -lactamase em quantidade suficiente para serem resistentes (Murray, 1990).

Geralmente, as β -lactamases produzidas conseguem hidrolizar a penicilina, ampicilina e piperacilina (assim como outros compostos ureidopenicilínicos); verifica-se pouca ou nenhuma inactivação das penicilinas semisintéticas, cefalosporinas e imipenemos (Murray, 1990).

(viii) *Enterococcus* resistentes à penicilina não produtores de β -lactamases

O aparecimento deste tipo de variantes pode ser um exemplo extremo de resistência intrínseca, comum no *E.faecium* e associada a baixa afinidade dos PBPs ou pode representar resistência adquirida (Murray, 1990).

(ix) Vancomicina

A vancomicina foi utilizada durante mais de 30 anos sem o aparecimento de resistências, no entanto em 1988 foram isolados em Inglaterra os primeiros *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes à vancomicina, desde então têm sido isoladas várias estirpes por toda a Europa com este tipo de resistências (Levine, 2006 e Cetinkaya *et al.*, 2000).

Até agora foram reconhecidos seis padrões de resistência : *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* e *vanG* (Levine, 2006).

Os genes de resistência *vanA*, *vanB* e *vanD* são genes adquiridos que induzem grandes resistências à vancomicina e teicoplanina. A expressão destes genes resulta na síntese anormal dos precursores terminais do peptidoglicano em D-Ala-D-lactato em vez de D-Ala-D-Ala. A vancomicina possui uma afinidade menor para o lactato, sendo esta a causa da resistência. Curiosamente, a nível da Europa, é mais comum isolar bactérias que possuam o gene *vanA* e a nível dos Estados Unidos o gene *vanB* é o mais disseminado (Cetinkaya, 2000 *et al.* e Depardieu *et al.*, 2007).

Já os genes *vanC*, *vanE* e *vanG* são semelhantes aos genes anteriores no seu mecanismo de acção, isto é, actuam na síntese anormal dos precursores do peptidoglicano, substituindo o último aminoácido de alanina por serina. A substituição de D-Ala por D-Ser traduz-se numa ligação mais fraca entre o peptidoglicano e a vancomicina, tornando a bactéria resistente ao seu efeito (Levine, 2006 e Depardieu *et al.*, 2007).

Uma das maiores preocupações dos bacteriologistas é o potencial que os VRE possuem para disseminar genes de resistência entre outras espécies, em particular para *S. aureus* (Levine, 2006).

VI. Factores de Virulência

A produção de factores de virulência é mais um mecanismo adoptado pelas bactérias do Género *Enterococcus* que lhes confere vantagem relativamente a bactérias não produtoras deste tipo de péptidos (Dupont *et al.*, 2008, Poeta *et al.*, 2008, Sood *et al.*, 2008).

Os *Enterococcus* produzem péptidos antimicrobianos denominados bacteriocinas, ou mais concretamente enterocinas com actividade inibitória das estirpes filogeneticamente mais próximas (Poeta *et al.*, 2008).

Os sistemas utilizados podem ser produção de citolisinas, substância de agregação, proteínas de adesão, superóxido extracelular, proteínas de superfície extracelular, hemolisina e gelatinase. Os mecanismos pelos quais são expressados estes factores não estão completamente esclarecidos, no entanto, a grande maioria das

bactérias que produzem citolisinas produzem também substâncias de agregação, pelo que actuam por sinergismo (Dupont *et al.*, 2008, Sood *et al.*, 2008, Huycke *et al.*, 1998).

Espécies produtoras de superóxido são destrutivas para o tecido dos mamíferos (Sood *et al.*, 2008).

As citolisinas são toxinas bacterianas que desencadeiam a actividade hemolítica e bactericida e a sua produção é determinada pela presença do gene *cyl*. É sugerido que as bactérias produtoras de citolisinas possuem uma vantagem ecológica sobre as outras que habitam o mesmo ecossistema (Poeta *et al.*, 2008).

O gene *asal* é responsável pela produção de substância de agregação e o gene *gel* pela produção de gelatinase (Billstrom *et al.*, 2008).

Uma outra característica associada à virulência de enterococos é a expressão de proteínas de superfície, como o gene *esp* que aumenta a capacidade de ligação da célula bacteriana à superfície das células epiteliais dos hospedeiros. O gene *esp* surge muitas vezes em associação ao gene *hyl*, que codifica a produção de hialuronidase, apesar de o mecanismo ainda não ser completamente conhecido. (Billstrom *et al.*, 2008). Desta forma, os enterococos conseguem colonizar outros locais para além do intestino, escapar ao sistema imunitário e obter todos os nutrientes necessários à sua sobrevivência (Huycke *et al.*, 1998).

VII. Material e Métodos

1. Recolha e Processamento das Amostras

Foram analisadas amostras de água utilizada para o consumo humano e animal em várias regiões de Portugal, colhidas entre os anos de 2006 e 2008. Estas amostras provinham de minas (n=18), fontes públicas (n=12), poços privados (n=11) e poços artesianos (n=4). Os locais de colheita encontravam-se inseridos em zonas residenciais, agrícolas, industriais, de produção animal e/ou zonas florestais.

No laboratório as amostras foram filtradas por membranas estéreis de nitrocelulose, com porosidade 0,45µm, sob vácuo. Os filtros foram incubados em caldo

de BHI, a 37°C, durante 24h, em aerobiose, promovendo o crescimento bacteriano não-selectivo. De seguida, 100µl de cada cultura líquida foram semeados em placas de meio selectivo Slanetz-Bartley suplementado com vancomicina-6mg/L, gentamicina-125mg/L ou ampicilina-16mg/L. As placas foram incubadas a 37°C, durante 24h em aerobiose. As colónias resultantes foram isoladas em meios não-selectivos e congeladas a -70°C em TSB com 20% de glicerol.

2. Identificação

Recorreu-se a testes presuntivos, como a coloração de Gram para verificar se de facto as bactérias se tratavam de cocos de Gram positivo. Na coloração Gram as bactérias que possuem uma parede celular rica em peptidoglicano coram de violeta, sendo denominadas de Gram positivo. As bactérias que apresentam um comportamento de Gram negativo coram de vermelho ou rosa, devido a uma menor quantidade de peptidoglicano e à existência de uma membrana exterior lipídica que é solubilizada durante a descoloração com álcool-acetona, permitindo a saída do corante cristal de violeta. A safranina confere a cor final a este tipo de bactérias.

Fez-se também a prova da catalase, na qual se pesquisa a presença da enzima catalase que degrada o peróxido de hidrogénio a água e oxigénio molecular. Este método consiste em adicionar uma porção de bactéria retirada de uma cultura pura a algumas gotas de uma solução de peróxido de hidrogénio numa lâmina. A presença da enzima catalase é demonstrada pela libertação de oxigénio (eferverscência). Neste trabalho, seleccionaram-se as bactérias catalase negativo (Sousa *et al.*, 2005).

Muitas bactérias hidrolizam a esculina, no entanto apenas algumas, como o enterococos, o fazem na presença de elevada concentração de bílis. A esculina é um glicosídeo composto por glucose e esculeteína. Durante a hidrólise da esculina é libertado para o meio glucose (utilizada depois metabolicamente pelas bactérias) e esculeteína. A esculeteína reage com citrato de ferro, um indicador adicionado, que provoca o escurecimento do meio (Sousa *et al.*, 2005).

Por fim inoculou-se uma porção de bactéria num meio contendo NaCl na concentração de 6,5%, no qual maioritariamente crescem os enterococos, devido à sua capacidade de subsistir em meios hipertónicos. O crescimento é passivo de ser observado pela turvação do meio (Ferreira e Sousa, 2000 e Sousa *et al.*, 2005).

3. Teste de Susceptibilidade aos Antibióticos

Seguidamente foram realizados antibiogramas, pelo método de Kirby Bauer da difusão em placa, no qual discos com quantidades exactas de diferentes antibióticos são colocados no meio inoculado com a bactéria, o antibiótico difunde-se pelo meio originando um halo em caso de susceptibilidade, onde não há crescimento bacteriano, passível de ser medido (Sousa *et al.*, 2005). Os antibióticos utilizados foram vancomicina (30 µg), teicoplanina (30 µg), ampicilina (10 µg), eritromicina (15 µg), tetraciclina (30 µg), minociclina (30 µg), quinupristina–dalfopristina (15 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), linezolid (30 µg), gentamicina (120 µg) e estreptomina (300 µg). A técnica foi realizada de acordo com as orientações presentes no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Todos os isolados com susceptibilidade intermédia foram considerados resistentes. Neste estudo foram incluídas as estirpes *Enterococcus faecalis* ATCC 2912 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 como controlo.

4. Caracterização de resistência a antibióticos e factores de virulência

Por último, recorreu-se a métodos moleculares para identificar as espécies bacterianas e genes que conferem resistência a determinados antibióticos ou expressam factores de virulência. A técnica utilizada foi a amplificação de ácidos nucleicos (PCR). Existem vários métodos não moleculares que permitem identificar as diferentes espécies de enterococos: como MicroScan, API 20STREP, ID 32STREP, entre outros (Arias *et al.*, 2006, Sader *et al.*, 1995). Porém como se trata de espécies muito próximas genotipicamente, a sua identificação pode não ser precisa. Os métodos de biologia molecular são fiáveis e sensíveis. Entre estes encontra-se a PCR (Polymerase Chain Reaction), que utiliza *primers* específicos para a identificação de espécies (Perez-Hernandez *et al.*, 2002, Arias *et al.*, 2006).

O princípio subjacente a esta técnica é muito simples. Um pequeno segmento de DNA é delimitado por dois *primers* específicos e a sua amplificação ocorre por uma DNA polimerase termorresistente. A reacção ocorre em vários ciclos de temperatura sucessivos, nos quais inicialmente há a desnaturação da cadeia de DNA, seguida da

hibridação dos *primers* com as cadeias complementares (emparelhamento) e por fim a síntese do fragmento de DNA que se pretende amplificar. Estes passos repetem-se em cada ciclo, sendo que uma PCR geralmente possui entre 30 a 40 ciclos. Teoricamente, o número de fragmentos de DNA amplificado aumenta exponencialmente ao longo da PCR (Ferreira e Sousa, 2000). É uma boa técnica de identificação, visto que é eficaz com uma pequena quantidade de amostra, permite a amplificação de pequenos genes de DNA ou RNA milhões de vezes, sem a necessidade de cultivar previamente o microrganismo durante um longo período de tempo e é altamente específica e rápida (Strohl *et al.*, 2001 e Theron e Cloete, 2002).

A técnica de PCR utilizada foi a multiplex. Esta técnica é uma variante da PCR básica na qual duas ou mais sequências são simultaneamente amplificadas na mesma reacção. Este método tem sido aplicado com sucesso em muitas áreas do estudo de DNA, como análises de deleções, mutações e polimorfismos, ensaios quantitativos e PCR de transcrição reversa (Henegariu *et al.*, 1997). Os protocolos de PCR utilizados neste trabalho, bem como as sequências dos *primers* e ciclos de amplificação foram os publicados por Novais *et al.* (2005), Arias *et al.* (2006), Aarestrup *et al.* (2000) e Vankerckhoven *et al.* (2004).

Os genes pesquisados para a resistência a glicopéptidos foram *vanA*, *vanB*, *vanC1* e *vanC2*. Para os aminoglicosídeos foram analisados os genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id* e *aph(3')-III*; para macrólidos os genes *ermA*, *ermB*, *ermC*; e para tetraciclinas os genes *tet(M)*, *tet(L)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(K)*. Foi também analisada a presença dos genes de virulência *asal*, *gel*, *cyl*, *hyl_{Efm}* e *esp*.

É importante referir ainda que foram incluídos controlos positivos e negativos em todas as reacções de PCR.

5. Visualização dos resultados da amplificação

Os produtos de amplificação das reacções de PCR foram analisados após uma electroforese horizontal com gel de agarose a 2% em tampão TAE, contendo 0.01% de marcador fluorescente (Fluorescent-Sybr Safe DNA gel stain) como revelador de DNA. Foram aplicados 10µl do produto de amplificação, assim como um marcador de peso

molecular (Hiperladder IV), nas condições referidas pelo fabricante. A electroforese foi efectuada a 100 volts durante 30 minutos e os resultados foram posteriormente observados num trasnsiluminador e adquiridos digitalmente com o programa Quantati one version 4.6.1 Buidl 055.

VIII. Resultados

1. Isolamento de Bactérias

A partir da recolha das 45 amostras de água (nascentes (n=18), fontes públicas (n=12), poços privados (n=11) e furos (n=4)) destinadas ao consumo humano e animal, isolaram-se 76 espécies de *Enterococcus*. Na figura 4 está representada a distribuição das amostras utilizadas no estudo em função da sua origem de recolha e na figura 5 estão representadas as espécies que foram isoladas.

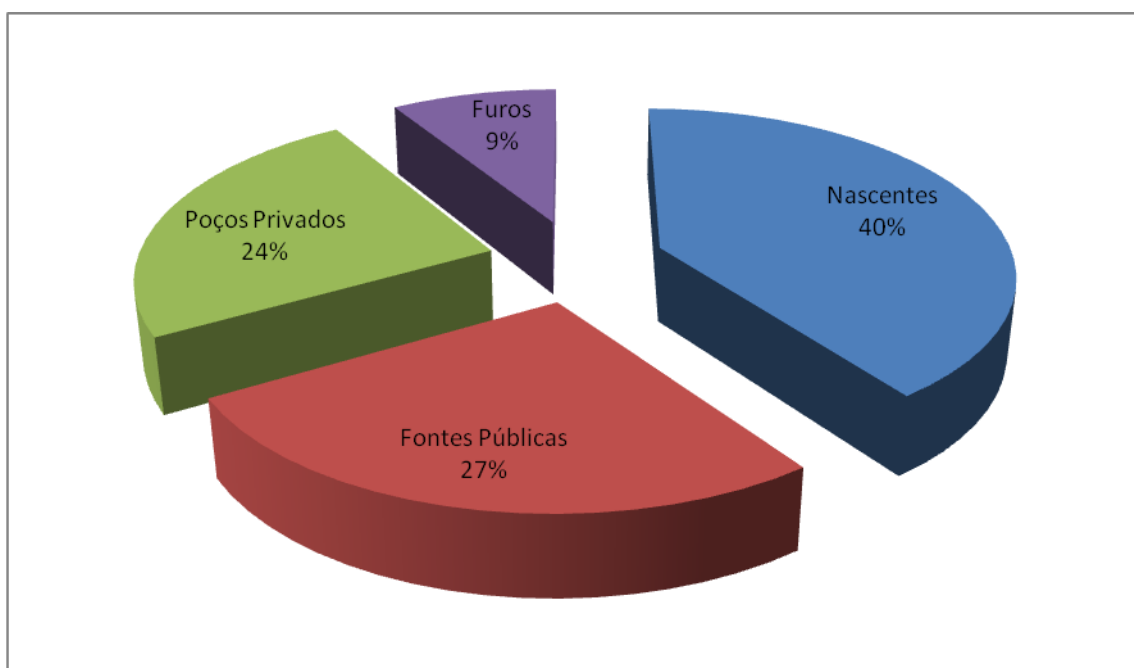


Figura 4: Distribuição das amostras recolhidas em percentagem

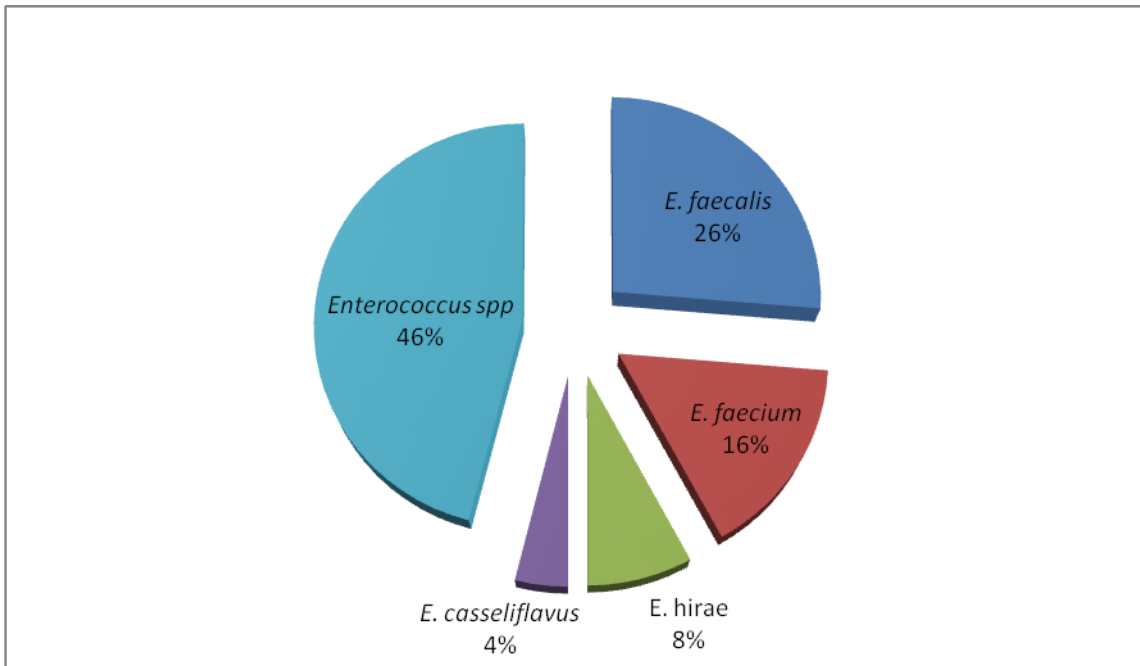


Figura 5: Distribuição dos isolados por espécie em percentagem

2. Espécies Bacterianas e Susceptibilidade

Nas quarenta e cinco amostras analisadas foram isoladas setenta e seis bactérias pertencentes ao Género *Enterococcus*. As espécies e as taxas de resistência antibiótica estão descritas na Tabela 2 e representadas nas Figuras 6 a 10.

As espécies *E. faecium* e *E. faecalis* foram as que apresentaram mais isolados resistentes à ciprofloxacina e aminoglicosídeos, respectivamente.

Foi ainda detectada resistência igual ou superior a 3 antibióticos em 43 (57%) dos isolados. A resistência múltipla a tetraciclina, eritromicina e ciprofloxacina foi detectada em 16 (21%) dos isolados de 10 amostras de fontes, poços artesianos e minas. É ainda importante referir que todos os isolados foram susceptíveis à vancomicina, teicoplanina e linezolida.

Espécies	Nº isolados	Tipo de Amostras (nº)	Ambiente (nº de amostras)	Região	Ano	Resistência a Antibióticos (n%)												
						VAN	TEC	AMP	TEC	MIN	ERY	Q/D	CIP	CHL	GEN	STR	NIT	LIN
<i>E.faecalis</i>	20	Fonte (3); Nascente (5) poço (3); Furo (1)	Zona de agricultura e residencial (2; zona agrícola e de produção animal (2); agricultura, produção de animais domésticos e residencial (1); zona residencial (3); florestal (1); área industrial (1); sem influência humana e animal (2)	Norte, Centro	2006 2008	0(0)	0(0)	0(0)	15(75)	15(75)	15(75)	15(75) ¹	9(45)	0(0)	6(30)	2(10)	0(0)	0(0)
<i>E.faecium</i>	12	Fonte (2); poço (3); Furo (1)	Aquacultura (1); área agrícola (2); zona agrícola e de produção animal (2); agricultura, produção de animais domésticos e residencial (1); Zona de agricultura e residencial (1)	Norte	2006 2008	0(0)	0(0)	0(0)	10(83)	10(83)	10(83)	2(17)	10(83)	2(17)	0(0)	0(0)	2(17)	0(0)
<i>E.hirae</i>	6	Nascente (1); Poço (1)	Zona agrícola (1) e sem influência humana e animal (1)	Norte, Centro	2006	0(0)	0(0)	0(0)	3(50)	3(50)	1(17)	1(17)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(17)	0(0)
<i>E. casseliflavus</i>	3	Poço (2)	Área agrícola e de animais domésticos ou produção intensiva (1); Agricultura, produção de animais domésticos e ETAR (1)	Norte	2008	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(33)	1(33)	1(33)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>Enterococcus spp</i>	35	Poço (3); Furo (1); Mina (3); Nascente (3)	Área agrícola e de animais domésticos ou produção intensiva (1); Agricultura, produção de animais e ETAR (1); zona agrícola e de produção animal (1); zona agrícola(2); zona florestal (1); residencial (1); zona sem influência humana e animal (3)	Norte, Centro	2006 2008	0(0)	0(0)	0(0)	10(29)	7(20)	16(46)	15(43)	27(77)	0(0)	3(9)	0(0)	12(34)	0(0)
Total	76					0(0)	0(0)	0(0)	38(50)	35(46)	43(57)	38(50)	47(62)	2(3)	9(12)	2(3)	15(20)	0(0)

Tabela 2: Perfil de resistência a antibióticos em enterococci de várias espécies isoladas de várias fontes de águas de consumo em Portugal. Abreviaturas: VAN=vancomicina, TEC=teicoplanina, AMP=ampicilina, TET=tetraciclina, MIN=minociclina, ERY=eritromicina, Q/D=quinupristina/dalfopristina, CIP=ciprofloxacina, CHL=cloranfenicol, GENT=gentamicina, STR=estreptomomicina, NIT=nitrofurantoina, LIN=linezolida.

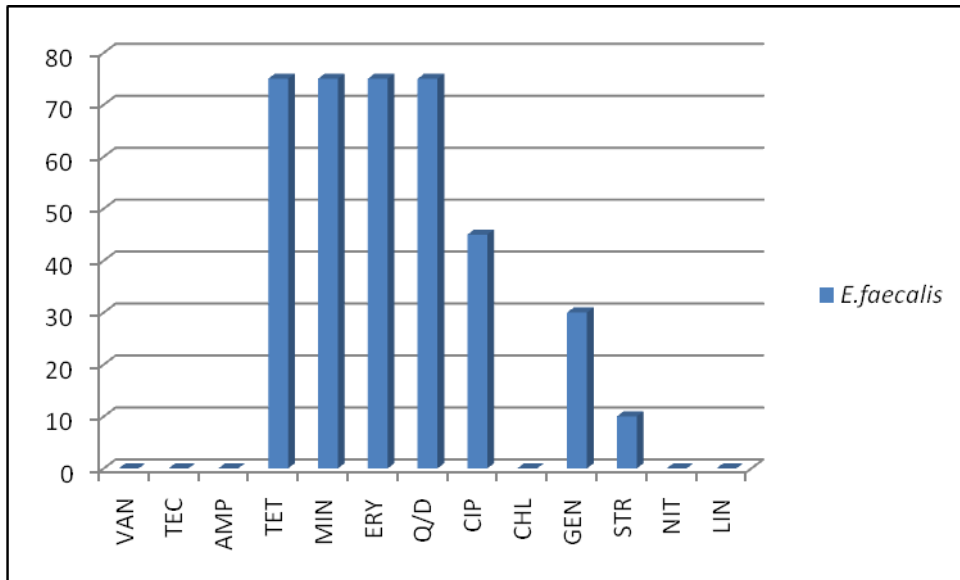


Figura 6: Distribuição do fenótipo de resistência a antibióticos em *E. faecalis* em percentagem

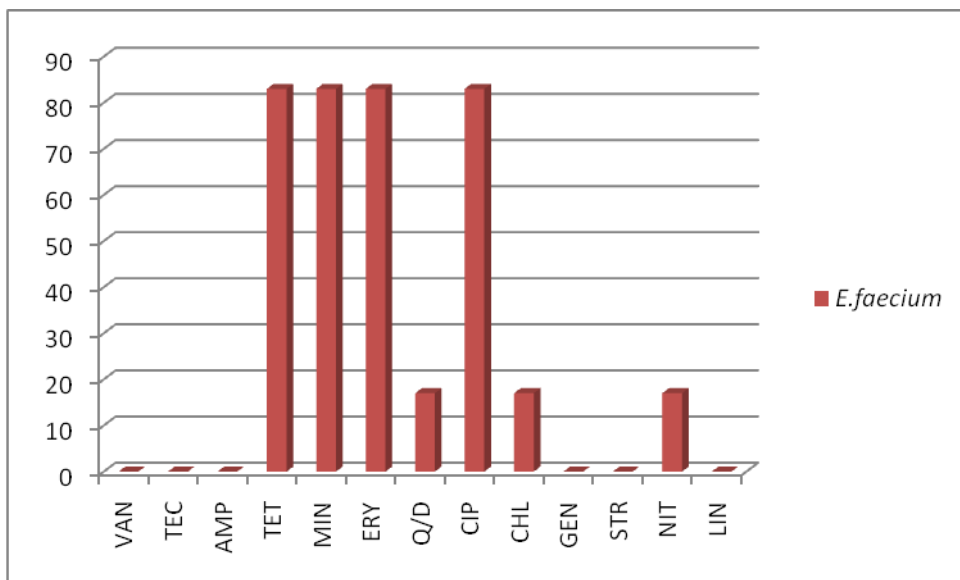


Figura 7: Distribuição do fenótipo de resistência a antibióticos em *E. faecium* em percentagem

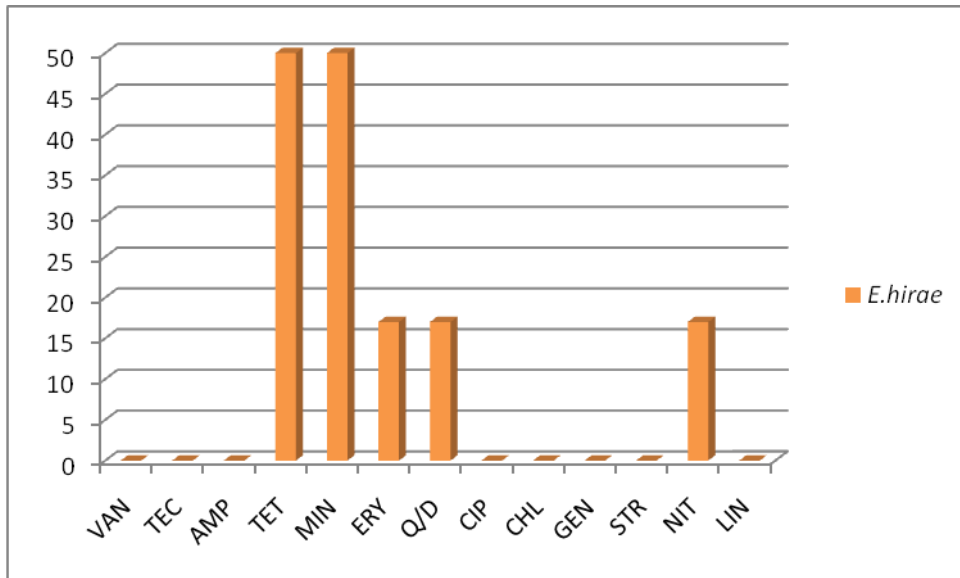


Figura 8: Distribuição do fenótipo de resistência a antibióticos em *E. hirae* em percentagem

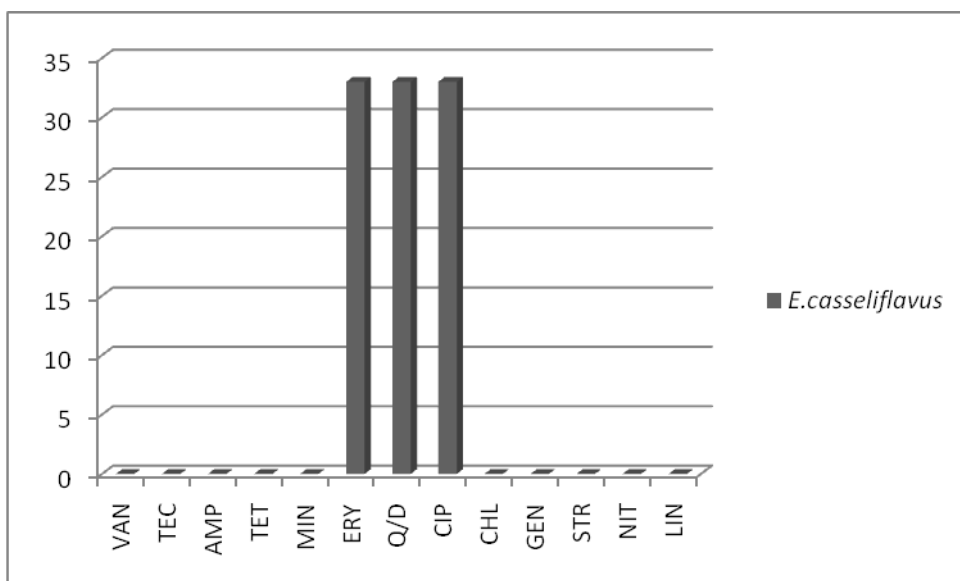


Figura 9: Distribuição do fenótipo de resistência a antibióticos em *E. casseliflavus* em percentagem

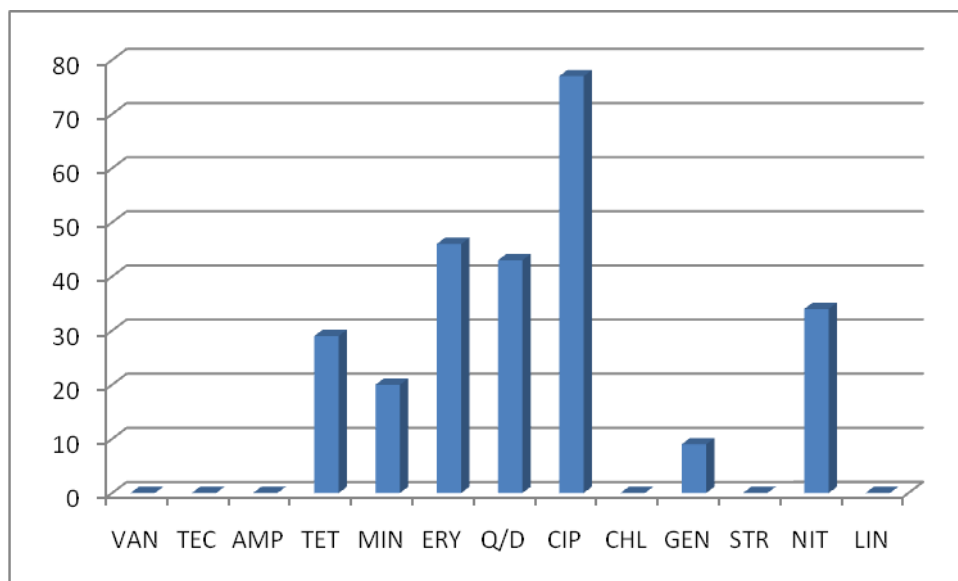


Figura 10 - Distribuição do fenótipo de resistência a antibióticos em *Enterococcus* spp em percentagem.

3. Caracterização de genes de resistência

Na análise dos isolados de *Enterococcus* procedeu-se à pesquisa de genes que conferem as resistências através da técnica de PCR, obtendo-se os resultados a seguir apresentados (Tabela 3 e Figuras 11 a 15).

Relativamente à resistência às tetraciclinas, detectaram-se os genes *tet(M)* em 35 isolados (46%), *tet(L)* em 11 isolados (14%) e *tet(S)* em 4 (5%) dos isolados. A resistência à eritromicina e à gentamicina está codificada nos genes *erm(B)* em 17 (22%) dos isolados e *aac(6')-Ie-aph(2'')* em 9 (12%) dos isolados, respectivamente. O gene *vanC2* foi apenas detectado num isolado de *E. casseliflavus*.

Todos os genes acima descritos foram pesquisados em isolados com fenótipo de resistência detectado previamente por antibiogramas. Porém, os genes *tet(M)* e *tet(L)* foram detectados num isolado susceptível às tetraciclinas e o gene *ermB* em 6 isolados com resistência intermédia e 7 isolados susceptíveis à eritromicina. É importante ainda referir que não foram amplificados genes de resistência em 3 isolados resistentes à tetraciclina e 7 isolados resistentes à eritromicina. Foi detectada a presença de mais de um gene de resistência nos seguintes casos:

- i. *E. faecium* - 2 isolados com *tet(M)+tet(L)*, 1 isolado com *tet(M)+tet(S)*, 1 isolado com *tet(L)+ermB* e 1 isolado com *tet(M)+tet(L)+ermB*;
- ii. *E. faecalis* - 1 isolado com *tet(M)+tet(L)*, 1 isolado com *tet(M)+tet(L)+ermB*, 1 isolado com *tet(M)+tet(L)+erm(B)+aac(6')-Ie-aph(2'')*, 2 isolados com *tet(M)+tet(L)+aac(6')-Ie-aph(2'')* e 2 isolados com *tet(M)+ermB+aac(6')-Ie-aph(2'')*;
- iii. *Enterococcus* spp - 1 isolado com *tet(M)+tet(L)*, 1 isolado com *tet(S)+ermB*, 2 isolados com *tet(M)+ermB* e 2 isolados com *tet(M)+tet(L)+aac(6')-Ie-aph(2'')*;

Genes ^a	Fenótipo da Resistência antimicrobiana	Espécies (n ^{os})					
			<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.hira</i>	<i>E.casseliflavus</i>	<i>Enterococcus</i> spp
<i>tet(M)</i>	Tetraciclina	R	14	9	3	- ^b	8
		S	-	-	-	-	1
<i>tet(L)</i>	Tetraciclina	R	4	3	-	-	3
		S	-	-	-	-	1
<i>tet(S)</i>	Tetraciclina	R	1	2	-	-	1
<i>erm(B)</i>	Eritromicina	R	2	1	-	-	1
		I	2	1	1	1	2
		S	-	-	2	-	4
<i>aac(6')-Ie-aph(2')^c</i>	Gentamicina	R	6	-	-	-	3
<i>vanC2</i>	Vancomicina	S	-	-	-	3	-

Tabela 3: Distribuição dos genes de resistência a antibióticos de várias espécies de enterococos isolados de amostras de águas de consumo; ^a Os genes *vanA*, *vanB*, *vanC1* (resistência à vancomicina), *aph(2'')*-*Id* (resistência a aminoglicosídeos), *ermA*, *ermC* (resistência a macrólidos), *tet(O)* e *tet(K)* não foram detectados; ^b Não detectados; ^c A presença do gene *aac(6')-Ie-aph(2'')* foi só pesquisada em isolados resistentes a altas concentrações de gentamicina.

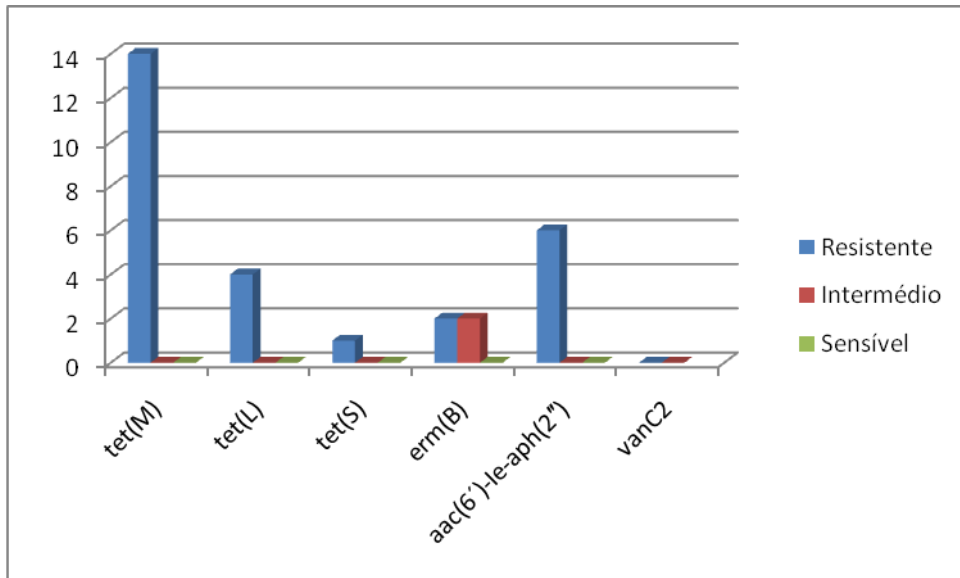


Figura 11-Genes de Resistência presentes em *E. faecalis*

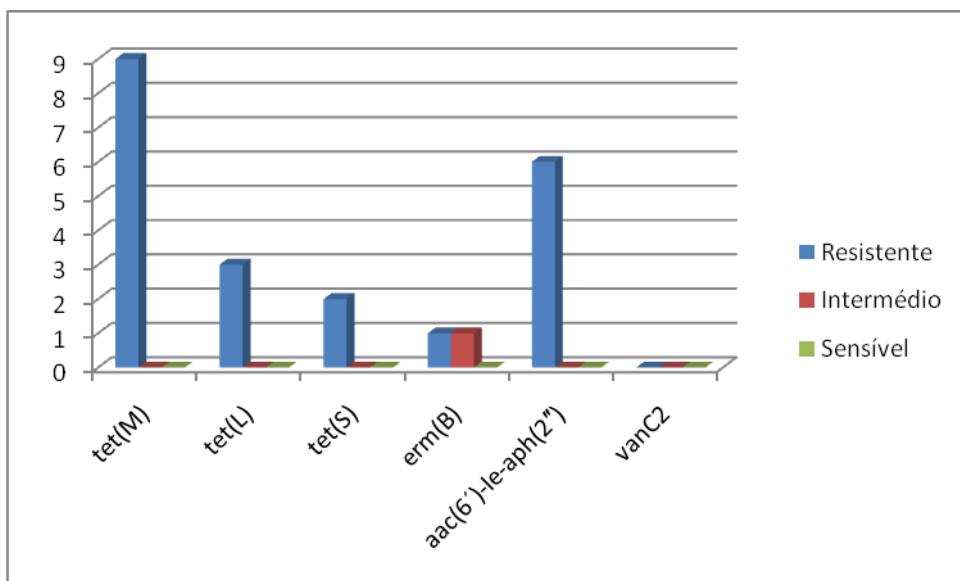


Figura 12-Genes de Resistência encontrados em *E. faecium*

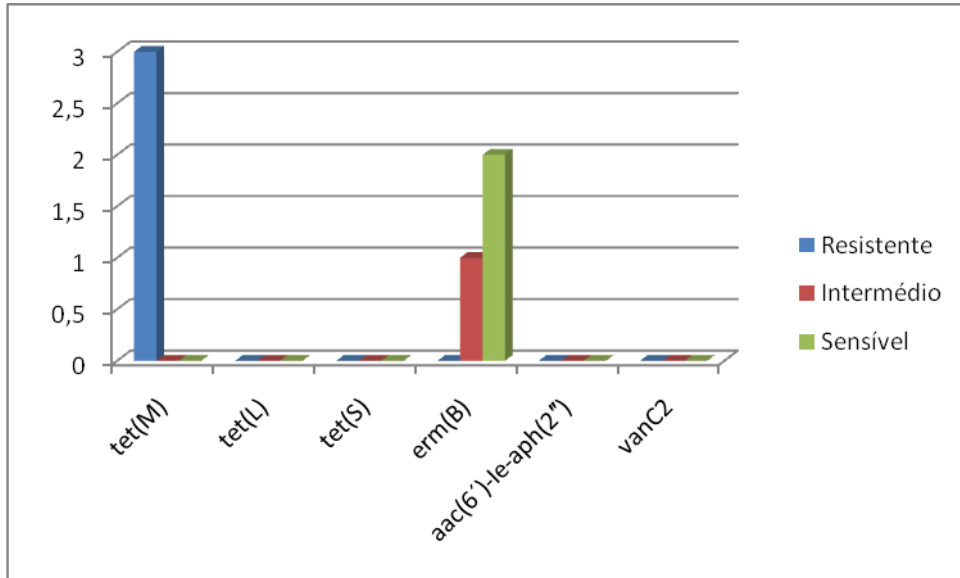


Figura 13 - Genes de resistência presentes em *E. hirae*

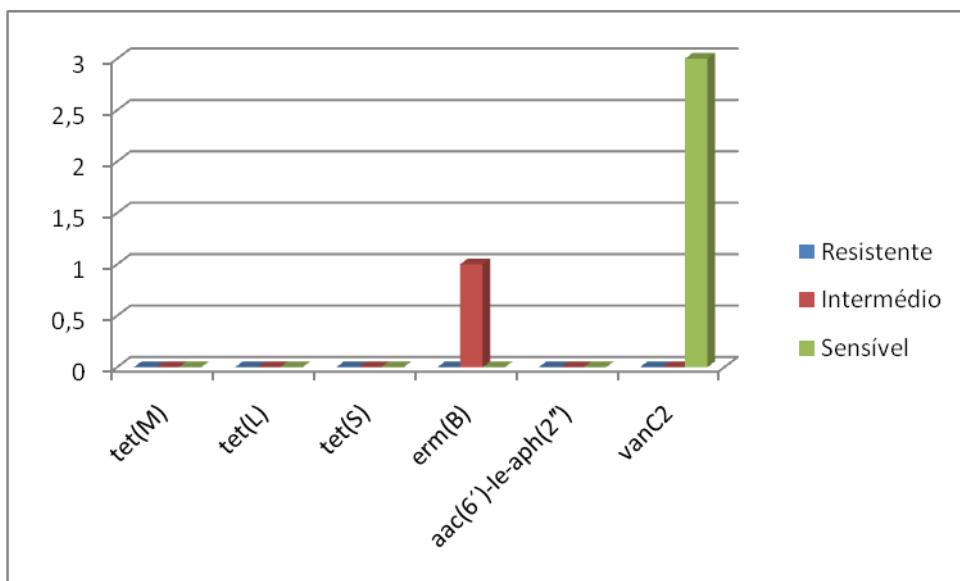


Figura 14 - Genes de resistência presentes em *E. casseliflavus*

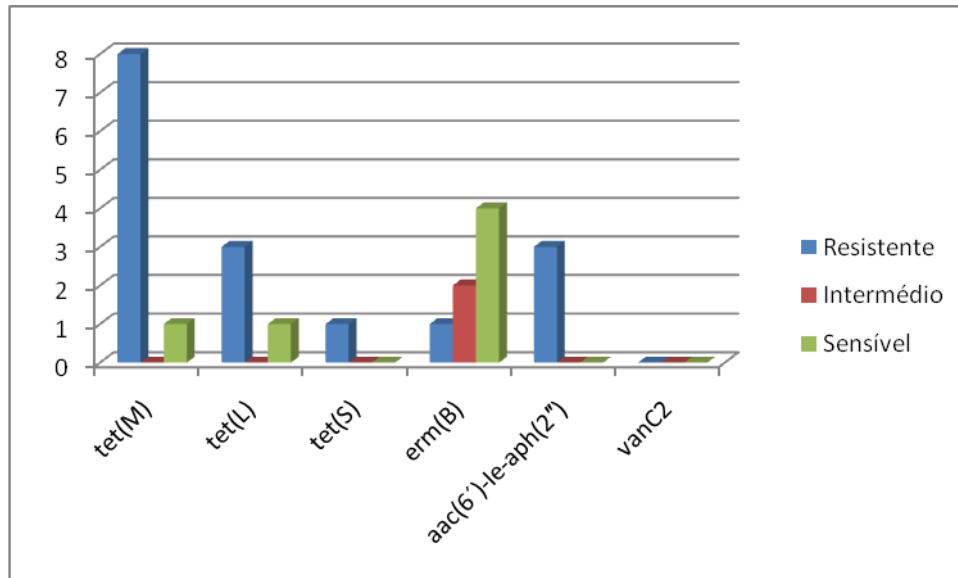


Figura 15 - Genes de Resistência presentes em *Enterococcus* spp.

4. Caracterização dos factores de virulência

Na pesquisa de factores de virulência o gene *gel* foi detectado em 12 *E. faecalis*, em 2 *E. faecium*, 1 *E. casseliflavus* e 5 outros *Enterococcus* spp, o seu total representa 28% dos isolados (Figura 16).

O gene *asa1* foi detectado em 7 *E. faecalis* e 5 outras espécies de *Enterococcus*, constituindo um total de 16% dos isolados. Foram detectados os dois genes de virulência em 11 isolados provenientes de 5 amostras de fontes, poços e nascentes naturais. À excepção de dois isolados, todos os isolados resistentes à gentamicina possuem ambos os genes *asa1* e *gel* e foram recolhidos de duas nascentes naturais, representando a maioria dos isolados que transportam o gene *asa1*.

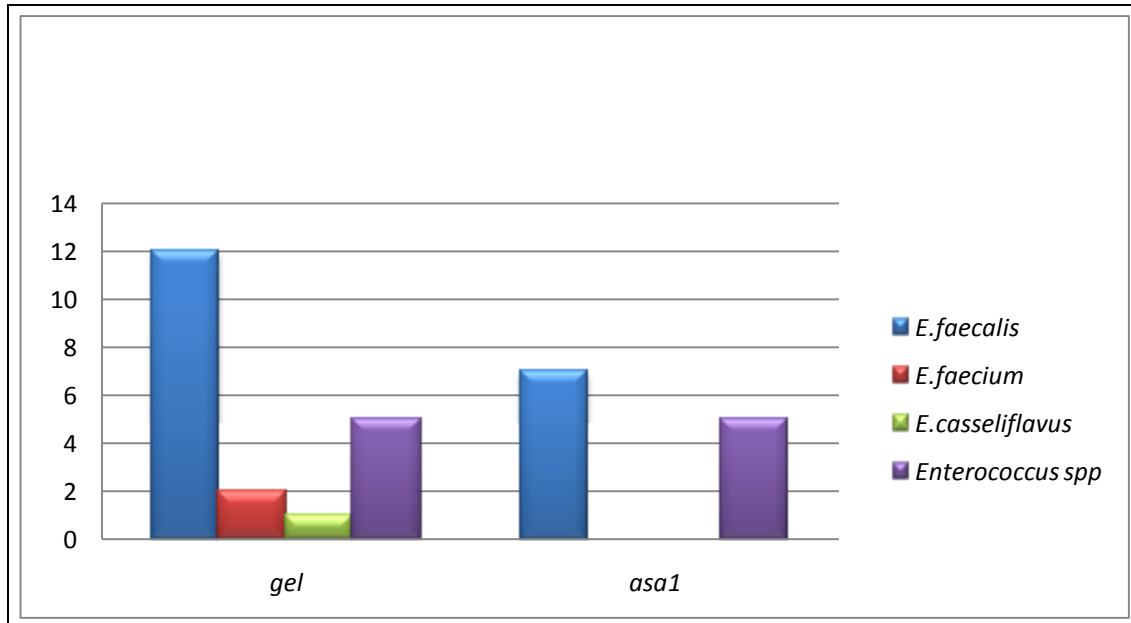


Figura 16-Distribuição dos genes de virulência em *Enterococcus* em percentagem.

IX. Discussão

Este Projecto de Graduação tem como principal objectivo o estudo do perfil de resistência a antibióticos em enterococos presentes em águas para consumo não tratadas. De acordo com a bibliografia publicada na área, este é um estudo inovador a nível europeu e o primeiro em Portugal. Os *Enterococcus* foram detectados num número elevado de amostras, sugerindo que muitos portugueses consomem água que não se encontra dentro dos padrões de qualidade nacionais. Esta ameaça à saúde pública torna-se ainda mais preocupante na medida em que estão presentes isolados resistentes a vários grupos de antibióticos.

É alarmante o facto de mais de 45% dos enterococos isolados serem resistentes à ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina, que são antibióticos utilizados em grande escala em humanos e animais como agentes terapêuticos. Também foi possível verificar a presença simultânea de genes que codificavam resistência às tetraciclina e macrólidos em várias amostras. A grande dispersão destes genes pode estar relacionada com a sua co-localização em plasmídeos conjugativos como, por exemplo, pRE25 e pKL0018 ou transposões como Tn5382, Tn6002 e Tn1545, previamente encontrados em várias

bactérias de Gram positivo de variados nichos ecológicos (Schwarz, 2001 *et al.* e Cochetti *et al.*, 2008).

Os fenótipos e genótipos com resistência às tetraciclinas e eritromicina não foram concordantes nalguns isolados. Alguns isolados possuíam susceptibilidade aos antibióticos ou resistência intermédia e continham genes *tet* ou *ermB*, o que sugere a ocorrência de fenómenos de combinação que afectam a expressão da resistência fenotípica. Adicionalmente, a ausência de genes que codificam a resistência a tetraciclinas e eritromicina em isolados resistentes indicam que pode haver uma predominância genética de outros factores determinantes (Portillo *et al.*, 2000, Poeta *et al.*, 2006).

A ocorrência de elevados índices de resistência à gentamicina e estreptomicina são de especial preocupação, visto que são antibióticos utilizados no tratamento de infecções por enterococos. Teme-se que dentro um período de tempo relativamente curto não haja arsenal terapêutico eficaz para o combate destas infecções.

Os locais de recolha de amostra localizam-se nas proximidades de terrenos agrícolas, criação de animais domésticos, instalações onde ocorre produção animal intensiva e/ou zonas residenciais, sugerindo que animais e humanos poderão estar na origem da contaminação microbiológica das águas não tratadas, destinadas ao consumo humano. Alguns autores sugerem que as infraestruturas destinadas à produção animal podem ser os reservatórios para microrganismos que possuem resistências a antibióticos ou genes de resistência. Sapkota *et al.* (2007) detectaram enterococos resistentes à tetraciclina e eritromicina, assim como Koike *et al.* (2007) detectaram vários genes de resistência às tetraciclinas, ambos em amostras de águas subterrâneas adjacentes a locais de produção de suínos. Quando os enterococos multirresistentes estão presentes em águas não tratadas, destinadas ao consumo, estamos diante de um problema que suscita particular preocupação, quando comparado com os outros ambientes aquáticos que por vezes contactam com os humanos em actividades de recreio ocasionais. Esta água contaminada é consumida diariamente e utilizada nas mais diversas tarefas domésticas, pelo que há uma grande probabilidade de haver colonização do intestino do homem e animais, havendo, por conseguinte a troca de genes entre os enterococos e as bactérias da flora normal do intestino. Um exemplo disso foi a detecção dos mesmos fenótipos e genótipos de resistência a antibióticos em enterococos recolhidos em amostras de água,

em fezes de humanos saudáveis e em carcaças de animais de aviário noutros estudos prévios (Novais *et al.*, 2005 e Novais *et al.*, 2006).

Devido ao carácter inovador do tema e apesar da presença de enterococos multirresistentes em águas não tratadas destinadas ao consumo humano ser um problema de saúde pública, há poucos estudos publicados nesta área, pelo que é difícil ter uma perspectiva global da realidade actual.

É importante ainda referir que neste estudo não foram considerados enterococos viáveis mas não cultiváveis, descritos previamente noutros estudos em ambientes aquáticos uma vez que a metodologia utilizada selecciona previamente as estirpes cultiváveis. Desta forma, os resultados podem subestimar a presença de enterococos portadores de genes de resistência a antibióticos (Lleo *et al.*, 2005).

X. Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram o perfil de resistência a agentes antimicrobianos e factores de virulência dos enterococos. Este estudo contribui com informação recente sobre a presença de enterococos resistentes a antibióticos em água não tratada, de um país desenvolvido. Neste trabalho experimental ficou demonstrado que algumas das nascentes e fontes portuguesas, de água natural não tratada, estão a ser contaminadas com bactérias resistentes a antibióticos, provavelmente provenientes de nichos ecológicos adjacentes.

Assim, as conclusões finais deste estudo são as seguintes:

- Os enterococos são indicadores de contaminação fecal e estavam presentes num grande número de amostras de água;
- Quase metade dos isolados (45%) apresentavam perfil de resistência às tetraciclinas, ciprofloxacina e eritromicina, antibióticos utilizados em grande escala tanto em humanos como animais;

- Foi detectada resistência a concentrações elevadas de gentamicina e estreptomicina, antibióticos utilizados no tratamento de agentes infecciosos;
- Foram detectados factores de virulência na grande maioria dos isolados (gene *gel* e gene *asa1*);

Uma vez que as águas das minas, fontes, poços e furos são muito utilizadas na Europa Ocidental, com destaque para Portugal, é de extrema importância que as populações tenham acesso a água potável para consumo, pelo que são justificáveis e de extrema utilidade mais estudos sobre este tema.

Bibliografia

- AARESTRUP, F. M., AGERSO, Y., GERNER-SMIDT, P., MADSEN, M. & JENSEN, L. B. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 37, 127-37.
- ARIAS, C. A., ROBREDO, B., SINGH, K. V., TORRES, C., PANESSO, D. & MURRAY, B. E. 2006. Rapid identification of *Enterococcus hirae* and *Enterococcus durans* by PCR and detection of a homologue of the *E. hirae* mur-2 Gene in *E. durans*. *J Clin Microbiol*, 44, 1567-70.
- BENNET, P. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria 347-357.
- BILLSTROM, H., LUND, B., SULLIVAN, A. & NORD, C. E. 2008. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents*, 32, 374-7.
- CAPLIN, J. L., HANLON, G. W. & TAYLOR, H. D. 2008. Presence of vancomycin and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* of epidemic clonal complex-17 in wastewaters from the south coast of England. *Environmental Microbiology*, 10, 885-892.
- CETINKAYA, Y., FALK, P. & MAYHALL, C. G. 2000. Vancomycin-Resistant *Enterococci*. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 13, 686-707.
- CHOPRA, I. & ROBERTS, M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 65, 232-260.
- COCHETTI, I., TILI, E., MINGOIA, M., VARALDO, P. E. & MONTANARI, M. P. 2008. erm(B)-carrying elements in tetracycline-resistant pneumococci and correspondence between Tn1545 and Tn6003. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 1285-90.
- DEPARDIEU, F., PODGLAJEN, I., LECLERCQ, R., COLLATZ, E. & COURVALIN, P. 2007. Modes and Modulations of Antibiotic Resistance Gene Expression. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 20, 79-114.

- DUPONT, H., VAELD, C., MULLER-SERIEYSB, C., CHOSIDOWC, D., MANTZD, J., MARMUSEC, J.-P., ANDREMONTB, A., GOOSSENSD, H. & DESMONTSA, J.-M. 2008. Prospective evaluation of virulence factors of enterococci isolated from patients with peritonitis: impact on outcome. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 247–253.
- ENNAHAR, S. D. & CAI, Y. 2005. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Enterococcus solitarius* Collins et al. 1989 to the genus *Tetragenococcus* as *Tetragenococcus solitarius* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 589–592.
- FERREIRA, W. & SOUSA, J. 2000. *Microbiologia*, Lisboa, Lidel.
- HARBOTTLE, H., THAKUR, S., ZHAO, S. & WHITE, D. G. 2006. GENETICS OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE. *Animal Biotechnology*, 111–124.
- HENEGARIU, O., HEEREMA, N. A., DLOUHY, S. R., VANCE, G. H. & VOGT, P. H. 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*, 504-511.
- HUYCKE, M. M., SAHM, D. F. & GILMORE, M. S. 1998. Multiple-Drug Resistant Enterococci: The Nature of the Problem and an Agenda for the Future. *Emerging Infectious Diseases*, 4, 239-249.
- JUNG, H. M., JEYA, M., KIM, S. Y., MOON, H. J., SINGH, R. K., ZHANG, Y. W. & LEE, J. K. 2009. Biosynthesis, biotechnological production, and application of teicoplanin: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 417-428.
- KOIKE, S., KRAPAC, I. G., OLIVER, H. D., YANNARELL, A. C., CHEE-SANFORD, J. C., AMINOV, R. I. & MACKIE, R. I. 2007. Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period. *Appl Environ Microbiol*, 73, 4813-23.
- LEVINE, D. P. 2006. History of Vancomycin. *Clinical Infectious Diseases*, 42, 5-12.
- LLEO, M. M., BONATO, B., TAFI, M. C., SIGNORETTO, C., PRUZZO, C. & CANEPARI, P. 2005. Molecular vs culture methods for the detection of

- bacterial faecal indicators in groundwater for human use. *Lett Appl Microbiol*, 40, 289-94.
- LUCZKIEWICZ, A., JANKOWSKA, K., KURLEND, J. & OLAN' CZUK-NEYMAN, K. 2010. Identification and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from surface water. *Water Science & Technology—WST*, 62, 466-473.
- MACEDO, A. S., FREITAS, A. R., ABREU, C., MACHADO, E., PEIXE, L., SOUSA, J. C. & NOVAIS, C. 2010. Characterization of antibiotic resistant enterococci isolated from untreated waters for human consumption in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*.
- MURRAY, B. E. 1990. The Life and Times of the *Enterococcus*. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 3, 46-65.
- MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., KOBAYASHI, G. S. & PFALLER, M. A. (eds.) 2001. *Medical Microbiology*: Mosby.
- NOVAIS, C., COQUE, T. M., FERREIRA, H., SOUSA, J. C. & PEIXE, L. 2005. Environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci from hospital sewage in Portugal (vol 71, pg 3364, 2005). *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4162-4162.
- NOVAIS, C., COQUE, T. M., SOUSA, J. C. & PEIXE, L. V. 2006. Antimicrobial resistance among faecal enterococci from healthy individuals in Portugal. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 1131-1134.
- PEREZ-HERNANDEZ, X., MENDEZ-ALVAREZ, S. & CLAVERIE-MARTIN, F. 2002. A PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 42, 273-7.
- POETA, P., COSTA, D., RODRIGUES, J. & TORRES, C. 2006. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27, 131-137.
- POETA, P., IGREJAS, G., COSTA, D., SARGO, R., RODRIGUES, J. & TORRES, C. 2008. Virulence factors and bacteriocins in faecal enterococci of wild boars. *Journal of Basic Microbiology*, 385-392.

- PORTILLO, A., RUIZ-LARREA, F., ZARAZAGA, M., ALONSO, A., MARTINEZ, J. L. & TORRES, C. 2000. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 967-971.
- READ. 2010. Disponível em: http://silverfalls.k12.or.us/staff/Read_Shari/mysite/chapter_24_AB.htm [Consultado a 20-10-2010].
- ROLINSON, G. N. 1998. Forty years of beta-lactam research. *J Antimicrob Chemother*, 41, 589-603.
- SADER, H. S., BIEDENBACH, D. & JONES, R. N. 1995. Evaluation of Vitek and API 20S for species identification of enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 22, 315-9.
- SAPKOTA, A. R., CURRIERO, F. C., GIBSON, K. E. & SCHWAB, K. J. 2007. Antibiotic-resistant enterococci and fecal indicators in surface water and groundwater impacted by a concentrated swine feeding operation. *Environmental Health Perspectives*, 115, 1040-1045.
- SCHWARZ, F. V., PERRETEN, V. & TEUBER, M. 2001. Sequence of the 50-kb conjugative multiresistance plasmid pRE25 from *Enterococcus faecalis* RE25. *Plasmid*, 46, 170-87.
- SOOD, S., MALHOTRA, M., DAS, B. K. & KAPIL, A. 2008. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med Res*, 111-121.
- SOUSA, J. 2006. *Manual de Antibióticos Antibacterianos*, Porto, Ed Universidade Fernando Pessoa.
- SOUSA, J., CERQUEIRA, F. & ABREU, C. 2005. *Microbiologia. Protocolos Laboratoriais*, Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa.
- STROHL, W., ROUSE, H. & FISHER, B. 2001. *Microbiologia Ilustrada*, Artmed Editora S.A.
- THERON, J. & CLOETE, T. E. 2002. Emerging Waterborne Infections : Contributing Factors, Agents, and Detection Tools. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 1-26.
- VANKERCKHOVEN, V., VAN AUTGAERDEN, T., VAEL, C., LAMMENS, C., CHAPELLE, S., ROSSI, R., JABES, D. & GOOSSENS, H. 2004. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in

enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*, 42, 4473-9.