

Avaliação da disseminação horizontal de *pbp<sub>5</sub>* em isolados de *Enterococcus* spp resistentes a  $\beta$ -lactâmicos de origem humana, animal e ambiental

Vânia Catarina Cruz Sá

**Avaliação da disseminação horizontal de *pbp<sub>5</sub>* em isolados de *Enterococcus* sp resistentes a  $\beta$ -lactâmicos de origem humana, animal e ambiental**



**Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde**

**Porto 2009**

Avaliação da disseminação horizontal de *pbp<sub>5</sub>* em isolados de *Enterococcus* spp resistentes a  $\beta$ -lactâmicos de origem humana, animal e ambiental

Avaliação da disseminação horizontal de *pbp<sub>5</sub>* em isolados de *Enterococcus* spp resistentes a  $\beta$ -lactâmicos de origem humana, animal e ambiental

Vânia Catarina Cruz Sá

**Avaliação da disseminação horizontal de *pbp<sub>5</sub>* em isolados de *Enterococcus* sp resistentes a  $\beta$ -lactâmicos de origem humana, animal e ambiental**



**Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde**

**Porto 2009**

**Vânia Catarina Cruz Sá**

**Avaliação da disseminação horizontal de *pbp<sub>5</sub>* em isolados de *Enterococcus* sp resistentes a  $\beta$ -lactâmicos de origem humana, animal e ambiental**

**Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de licenciado em Ciências Farmacêuticas.**

---

Vânia Catarina Cruz Sá

Orientador

Prof. Doutora Carla Novais

## SUMÁRIO

Embora *Enterococcus* spp seja um comensal do Homem, tem vindo a adquirir particular importância clínica devido aos elevados níveis de resistência que apresenta a diversos grupos de antibióticos, nomeadamente aos  $\beta$ -lactâmicos. Os mecanismos de resistência a estes antibióticos que podem estar envolvidos são a produção de  $\beta$ -lactamases e sobretudo a presença de *pbp<sub>5</sub>* com algumas mutações que conferem baixa afinidade para os  $\beta$ -lactâmicos. Em estudos anteriores, verificou-se que em Portugal encontramos *Enterococcus* spp resistentes à ampicilina em vários nichos ecológicos, nomeadamente nos hospitais, onde esta resistência tem mais expressão. Uma vez que se conhece muito pouco sobre a disseminação horizontal de *pbp<sub>5</sub>*, constituíram objectivos principais do presente trabalho: (i) a avaliação da sua transferência (por conjugação) entre *Enterococcus* spp oriundos de vários nichos ecológicos (humano, animal e ambiental) e estirpes receptoras de laboratório e (ii) a detecção molecular (PCR) de possíveis elementos genéticos móveis responsáveis pela sua dispersão. Do total de 86 bactérias incluídas no estudo não produtoras de  $\beta$ -lactamases, apenas 2 oriundas de suiniculturas foram capazes de produzir transconjugantes que possuíam *pbp<sub>5</sub>*. Para além da ampicilina, nenhuma resistência a outra família de antibióticos foi co-transferida. Transposões conjugativas, frequentemente encontrados em bactérias de Gram positivo também não foram observados. Estes dados sugerem que *pbp<sub>5</sub>* se pode ter incorporado em elementos genéticos que não estão tradicionalmente associados à resistência a antibióticos. Relevante, foi ainda a detecção da integrase de *CW459TetM* (transposição associado a *Clostridium* sp) em *E. faecium* GE1, desconhecida, até ao momento, nesta estirpe receptora. O conhecimento das características das estirpes receptoras é fundamental para que estas possam ser correctamente escolhidas no laboratório para ensaios de conjugação e caracterização molecular de elementos genéticos móveis.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, que sempre me proporcionaram uma vida de estudante com acesso a tudo o que precisei. Sem vocês nunca teria conseguido.

Ao meu irmão, pelo apoio, carinho e paciência que sempre teve e continua a ter comigo. Adoro-te!

À Raquel, pela amizade e força que sempre me transmitiu, mas acima de tudo por estar comigo em todos os momentos. Contigo partilhei os melhores momentos da minha vida académica, momentos que jamais esquecerei!

À Prof. Dra Carla, pela disponibilidade, profissionalismo e paciência que teve ao longo do trabalho laboratorial e escrito que a minha monografia exigiu.

A todos que, de alguma forma, estiveram presentes no decorrer da minha vida académica e contribuíram para a minha formação como pessoa e profissional.

## ÍNDICE

Lista de Figuras .....	viii
Lista de Tabelas .....	viii
I. Introdução .....	9
1. Características gerais de <i>Enterococcus</i> spp .....	9
2. Mecanismos de acção dos $\beta$ -lactâmicos .....	11
3. Mecanismo de resistência aos $\beta$ -lactâmicos .....	15
4. Epidemiologia da resistência aos $\beta$ -lactâmicos em <i>Enterococcus</i> spp .....	16
II. Objectivos .....	18
III. Material e Métodos .....	19
1. Bactérias incluídas no estudo .....	19
2. Pesquisa da presença de $\beta$ -lactamases .....	20
3. Ensaio de conjugação.....	20
4. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos.....	21
5. Amplificação de ácidos nucleicos - método de <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	22
5.1 Gene <i>pbp<sub>5</sub></i> .....	22
5.2 Transposões conjugativos .....	23
5.3 Visualização dos produtos de amplificação.....	25
IV. Resultados .....	25
1. Pesquisa da presença de $\beta$ -lactamases .....	25
2. Ensaio de conjugação .....	25
3. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos .....	25
4. Amplificação de ácidos nucleicos - método de <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	27
4.1 Gene <i>pbp<sub>5</sub></i> .....	27
4.2 Transposões conjugativos .....	27
V. Discussão .....	29
VI. Bibliografia .....	32

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biossíntese do peptidoglicano .....	13
Figura 2 – Diferentes grupos pertencentes aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos .....	14
Figura 3 – Amplificação do gene <i>pbp<sub>5</sub></i> nas bactérias dadoras, na receptora e nos transconjugantes .....	28
Figura 4 – Amplificação da integrase de CW459 <i>tetM</i> nas bactérias dadoras, na receptora e nos transconjugantes .....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições de amplificação usadas na amplificação do <i>pbp<sub>5</sub></i> .....	23
Tabela 2 – Sequência nucleotídica dos primers usados para a identificação de Transposões conjugativos e outros a eles associados .....	24
Tabela 3 – Condições utilizadas nas reacções de PCR para a amplificação dos diferentes genes que codificam para os transposões conjugativos .....	25
Tabela 4 – Susceptibilidade das bactérias dadoras, transconjugantes e receptora aos diferentes grupos de antibióticos .....	27

## I. Introdução

### 1. Características gerais de *Enterococcus* spp

Microscopicamente *Enterococcus* spp são cocos de Gram-positivo que se dispõem aos pares, em cadeias curtas ou isolados. São bactérias aerotolerantes, catalase negativo, pirrolidonil arilamidase (PYR) e leucina aminopeptidase (LAP) positivo. Algumas espécies (*Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus galinarum*) são móveis e outras pigmentadas (*Enterococcus casseliflavus*) (Sousa *et al*, 1998, p.60).

*Enterococcus* spp têm grande capacidade de resistirem a condições físicas e químicas adversas, característica que lhes permite terem uma distribuição ubíqua na natureza. Podemos encontrar estas bactérias no solo, água, plantas e sobretudo no intestino dos mamíferos, fazendo deles bons indicadores de contaminação fecal (Sousa *et al*, 1998, p.60). De facto, este género tem capacidade de crescer numa vasta gama de temperaturas (10 e 45°C), de pH (2-10), em meios enriquecidos com sal (NaCl a 6,5%), na presença de 40% de sais biliares e detergentes (Sousa *et al*, 1998, p.60).

Nos últimos anos, o avanço das técnicas de biologia molecular permitiu a identificação de mais de 20 espécies. No entanto, aquelas que têm tido mais impacto na saúde humana são *E.faecium* e *E.faecalis*. Recentemente, têm sido descritas outras espécies a causar infecções ou surtos hospitalares como *E.raffinosis* na Polónia e *E.gallinarum* na Noruega (Harthug *et al*, 2000, p.145).

O baixo poder invasivo e patogénico de *Enterococcus* spp impediu que, durante muito tempo, se pensasse neles como agentes de infecção preocupantes. No entanto, o aumento de imunodeprimidos (HIV, transplantes, doenças malignas, etc), técnicas médicas invasivas (algalias, catéteres intravenosos, cirurgias, próteses, etc) e de selecção de bactérias resistentes associadas ao elevado grau de consumo de antibióticos conduziram a uma maior incidência de infecções por *Enterococcus* spp, sendo hoje classificados como importantes agentes nosocomiais (Sousa *et al*, 1998, p.60; Duez *et al*, 2001, p.2561).

*Enterococcus* spp têm vindo a ser descritos como agentes etiológicos de infecções do tracto urinário, de feridas cirúrgicas, bacteriémias e endocardites. Têm também sido encontrados em infecções abdominais polimicrobianas, não se sabendo exactamente o seu papel neste contexto (Sousa *et al*, 1998, p.60).

A sua capacidade de resistir naturalmente a alguns antibióticos e de adquirir elementos genéticos móveis que transportam genes de resistência a estas moléculas, promoveu a selecção de *Enterococcus* spp com resistência múltipla em vários nichos ecológicos sujeitos a pressão selectiva, nomeadamente nas unidades hospitalares (Hanrahan *et al*, 2000, p.1349). Por exemplo, o consumo de cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração para o tratamento de infecções por *Enterobacteriaceae* e de metronidazol para bactérias anaeróbias promoveu a manutenção de *Enterococcus* spp, uma vez que estas bactérias são naturalmente resistentes aos antibióticos anteriormente mencionados. Adicionalmente, o consumo excessivo de vancomicina para o tratamento de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e colite pseudomembranosa por *Clostridium difficile* esteve na base da selecção de *Enterococcus* spp resistentes aos glicopéptidos, constituindo estes, actualmente, um grave problema de saúde em todos os hospitais do globo (Harthug *et al*, 2000, pp. 145-146; Arbeola *et al*, 2004, p.1221; Hsieh *et al*, 2006, p.514).

As resistências naturais e adquiridas em *Enterococcus* spp reduziram as opções terapêuticas que, normalmente, estão limitadas aos glicopéptidos, ampicilina, nitrofurantoína (em infecções urinárias) e aminoglicosídeos (sempre associados a um anti-parietal) (Harthug *et al*, 2000, p.145-146). Dada a incidência de bactérias de Gram positivo com resistência múltipla nos últimos anos, nomeadamente *Enterococcus* spp, ficaram ainda disponíveis no arsenal terapêutico linezolid, daptomicina e tigeciclina, antibióticos usados exclusivamente no ambiente hospitalar (Leavis *et al*, 2006, pp. 454-455).

*Enterococcus* spp resistentes a todas as classes de antibióticos encontram-se também distribuídos por outros nichos ecológicos, nomeadamente no ambiente de produção animal (seleccionadas pelo consumo de antibióticos em medicina veterinária ou como promotores de crescimento), no intestino de humanos saudáveis (através da cadeia alimentar e do consumo de antibióticos em medicina humana), no ambiente aquático (por descargas de efluentes contaminados), ar (a jusante de ambientes de produção animal), solos agrícolas (pela

utilização de adubo contaminado), etc...(Hanrahan *et al*, 2000, p.1349; Sousa *et al*, 1998, p.60).

Estas bactérias apresentam resistência à maioria dos  $\beta$ -lactâmicos, uma vez que possuem PBPs (*penicillin binding proteins*) com baixa afinidade para estas moléculas. Por exemplo, nenhuma cefalosporina é recomendada para o tratamento de infecções enterocócicas, mesmo que a sua actividade *in vitro* seja boa.

O  $\beta$ -lactâmico mais comumente usado no tratamento de infecções enterocócicas é a ampicilina (Rice *et al*, 2001, p.1480). No entanto, *Enterococcus* spp com resistência a este antibiótico foram sendo seleccionados ao longo dos últimos anos, sobretudo aqueles presentes nas unidades hospitalares e pertencendo à espécie *E.faecium* (Rice *et al*, 2001, p.1480). Inúmeros casos de surtos epidémicos de *E.faecium* resistentes à ampicilina têm sido descritos, tornando-se inclusivamente, algumas vezes, em situações endémicas (Rice *et al*, 2001, p.1480; Leavis *et al*, 2006, p.454).

Tendo em consideração a importância destes antibióticos no tratamento de infecções causadas por *Enterococcus* spp, nas próximas secções serão abordados o mecanismo de acção dos  $\beta$ -lactâmicos e os mecanismos de resistência capazes de os inactivarem. Na secção III descrever-se-á a epidemiologia da resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em *Enterococcus* spp, destacando-se a sua distribuição em vários nichos ecológicos, nomeadamente nas unidades hospitalares.

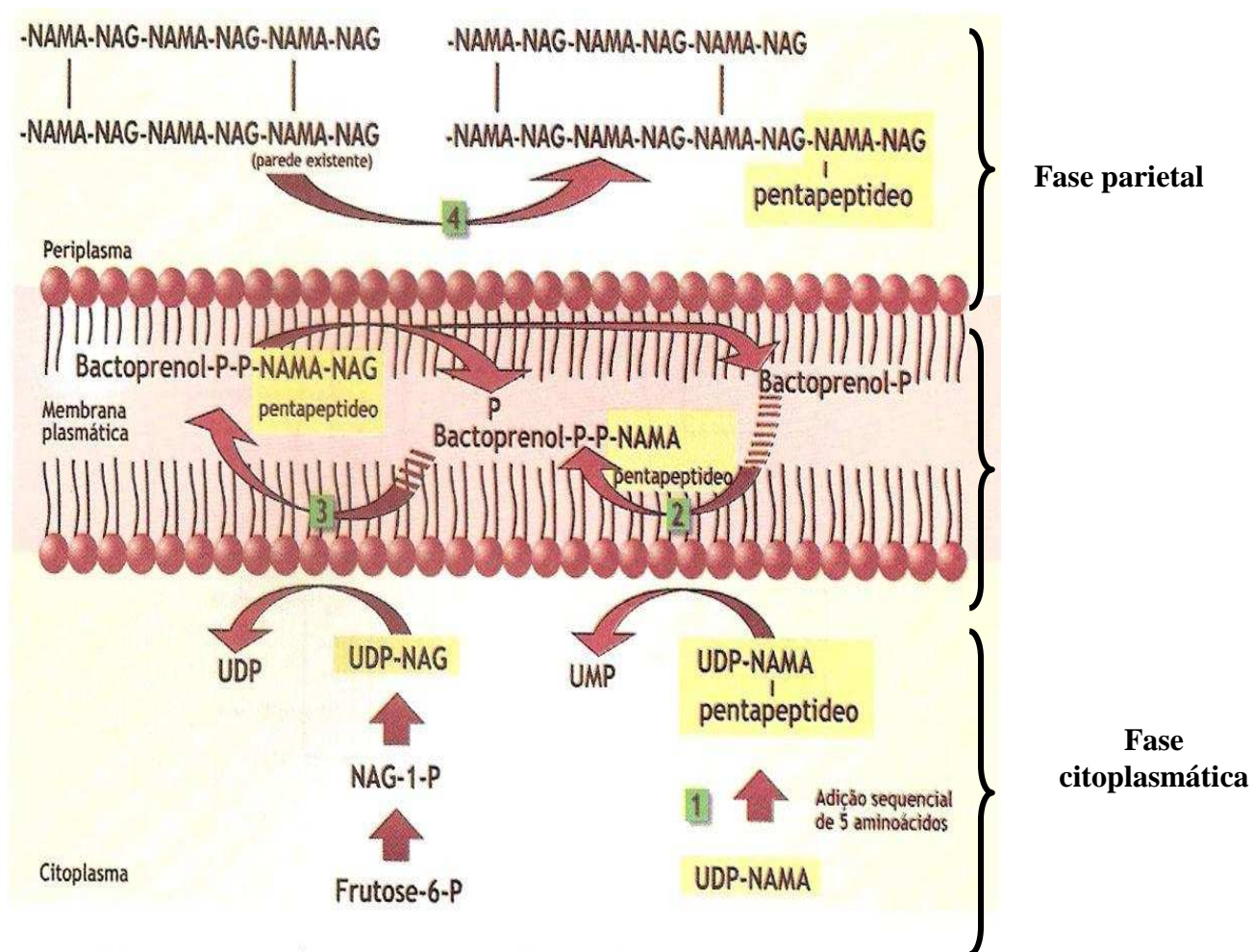
## **2. Mecanismos de acção dos $\beta$ -lactâmicos**

As bactérias são células procarióticas e, como tal, possuem uma organização celular mais simples que as eucarióticas (ex: de uma forma geral não têm organelas nem núcleo), e algumas especificidades estruturais (ex: peptidoglicano, ribossomas do tipo 70S) (Sousa *et al*, 1998, p.59).

O peptidoglicano faz parte da parede celular bacteriana, conferindo rigidez à célula e protegendo-a de alterações osmóticas. A sua destruição ou debilidade torna as bactérias mais susceptíveis a lise quando presentes em ambientes hipotónicos (Sousa *et al*, 1998, p.20).

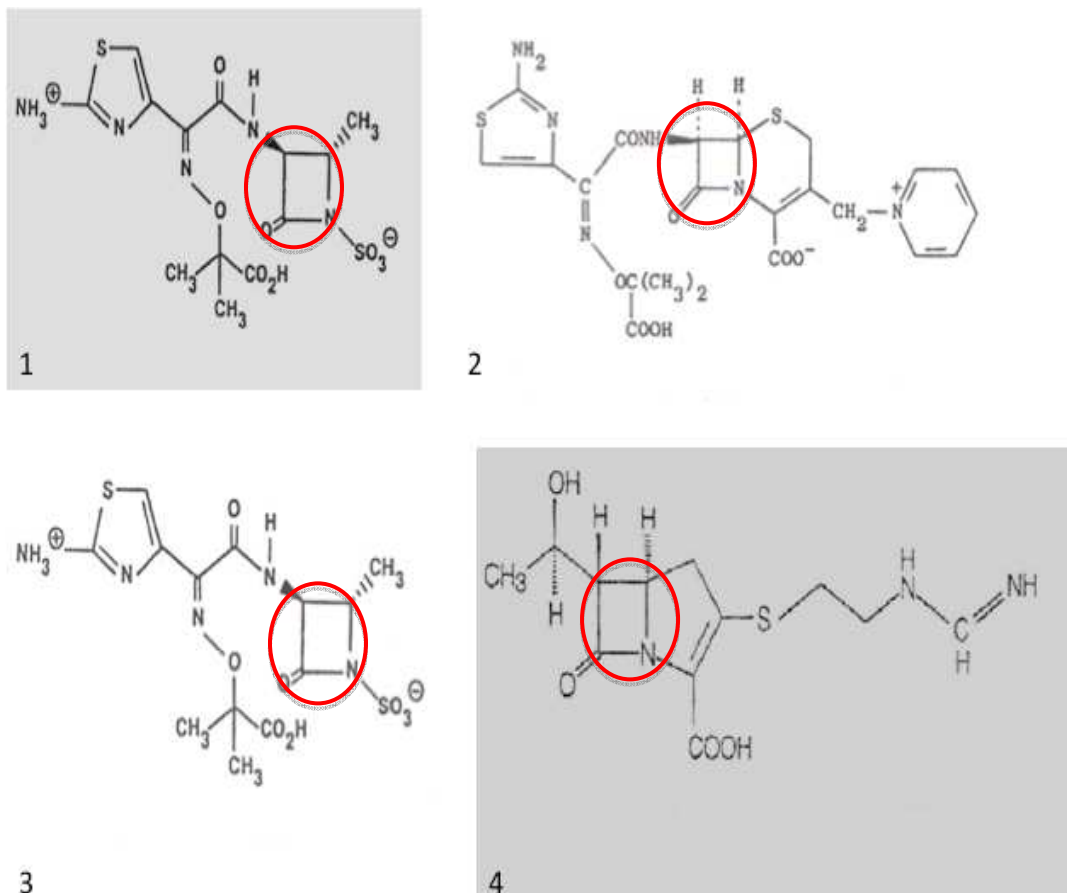
Vários grupos de antibióticos, incluindo os  $\beta$ -lactâmicos, actuam sobre a biossíntese do peptidoglicano. Para compreender-mos melhor o seu mecanismo de acção passa-se a descrever as diferentes etapas da formação desta macromolécula.

A biossíntese do peptidoglicano dá-se em três fases distintas (Figura 1). Numa primeira etapa ocorre a **Fase citoplasmática**, onde se sintetiza NAG (N-acetilglucosamina) e NAMA-pentapeptídeos (ácido N-acetilmurâmico), unidades básicas formadoras do peptidoglicano. Numa segunda etapa ocorre a **Fase membranar**, onde se dá o transporte de NAG e NAMA-pentapeptídeos através da membrana citoplasmática com a ajuda de um lípido transportador (álcool isoprenóide C55 fosforilado). No final dá-se a **Fase parietal** em que os NAG e NAMA-pentapeptídeos são posicionados na parede celular da bactéria em crescimento, formando-se ligações entre estes e a parede celular, estabelecendo-se inicialmente ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$  com o peptidoglicano já existente e em seguida ligações peptídicas entre o último resíduo de glicina e o 4º aminoácido da cadeia peptídica vizinha. As transpeptidases e carboxipeptidases estão envolvidas neste processo e devido à sua grande afinidade para as penicilinas são denominadas de PBP(s). Existem ainda outras moléculas, as autolisinas, que actuam de forma a quebrar as ligações no peptidoglicano já existente para que se possa formar o novo peptidoglicano (Sousa, 2006, p.33).



**Figura 1** – Biossíntese do peptidoglicano. Figura retirada de Sousa, J.C., 2006.

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são um grupo de moléculas extremamente importante, pois apresentam elevada eficácia terapêutica e baixa toxicidade para os animais, devido à sua selectividade para as células procarióticas. Embora este grupo de antibióticos tenha como base um anel  $\beta$ -lactâmico (fundamental para a sua actividade), a estrutura das suas moléculas pode ser bastante heterogénea. Assim, podemos dividir os  $\beta$ -lactâmicos em quatro sub-grupos: penicilinas (aminopenicilinas, ureidopenicilinas carbenecilinas), cefalosporinas (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração), monobactamos (azetreonamo) e carbapenemos (imipenemo, meropenemo) (Sousa, 2006, pp.107-293).



**Figura 2** – Diferentes sub-grupos pertencentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. 1- Penicilinas; 2- Cefalosporinas; 3- Monobactamos; 4- Carbapenemos. A estrutura base destas moléculas é constituída por um anel  $\beta$ -lactâmico (assinalado na imagem) constituído por 3 átomos de carbono e um de nitrogénio com radicais substituintes. Figura retirada de Sousa, J.C., 2006.

Todas estas moléculas actuam por inibição da biossíntese do peptidoglicano na sua fase parietal, estando incluídas no grupo dos antibióticos anti-parietais. Este mecanismo é explicável dada a analogia estrutural entre as moléculas de  $\beta$ -lactâmicos e a porção terminal D-alanil-D-alanina, da cadeia peptídica do peptidoglicano. Os  $\beta$ -lactâmicos ocupam o lugar do substrato natural da transpeptidase, não ocorrendo as actividades enzimáticas associadas às transpeptidases e carboxipeptidases (Sousa, 2006, p.112). Para além de impedirem a biossíntese do peptidoglicano, os  $\beta$ -lactâmicos participam, provavelmente, na activação das autolisinas endógenas, com subsequente lise celular, sendo assim classificados como bacteriolíticos (Sousa *et al*, 1998, p.112-114). Este mecanismo de acção impõe que sejam activos quando as bactérias estão em fase de crescimento.

A resistência natural de *Enterococcus* spp a várias classes de antibióticos faz com que existam poucas alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções em que estão envolvidos. Dentro da família dos  $\beta$ -lactâmicos, a ampicilina é uma molécula de utilização importante, quer isoladamente quer em associação com outros antibióticos (glicopéptidos ou aminoglicosídeos). Embora esta molécula seja bactericida para outras bactérias, tem actividade bacteriostática em *Enterococcus* spp (Sousa, 1998, pp.60-61).

### 3. Mecanismo de resistência aos $\beta$ -lactâmicos

A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em *Enterococcus* spp está associada à produção de  $\beta$ -lactamases ou à presença de PBPs com baixa afinidade para estes antibióticos (Hsieh *et al*, 2006, p.514; Rice *et al*, 2004, p.3028).

Quando *Enterococcus* spp produzem  $\beta$ -lactamases estas apresentam-se em pequena quantidade o que, dificulta, por vezes, a sua detecção laboratorial. Como estão localizadas na parte externa da parede celular a sua observação pode ser feita directamente pelo teste do nitrocefim, mas utilizando uma grande quantidade de inóculo bacteriano, para aumentar a probabilidade de detecção.

Os genes responsáveis pela produção de  $\beta$ -lactamases em *Enterococcus* spp são normalmente de origem plasmídica e codificam para penicilinasas semelhantes aquelas produzidas por *Staphylococcus aureus* (Comenge *et al*, 2003, p.1784; Ligozzi *et al*, 1993, p.2046).

Embora, surtos associados a *Enterococcus* spp produtores de  $\beta$ -lactamases tenham sido descritos (Hsieh *et al*, 2006, p.514), este mecanismo de acção é extremamente raro entre estas bactérias de Gram positivo.

O PBP mais frequentemente associado à resistência aos  $\beta$ -lactâmicos é o *pbp<sub>5</sub>*. Este está localizado no cromossoma da bactéria sendo considerado intrínseco para algumas espécies (Rice *et al*, 2001, p.1480). As bactérias que são sensíveis à ampicilina também podem possuir o *pbp<sub>5</sub>*, no entanto estudos recentes referem que, para que a resistência se manifeste é necessário ocorrer um aumento da presença deste PBP ou a presença de

determinadas mutações no respectivo gene (Sifaoui *et al*, 2001, p.2594). Entre estas foram descritas a adição de ácido aspártico ou serina depois da posição 466, troca de metionina por alanina ou treonina na posição 485, troca de alanina ou isoleucina por treonina na posição 499, troca de glutamato por alanina na posição 629 (Hsieh *et al*, 2006, p.514). O *pbp<sub>5</sub>* pode substituir as funções da maioria dos outros PBPs daí conferir uma vantagem às bactérias quando está na presença de ampicilina (Ligozzi *et al*, 1993, p.2046).

A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em *Enterococcus* spp tem sido descrita nas espécies *E.faecium*, *E.faecalis* e *E.hirae* (Arbeola *et al*, 2004, p.1221; Comenge *et al*, 2003, p.7184; Sapunaric *et al*, 2003, p.5925).

Ultimamente o aumento da resistência à ampicilina tem sido observado fundamentalmente em isolados de *E.faecium*, o que compromete a terapêutica das infecções causadas por este microrganismo.

#### **4. Epidemiologia da resistência aos $\beta$ -lactâmicos em *Enterococcus* spp**

Apesar de *Enterococcus* spp pertencer à flora comensal do Homem, hoje-em-dia é considerado um patogéneo responsável por uma grande variedade de infecções nos humanos. Esta particular importância advém da sua resistência natural e adquirida a diversos antibióticos, limitando o arsenal terapêutico disponível para o tratamento das infecções em que estão envolvidos. Exemplos de genes de resistência que têm sido adquiridos por *Enterococcus* spp incluem os que conferem resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrólidos, estreptograminas, cloranfenicol e glicopéptidos, entre outros (Valdezate *et al*, 2009, p.17).

A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos tem aumentado em várias zonas do globo entre o género *Enterococcus* spp. Embora há duas décadas tenham sido descritos os primeiros isolados produtores de  $\beta$ -lactamases em *E. faecalis* dos Estados Unidos este mecanismo de resistência continua com pouca expressão nestas bactérias spp, sendo apenas publicadas situações ocasionais (Klare *et al*, 2005, p.815; Leavis *et al*, 2006, p.454; Novais *et al*, 2005, p.3073). A aquisição de *pbp<sub>5</sub>* com mutações específicas tem sido o principal responsável pelas elevadas taxas de resistência a esta classe de antibióticos em *Enterococcus* spp de todo o

mundo (Arbeola *et al*, 2004, p.1221; Sapunarić *et al*, 2003, p.5925). Por exemplo, Harthug *et al* (2002) descrevem que 6,9% de *Enterococcus* spp resistentes à ampicilina na Noruega, estavam associados à presença de *pbp<sub>5</sub>*. Também Jureen *et al* (2003) verificaram que a resistência à ampicilina estava associada a este gene em *Enterococcus* spp associados a uma situação nosocomial endêmica que durava há oito anos. Adicionalmente, também foi descrito a presença de clones resistentes à ampicilina com boa adaptação hospitalar e envolvidos em situações endêmicas em dois hospitais da Noruega (Harthug *et al*, 2002, p.145-145). Mesmo em países com baixos níveis de resistência aos antibióticos, a epidemiologia de multi-resistência em *Enterococcus* spp parece estar a mudar. Em hospitais da Noruega, Finlândia e Suécia, países tradicionalmente com baixos níveis de resistência, a endemicidade da resistência à ampicilina em *Enterococcus faecium* já foi estabelecida (Leavis *et al*, 2006, p.455).

Os dados portugueses também apontam nesse sentido. Melo-Cristino em 1998 já descrevia que 70% de *E. faecium* hospitalares eram resistentes à ampicilina. Mais recentemente, Novais *et al* (2005) descreveu taxas de 99% de resistência à ampicilina em isolados resistentes aos glicopéptidos, representantes de 3 hospitais portugueses.

Embora tenham recentemente surgido alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções enterocócicas multi-resistentes a avaliação da resistência à ampicilina continua a ser importante, uma vez que esta parece ser um dos marcadores de estirpes envolvidas em surtos nosocomiais e agrupadas no Complexo Clonal CC17 (tipagem por Multilocus sequence typing-MLST), encontrado fundamentalmente em ambiente hospitalar e raramente em outros nichos (Leavis *et al.*, 2006, p.455). Infelizmente, muitos destes isolados são simultaneamente resistentes aos glicopéptidos, alternativa importante para o tratamento de infecções por estes microorganismos (Rice *et al*, 2001, p.1480).

Tal como a resistência verificada para outros grupos de antibióticos, nichos ecológicos extrahospitalares como animais para consumo humano, ambiente de produção animal, humanos saudáveis e ambiente aquático podem servir de reservatório de isolados e genes envolvidos na resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (Poeta *et al*, 2007, p.236; Caplin *et al.*, 2008, p.885, Damborg *et al.*, 2009, p.2360).

## II. Objectivos

A utilização de ampicilina/amoxicilina isoladamente ou em conjunto com outras classes de antibióticos como os glicopéptidos ou aminoglicosídeos constitui uma alternativa importante no tratamento das infecções enterocócicas. No entanto, nos últimos anos, a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em *Enterococcus* spp tem aumentado no ambiente hospitalar de vários países do globo, estando, por vezes, isolados resistentes envolvidos em situações endémicas (Leavis *et al.*, 2006, p. 454). Uma vez que, a identificação dos mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e a compreensão da sua forma e frequência de dispersão assumem uma particular importância, foram objectivos deste trabalho:

- a) Avaliar, por ensaios de conjugação, a transferência do gene *pbp<sub>5</sub>* a partir de isolados resistentes à ampicilina oriundos de diferentes nichos ecológicos (humano, animal e ambiental);
- b) Para os isolados com ensaios de conjugação positivos, avaliar processos de co-transferência de resistência a outras classes de antibióticos;
- c) Comprovar, por métodos moleculares, a presença do gene *pbp<sub>5</sub>* nas bactérias transconjugantes;
- d) Avaliar se a transferência do gene *pbp<sub>5</sub>* está associada à presença de transposões conjugativos disseminados em bactérias de Gram positivo.

### III. Material e Métodos

#### 1. Bactérias incluídas no estudo

*Enterococcus* spp incluídos no presente estudo pertencem a uma colecção que tem vindo a ser caracterizada no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, da qual foram seleccionados 86 isolados resistentes à ampicilina oriundos de vários nichos ecológicos:

a) Trinta e cinco isolados (n=27 *E. faecium*, n=6 *Enterococcus* spp, n=1 *E. gallinarum*, n=1 *E.hirae*) de 6 suiniculturas distribuídas no Norte, Centro e Sul de Portugal foram obtidos de 23 amostras colhidas entre 2006 e 2007. As amostras foram divididas em quatro grupos de acordo com a sua natureza:

- (i) Suínos (n=6; fezes, zaragatoa de narinas e de superfície dos animais);
- (ii) Alimentação/medicamentos (n=3; ração, medicamentos);
- (iii) Resíduos (n=10; lagonagem, águas residuais, estrume e fossa séptica);
- (iv) Amostras de instalações (n=4; ar, parede da maternidade, pó de salas com animais, solo).

b) n=10 *E. faecium* obtidos de 6 amostras de aves (frangos e perus) para consumo humano colhidas em 2 talhos do Norte de Portugal entre 1999 e 2001. As amostras pertenciam a 3 marcas de distribuídas por todo o país.

c) n=2 *E. faecium* de 2 amostras de fezes de humanos saudáveis obtidos no ano de 2001. Estes indivíduos não tinham consumido antibióticos nem tinham sido hospitalizados três e doze meses antes da colheita das amostras, respectivamente.

d) n=28 *E. faecium* obtidos de 29 doentes hospitalizados, entre 1997 e 2003, em 3 unidades de saúde localizadas no Centro e Norte de Portugal. Os isolados foram obtidos dos seguintes produtos biológicos:

- (i) Urina (n=10);
- (ii) Sangue (n=3)
- (iii) Exsudados (n=7);
- (iv) Cateteres (n=3);
- (v) Origem desconhecida (n=5).

e) n=11 isolados (n=10 *E. faecium*, n=1 *Enterococcus* spp), obtidos entre 2001 e 2003, de amostras de águas residuais (n=2 a montante e n=5 a jusante) de 3 hospitais da área do Porto e de água do estuário do rio Douro (n=1).

## 2. Pesquisa da presença de $\beta$ -lactamases

A pesquisa da presença  $\beta$ -lactamases foi realizada através do teste de nitrocefim, colocando-se cerca de 3  $\mu$ l de solução de antibiótico directamente em cima das culturas. A leitura de um resultado positivo corresponde ao aparecimento de uma cor vermelha associada à acção da  $\beta$ -lactamase sobre a molécula de nitrocefim.

## 3. Ensaios de conjugação

Nos ensaios de conjugação foram utilizados dois tipos de bactérias:

- a) As **dadoras**- São bactérias que possuem o gene de resistência aos antibióticos que queremos transferir. No presente estudo usaram-se as bactérias descritas no ponto 1.
- b) As **receptoras**- São bactérias de laboratório caracterizadas, que não possuem o gene que queremos transferir. As estirpes receptoras usadas neste estudo foram *E. faecium* GE1 e *E. faecium* BM4105. Ambas as estirpes são resistentes à rifampicina e ácido fusídico e *E. faecium* GE1 é ainda resistente à tetraciclina. As estirpes receptoras

foram gentilmente cedidas pela Doutora Teresa Coque do Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

Para proceder aos ensaios de conjugação, duas ou três colónias de cultura pura das bactérias dadoras e receptoras foram inoculadas em 5ml de caldo de *Brain-Heart Infusion* (BHI) (OXOID) e incubadas a 37°C durante um período aproximado de 16h.

Os dois tipos de bactérias foram misturadas na proporção 1:1, inoculando-se 200  $\mu$ l desta mistura na superfície de placas BHI agar (37°C, 24h) de modo a promover possíveis trocas genéticas. Todo o crescimento bacteriano foi, posteriormente, suspenso em 1ml de soro fisiológico. Da suspensão tiraram-se 100  $\mu$ l que foram semeados por espalhamento em placas de selecção (meio BHI agar) contendo antibióticos (10 $\mu$ g/ml de ampicilina e 60 $\mu$ g/ml de rifampicina) e incubadas a 37°C entre 24-48h. A viabilidade das placas de selecção foi controlada usando as bactérias receptoras (*E. faecium* BM4105 e *E. faecium* GE1) como controlos negativos e uma bactéria da colecção da Faculdade de Farmácia do Porto que possuía resistência simultânea à ampicilina e à rifampicina, como controlo positivo. *E. faecium* DR344, previamente descrita como sendo capaz de transferir o gene *pbp<sub>5</sub>* foi usada como controlo positivo da conjugação.

Na presença de crescimento bacteriano, foram retiradas até um máximo de 3 colónias das diversas placas de selecção e semeadas em BHI agar onde se colocou um disco de ampicilina (10 $\mu$ g), ácido fusídico (25 $\mu$ g) e rifampicina (5 $\mu$ g) para confirmar a presença de possíveis transconjugantes. Os isolados que apresentaram resistência aos três antibióticos foram congelados em TSB com 15% de glicerol a -70°C para posterior caracterização.

#### **4. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos**

Com o intuito de confirmar a presença de transconjugantes e fenómenos de co-transferência da resistência a antibióticos de outras famílias que não a estudada, foram realizados antibiogramas pelo o método de difusão em agar com discos, segundo as normas de CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). As bactérias em estudo foram semeadas em meio BHI agar e incubadas a 37°C durante 24 horas de modo a ocorrer o seu crescimento. Procedeu-se à realização de uma suspensão bacteriana em soro fisiológico estéril, até à

obtenção de uma densidade de 0,5 MacFarland. Estas bactérias foram inoculadas com uma zaragatoa (três direcções) em toda a superfície do meio de Mueller-Hinton agar. Posteriormente, com a ajuda de um dispensador, foram colocados discos de antibióticos pertencentes a diferentes famílias: rifampicina (5 $\mu$ g), ácido fusídico (25 $\mu$ g), vancomicina (30 $\mu$ g), ampicilina (10 $\mu$ g), tetraciclina (30 $\mu$ g), minociclina (30 $\mu$ g), eritromicina (15 $\mu$ g), quinoprisitina-dalfopristina (15 $\mu$ g), ciprofloxacina (5 $\mu$ g), cloranfenicol (30 $\mu$ g), gentamicina (120 $\mu$ g), streptomina (300 $\mu$ g) e nitrofurantoína (300 $\mu$ g). As placas foram incubadas a 37°C por período de 24h. As bactérias foram classificadas como susceptíveis (S), com resistência intermédia (I) ou resistentes (R) aos antibióticos de acordo com a classificação das normas de CLSI para o tamanho dos halos de inibição obtidos.

## **5. Amplificação de ácidos nucleicos - método de *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

### **5.1 Gene *pbp<sub>5</sub>***

A resistência à ampicilina em *Enterococcus* spp pode estar associada à presença do gene *pbp<sub>5</sub>* portador de algumas mutações. Desta forma procedeu-se à amplificação deste gene nas bactérias envolvidas em ensaios de conjugação positivos (dadoras, receptoras e bactérias fenotipicamente suspeitas de serem transconjugantes). Para isso usaram-se *primers* previamente descritos por Dahl *et al.*, (2000) (*pbp<sub>5</sub>Fw*-5'-GCACGGCAAAAATCGAACAGG-3' e *pbp<sub>5</sub>Rv*-5'-TGCTCGTTTGGTTGCTGAATCATC-3') com as condições de amplificação descritas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Condições de amplificação usadas na amplificação do *pbp<sub>5</sub>*.

Objectivo	Reagentes	Marca	Concentração stock	Concentração final	Condições do termociclador	Tamanho do produto amplificado (bp)
Amplificação do gene <i>pbp<sub>5</sub></i>	Tampão	Promega	5x	1x	95°C – 10 min (1 ciclo) 94°C-1 min ; 62°C-1min; 72°C-1min (25 ciclos) 72°C - 10 min (1 ciclo)	1984
	MgCl <sub>2</sub>	Promega	25mM	2mM		
	BSA	Promega				
	dNTP's	Frilabo	10mM	0,2mM		
	Taq Polimerase	Promega	5U/ $\mu$ l	1,25U		

## 5.2 Transposões conjugativas

Nas raras descrições de transferência horizontal de *pbp<sub>5</sub>* para bactérias receptoras estiveram envolvidos transposões conjugativas (Dahl *et al*, 2000, pp.1469-1470; Valdetaze *et al*, 2009, pp.17-18) que justificaram tal mobilização. Desta forma, procedeu-se, nas bactérias envolvidas em ensaios de conjugação positivos (dadoras, receptoras e bactérias fenotipicamente suspeitas de serem transconjugantes), à amplificação de integrases, excisases e transposases de transposões conjugativas e outros transposões a eles associados encontrados em vários géneros de bactérias de Gram positivo. Os *primers* utilizados encontram-se na Tabela 2 e as condições de amplificação na Tabela 3.

**Tabela 2** - Sequência nucleotídica dos primers usados para a identificação de transposões conjugativos e outros a eles associados.

Objectivo	Primers	Referência Bibliográfica
Tn916/Tn1545	IntF-5' GCG TGA TTG TAT CTC ACT-3' IntR-5' GAC GCT CCT GTT GCT TCT-3' XisF-5' AAG CAG ACT GAC ATT CCT A-3' XisR-5' GCG TCC AAT GTA TCT ATA A-3'	Novais et al, 2008
Tn917	tnpA1-5' ATC GAT TCG GTA GTG CTA AT-3' tnpA2-5' CAA TAA CAT TGG CGT GTA TC-3' tnpR1-5' GTG AGT ACG GAT GAT CAA AA-3' tnpR2-5' TGA GGT AAC GGT AAA AGG TT-3'	Novais et al, 2008
Tn5397	tndXF-5' ATG ATG GGT TGG ACA AAG A-3' tndXR-5' CTT TGC TCG ATA GGC TCT A-3'	Novais et al, 2008
Tn5398	ORF298F-5'GCG TAG TTA TGG AGA AGG AA-3' ORF298R-5' TTG TCA TAG CCT TTG TGT TC-3'	Novais et al, 2008
Tn5253	Catp194F-5'-TCC TTT TTC TCT TGC TGC TT-3' Catp194R-5'-TCC TGC ATG ATA ACC ATC AC-3'	Novais et al, 2008
Tn5386	Int 5386 F-5'-CTT GTT CCT ACG GAC AGA GT-3' Int5386R-5'-AG CCG TGA GCG TAA TAA TTC-3' Xis5386F-5'-ATA CTG ATG TGC CTG TAT GG-3' Xis5386R-5'- TCG CTT TAT CTG AAT ACG G-3'	Novais et al, 2008
EfcTnI	Int CTn1F-5-CAT CGA GTC TAA CCG ATT GT-3' Int CTn1R-5-GAC CCA AAC GAA CTT GTA CT-3' Xis CTn1F-5-CGA AGT ATT AAC CGA ACA GA-3' Xis CTn1R-5'-TAT CAT CGC GAT CAA AAC GA-3	Novais et al, 2008
CW459tet(M)	Int 459 F-CTGTTTCCGATATTGAGC Int 459 R- GTTTCGCAAGTAGTCTACAG	Novais et al, submitted

**Tabela 3** - Condições utilizadas nas reacções de PCR para a amplificação dos diferentes genes que codificam para os transposões conjugativos.

<b>Transposões identificados</b>	<b>Concentração final dos reagentes usados</b>	<b>Condições do termociclador</b>	<b>Tamanho do produto amplificado</b>
<b><u>Tn5396, EfcTn1</u></b>	Tampão de PCR 1x; 2mM MgCl <sub>2</sub> 0,5 $\mu$ M de cada primer ; 0,2mM de cada dNTP ; 1,25U Taq Polimerase	95°C-10min (1ciclo). 94°C-30s, 53°C- 30s, 72°C- 30s, (25 ciclos). 72°C-10min (1 ciclo)	Ctn1 Int - 869bp Ctn1 Xis -206bp 5396 Int - 1025bp 5396 Xis - 155bp
<b><u>Tn916/Tn1545 e Tn917</u></b>	Tampão de PCR 1x ; 2mM MgCl <sub>2</sub> 0,5 $\mu$ M de cada primer ; 0,2mM de cada dNTP ; 1,25U Taq Polimerase	95°C-10min (1ciclo) 94°C-30s, 54°C-30s, 72°C-30s, (25 ciclos). 72°C-10min (1ciclo)	Int-1046bp Xis- 194bp tnpA- 854bp tnpR- 517bp
<b><u>Tn5397, Tn5398, Tn5252</u></b>	Tampão de PCR 1x ; 2mM MgCl <sub>2</sub> 0,5 $\mu$ M de cada primer ; 0,2mM de cada dNTP ; 1,25U Taq Polimerase	95°C-10min (1ciclo) 94°C-45s, 56°C-45s, 72°C-2mim, (25ciclos) 72°C-10min (1ciclo)	tndX-609bp ORF298-784bp Capt - 1331bp
<b><u>CW459tet(M)</u></b>	Tampão de PCR 1x ; 2mM MgCl <sub>2</sub> 0,5 $\mu$ M de cada primer ; 0,2mM de cada dNTP ; 1,25U Taq Polimerase	95°C-10min (1ciclo) 94°C-45s, 56°C-45s, 72°C-2mim, (25ciclos) 72°C-10min (1ciclo)	Int459 - 854bp

### **5.3 Visualização dos produtos de amplificação**

Os produtos de amplificação das reacções de PCR foram corridos por electroforese horizontal num gel de agarose a 2% em Tris Acetato EDTA.(TAE) 1X contendo 0,01% de *Sybr Safe* (Invitrogen). Foram aplicados 10 $\mu$ l de cada amostra na corrida de electroforese assim como 5  $\mu$ l de um marcador de DNA (Hyper Lader IV- Bioline). As corridas de electroforese decorreram a 110V durante 40 minutos. Os resultados foram visualizados num transiluminador e adquiridos digitalmente com programa *Quantati one* version 4.6.1 Buidl 055. (BioRad).

## **IV. Resultados**

### **1. Pesquisa da presença de $\beta$ -lactamases**

A degradação do nitrocefim não foi observada em nenhuma bactéria pelo que não se detectou a presença de  $\beta$ -lactamases entre os isolados incluídos no presente estudo.

### **2. Ensaio de conjugação**

Dos 86 ensaios de conjugação realizados só foi possível obter transconjugantes a partir de duas bactérias dadoras. Estas foram obtidas de uma suinicultura do Sul de Portugal em duas ocasiões distintas (Abril de 2006 e Março de 2007). Um dos isolados é proveniente de uma amostra de esterco seco e outra do pó de uma pocilga com uma porca parideira e seus leitões.

### **3. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos**

Com o intuito de verificar a transferência de co-resistência a outros antibióticos foi executado o teste de difusão com discos em agar nas bactérias dadoras, transconjugantes e receptora.

Apenas prosseguiu o estudo um transconjugante com perfis de susceptibilidade distintos, de cada conjugação executada.

Através da tabela apresentada pode observar-se que o fenómeno de co-resistência, a outros antibióticos que não a ampicilina, não ocorreu, pois os transconjugantes, com excepção da resistência à ampicilina, apresentam o mesmo perfil de susceptibilidade que a bactéria receptora.

**Tabela 4** - Susceptibilidade das bactérias dadoras, transconjugantes e receptora aos diferentes grupos de antibióticos.

Antibióticos	Susceptibilidade dos isolados				
	SN71	TCSN71.1	SN512	TCSN512.1	GE1
Vancomicina	S	ND	S	ND	S
Teicoplanina	S	ND	S	ND	S
Ampicilina	R	R	R	R	S
Tetraciclina	R	ND*	R	ND *	R
Minociclina	I	ND*	R	ND*	R
Eritromicina	R	S	R	S	S
Quino/Dalfo	I	S	I	S	S
Ciprofloxacina	I	ND	S	S	S
Cloranfenicol	S	ND	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	S	S
Streptomicina	R	S	R	S	S
Nitrofurantoína	R	S	R	S	S
Rifampicina	S	R	S	R	R
Ác. Fusídico	S	R	S	R	R

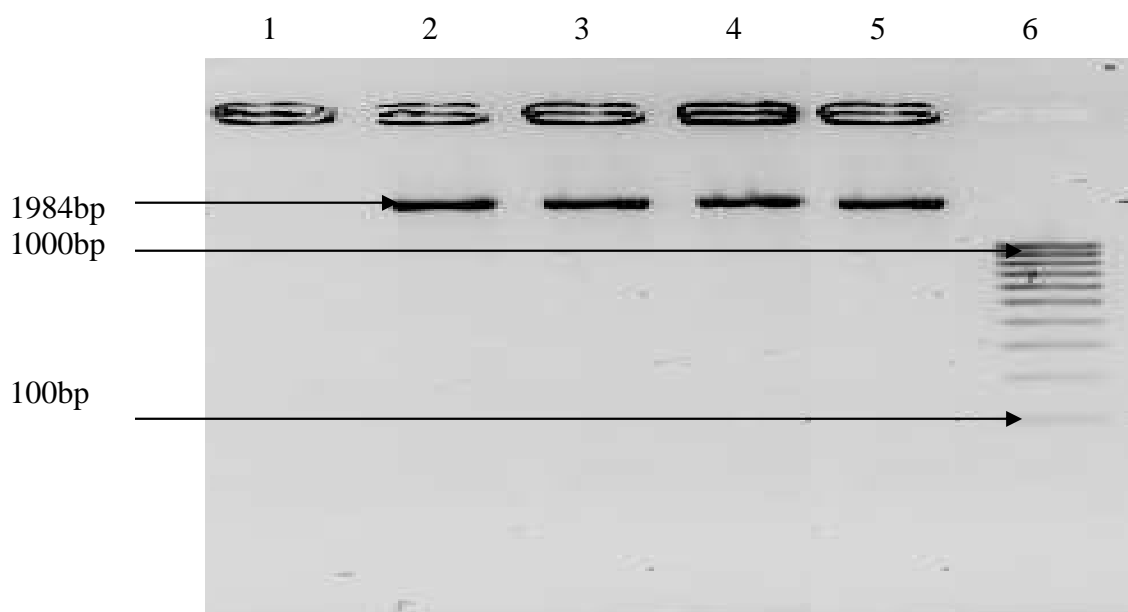
Legenda: S - Sensível; R - Resistente; I - Com resistência intermédia; ND - Não determinado;

\* - A estirpe receptora *E. faecium* GE1 já é resistente às tetraciclinas.

#### 4. Amplificação de ácidos nucleicos - método de *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

##### 4.1 Gene *pbp5*

A amplificação do *pbp5* foi observada quer nas estirpes dadoras quer nos respectivos transconjugantes. No entanto, está ausente na bactéria receptora *E. faecium* GE1, indicando que houve transferência deste gene durante o processo de conjugação (Fig.1).

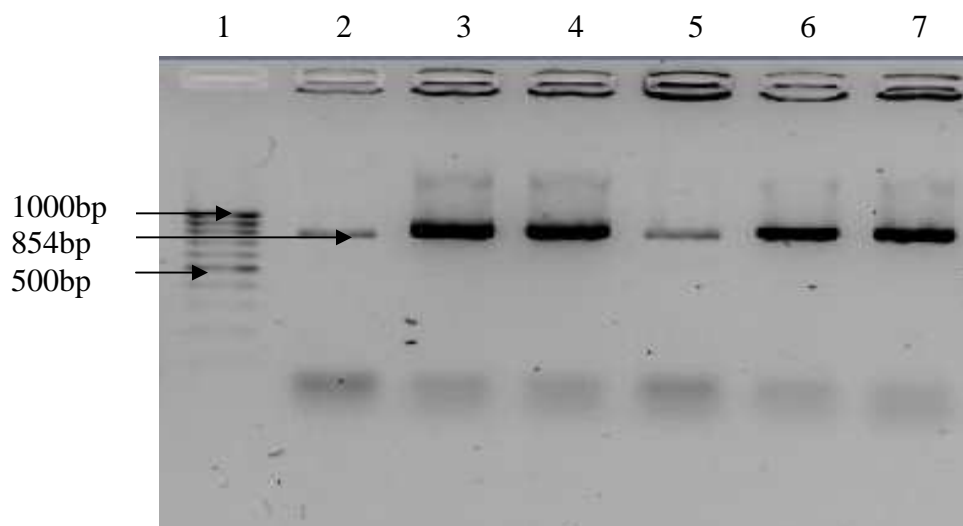


**Figura 3** - Amplificação do gene *pbp5* nas bactérias dadoras, na receptora e nos transconjugantes. 1- *E. faecium* GE.1; 2- Dadora SN71; 3- Transconjugante SN71.1; 4- Dadora SN512; 5- Transconjugante SN512.1; 6- Marcador de DNA.

##### 4.2 Transposões conjugativas

No sentido de avaliar se alguns dos transposões conjugativas que aparecem em bactérias de Gram positivo eram responsáveis pela transferência de *pbp5*, tentou amplificar-se integrases e excisases de Tn5396, *EfcTn1*, Tn917, Tn916/Tn1545, Tn5397, Tn5398, Tn5252 e CW459*tetM*. Nas estirpes dadoras detectou-se Tn5397 e Tn5398 e aparentemente CW459*tetM* que aparece, nestas estirpes, com uma banda débil (Fig.2). No entanto, o único transposão observado nos transconjugantes foi CW459*tetM* cuja integrase foi igualmente

amplificada na receptora *E. faecium* GE1 (Fig.2). Os resultados foram confirmados por ensaios de hibridação com sondas específicas para CW459*tetM* (Freitas AR., Novais C, Peixe LV, Coque TM-comunicação pessoal) tendo-se verificado esta transposição apenas nas bactérias transconjugantes e na estirpe receptora. Deste modo, pode concluir-se que CW459*tetM* não está envolvido na disseminação de *pbp<sub>5</sub>*. Até ao momento, a presença de CW459*tetM* em *E. faecium* GE1 era desconhecida.



**Figura 4** - Amplificação da integrase de CW459*tetM* nas bactérias dadoras, na receptora e nos transconjugantes. 1- Marcador (Hipperladder IV); 2- Dadora SN512; 3- Transconjugante SN512.1; 4- Transconjugante SN512.2; 5- Dadora SN71; 6- Transconjugante SN71.1; 7- *E. faecium* GE.1.

## V. Discussão

A utilização de ampicilina/amoxicilina isoladamente ou em conjunto com outras classes de antibióticos como os glicopéptidos ou aminoglicosídeos constitui uma alternativa importante no tratamento das infeções enterocócicas. No entanto, nos últimos anos, a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em *Enterococcus* spp tem aumentado no ambiente hospitalar de vários países do globo, estando, por vezes, isolados resistentes envolvidos em situações endémicas (Leavis *et al.*, 2006; p. 454).

Vários estudos de tipagem de *Enterococcus* spp por MLST (*Multilocus sequence typing*) mostraram que as estirpes hospitalares e, sobretudo as associadas a surtos

nosocomiais, estão associadas num grupo específico denominado de Complexo Clonal 17 (CC17) (Leavis *et al.*, 2006; p. 454). São várias as características que se apontam como marcadores deste grupo que parecem favorecer a sua adaptação ao nicho hospitalar, estando entre elas a resistência à ampicilina. De facto, se olhar-mos para a história dos *Enterococcus* spp de alguns países, nomeadamente dos Estados Unidos da América, verificamos que antes da fase endémica de *Enterococcus* spp multi-resistentes, nomeadamente aos glicopéptidos (altamente preocupantes nos dias de hoje), uma taxa elevada de resistência à ampicilina já era verificada (Leavis *et al.*, 2006; p. 454). Esta resistência parece melhorar a adaptação destes isolados ao ambiente hospitalar.

Por tudo o que foi atrás referido, a identificação dos mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e a compreensão da sua forma e frequência de dispersão assumem uma particular importância.

Tal como a resistência verificada para outros grupos de antibióticos, nichos ecológicos extrahospitalares como animais para consumo humano, ambiente de produção animal, humanos saudáveis e ambiente aquático podem servir de reservatório de isolados e genes envolvidos na resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, sendo fundamental o seu estudo para uma boa avaliação da epidemiologia da resistência.

No presente estudo, verificou-se que isolados resistentes à ampicilina representativos de vários nichos ecológicos Portugueses (hospital, produção animal, humanos saudáveis e ambiente aquático) não eram produtores  $\beta$ -lactamases. Esta observação vem reforçar os dados encontrados por outros autores em que o principal mecanismo de resistência estava associado à expressão de *pbp<sub>5</sub>* (Harthug, *et al* 2000, P.145; Valdezate, *et al* 2009, p.17). No entanto, as elevadas taxas de resistência encontradas no globo não podem ser apenas justificadas pela mutação espontânea deste gene, classicamente considerado como estando não envolvido em mecanismos de transmissão horizontal. Recentemente, Rice *et al* (2005, p.5007) e Hanrahan *et al* (2000, p.1349) detectaram a transferência de *pbp<sub>5</sub>* entre isolados de *Enterococcus* spp, mostrando que, afinal, mecanismos de transmissão horizontal podem estar envolvidos na sua dispersão. Os resultados obtidos neste estudo, confirmam esta possibilidade, uma vez que foi possível obter transconjugantes em duas ocasiões com isolados oriundos de suiniculturas. A aquisição de *pbp<sub>5</sub>* por *E. faecium* GE1 e respectiva resistência à ampicilina, confirmam que a

aquisição deste gene é responsável pela falta de actividade da ampicilina. A sequenciação de *pbp<sub>5</sub>* dos transconjugantes seria fundamental para a caracterização das mutações envolvidas nestas estirpes e sua possível comparação com outros estudos internacionais.

Tal como descrito por outros autores, a frequência da disseminação de *pbp<sub>5</sub>* foi extremamente baixa, pelo menos nas condições normalmente utilizadas no laboratório para este tipo de ensaios. Será fundamental, em estudos futuros, fazer optimização de ensaios de conjugação para  $\beta$ -lactâmicos e/ou conjugações *in vivo* no sentido de compreender melhor a dispersão deste gene. O facto de se ter repetido os ensaios de conjugação uma única vez, ao contrário de outros estudos (mínimo de 3 vezes) (Rice *et al*, 2005, p.5007) pode ter também diminuído a possibilidade de obtenção de mais resultados positivos.

Dado que os raros casos de disseminação de *pbp<sub>5</sub>* estiveram associados à presença de transposões conjugativos como Tn5386 e Tn916 (que conferem resistência às tetraciclina) (Hanrahan *et al.*, 2000, p.1349; Rice *et al* 2005; p.5007; Lu *et al*, 2005 p.3939), fomos avaliar a presença, deste tipo de elementos nos transconjugantes obtidos. A sua ausência sugere que outras plataformas genéticas servem como transporte a *pbp<sub>5</sub>*, sendo necessários mais estudos de caracterização molecular para a sua identificação. Adicionalmente, a ausência de co-transferência de resistência aos outros grupos de antibióticos estudados, sugere que *pbp<sub>5</sub>* se pode ter incorporado em elementos genéticos que não estão tradicionalmente associados à resistência aos antibióticos.

A presença de CW459*tetM*, quer na estirpe receptora *E. faecium* GE1 quer nos transconjugantes, indica-nos que *E. faecium* GE1 já possui naturalmente este transposição, não sendo possível avaliar o seu envolvimento na disseminação horizontal de *pbp<sub>5</sub>*. No entanto, a presença de CW459*tetM* nesta estirpe receptora está ser descrita pela primeira vez. O conhecimento das características das estirpes receptoras é fundamental para que estas possam ser correctamente escolhidas no laboratório para ensaios de conjugação e caracterização molecular de elementos genéticos móveis.

Os dois isolados de *Enterococcus* spp de suiniculturas envolvidos na transferência de *pbp<sub>5</sub>* pertencem ao complexo clonal CC17, anteriormente referido (Freitas A.R., Novais C., Coque T.M., Peixe L.- comunicação pessoal) sugerindo que os suínos podem constituir um

reservatório de estirpes com interesse clínico e com características que lhes permitem uma boa adaptação ao nicho hospitalar.

Em conclusão, pode-se dizer que o gene *pbp<sub>5</sub>* está associado à resistência à ampicilina, e que a sua disseminação horizontal acontece. Estudos moleculares mais aprofundados são fundamentais para compreender melhor a natureza da sua disseminação horizontal e da epidemiologia da resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em *Enterococcus* spp.

## VI. Bibliografia

- Arbeloa, A. *et al* (2004). Role of class A penicillin-Binding Proteins in PBP5-mediated  $\beta$ -Lactam Resistance in *Enterococcus faecalis*, *Journal of Bacteriology*, Vol.186 N°5, pp. 1221-1228.
- Caplin, J. *et al* (2008). Presence of vancomycin and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* of epidemic clonal complex-17 in wastewaters from the south coast of England, *Environmental Microbiology*, Vol.10 N°4, p.885-892.
- Comange, Y. *et al* (2003). The CroRS Two-Component Regulatory System Is Required for Intrinsic  $\beta$ -Lactam Resistance in *Enterococcus faecalis*, *Journal of Bacteriology*, Vol. 185 N°24, pp.7184-7192.
- Dahl, K. *et al* (2000). Genetic linkage of the *vanB2* gene cluster to Tn5382 in vancomycin-resistant enterococci and characterization of two novel insertion sequences, *Microbiology*, 146, pp.1469-1479.
- Damborg, P. *et al* (2009). Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* lineages associated with human infections, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.75 N°8, pp.2360-2365.

Duez, C. *et al* (2001). The penicillin resistance of *Enterococcus faecalis* JH2-2r results for an overproduction of low affinity penicillin-binding protein *pbp<sub>4</sub>* and does not involve a *psr*-like gene, *Microbiology*, 147, pp. 2561-2569.

Hanrahan, J. *et al* (2000). Geographic Distribution of a Large Mobile Element That Transfers Ampicillin and Vancomycin Resistance between *Enterococcus faecium* Strains, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol.44 N°5, pp. 1349-1351.

Harthug, S. *et al* (2000). The prevalence of faecal carriage of ampicillin resistant and high level gentamicin-resistant enterococci among inpatients at 10 major Norwegian hospitals, *Jornal of Hospital Infection*, 50, pp. 145-154.

Hsieh, S. *et al* (2006). Importance of amino acid alterations and expression of penicillin-binding protein 5 ampicillin resistance of *Enterococcus faecium* in Taiwan, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28, pp. 514-519.

Jureen, R. *et al* (2003). Molecular characterization of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from hospitalized patients in Norway, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.41 N°6, pp.2330-2336.

Klare, I. *et al* (2005). Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals, *Europe Journal Clinical Microbiology Infect Diseases*, 24, pp.815-825.

Leavis, H. *et al* (2006). Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance, *Current opinion in Microbiology*, 9, pp.454-460.

Ligozzi, M. *et al* (1993). Identification of a Genetic Element (*psr*) Which Negatively Controls Expression of *Enterococcus hirae* Penicillin-Binding Protein 5, *Journal of Bacteriology*, Vol.175 N°7, pp.2046-2051.

Lu, J. *et al* (2005). The *vanB2* gene cluster of the majority of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Taiwan is associated with the *pbp5* gene and is carried by Tn5382 containing a novel insertion sequence, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol.49 N°9, pp.3937-3939.

Melo Cristino, J. (1998). Antimicrobial resistance in staphylococci and enterococci in 10 Portuguese hospitals in 1996 and 1997. POSGAR. Study Group of Antimicrobial Resistance, Vol.4 N°4, pp.319-324.

Novais, C. *et al* (2005). Molecular Characterization of Glycopeptide-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Portuguese Hospitals, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol.49 N°7, pp 3073-3079.

Novais C., Freitas A.R., Moreira L., Francia M.V., Baquero F., L.V. Peixe, T.M. Coque. 2008. Characterisation of Gram-positive conjugative transposons in enterococci from different sources by a multiplex-PCR assay. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, p.1665.

Poeta, P. *et al* (2007). Polymorphisms of the gene *pbp5* and correlation with ampicillin resistance in *Enterococcus faecium* isolates of animal origin, *Journal of Medical Microbiology*, 56, pp. 236-240.

Poeta, P. *et al* (2007). Characterization of Van-A containing *Enterococcus faecium* isolates carrying Tn5397-like and Tn916/Tn1545-like transposons in wild boars, *Journal of Medical Microbiology*, 13, pp.151-156.

Rice, L.B. *et al* (2005). *Enterococcus faecium* Low-Affinity *pbp5* Is a Transferable Determinant, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol.49 N°12, pp. 5007-5012.

Rice, L.B. *et al* (2004). Impact of Specific *pbp5* Mutations on Expression of  $\beta$ -Lactam Resistance in *Enterococcus faecium*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol.48 N°8, pp. 3028-3032.

Rice, L.B. *et al* (2001). Penicillin-Binding Protein 5 and Expression of Ampicillin Resistance in *Enterococcus faecium*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 45. N°5, pp.1480-1486.

Sapunaric, F. *et al* (2003). Redefining the Role of *psr* in  $\beta$ -Lactam Resistance and Cell Autolysis of *Enterococcus hirae*, *Journal of Bacteriology*, Vol.185 N°20, pp.5925-5935.

Sifauoi, F. *et al* (2001). Role of Penicillin-Binding Protein 5 in Expression of Ampicillin Resistance and Peptidoglycan Structure in *Enterococcus faecium*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol.45 N°9, pp. 2594-2597.

Sousa, J.C. *et al* (1998). *Microbiologia – volume 1*. Lisboa, LIDEL – edições técnicas Lda.

Sousa, J.C. *et al* (1998). *Microbiologia – volume 2*. Lisboa, LIDEL – edições técnicas Lda.

Sousa, J.C. (2006). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa.

Valdezate, S. *et al* (2009). Large clonal outbreak of multidrug-resistance CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, pp.17-20.