

SARA INÊS ALMEIDA DIAS COSTA

**DISSEMINAÇÃO HORIZONTAL DE GENES QUE CODIFICAM PARA
β-LACTAMASES DE ESPECTRO ALARGADO EM ISOLADOS DE
ENTEROBACTERIACEAE DE ORIGEM HOSPITALAR**

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO, 2013

SARA INÊS ALMEIDA DIAS COSTA

**DISSEMINAÇÃO HORIZONTAL DE GENES QUE CODIFICAM PARA
β-LACTAMASES DE ESPECTRO ALARGADO EM ISOLADOS DE
ENTEROBACTERIACEAE DE ORIGEM HOSPITALAR**

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO, 2013

SARA INÊS ALMEIDA DIAS COSTA

**DISSEMINAÇÃO HORIZONTAL DE GENES QUE CODIFICAM PARA
β-LACTAMASES DE ESPECTRO ALARGADO EM ISOLADOS DE
ENTEROBACTERIACEAE DE ORIGEM HOSPITALAR**

Atesto a originalidade do trabalho

Tese apresentada à Universidade Fernando
Pessoa como parte dos requisitos para a
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, sob a orientação da Professora
Doutora Elisabete Machado.

SARA INÊS ALMEIDA DIAS COSTA

**DISSEMINAÇÃO HORIZONTAL DE GENES QUE CODIFICAM PARA
β-LACTAMASES DE ESPECTRO ALARGADO EM ISOLADOS DE
ENTEROBACTERIACEAE DE ORIGEM HOSPITALAR**

O presente trabalho resultou de uma colaboração da Universidade Fernando Pessoa com o REQUIMTE (Laboratório Associado) / Grupo de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

RESUMO

A família *Enterobacteriaceae* é composta por uma variedade de géneros e espécies de bacilos de Gram negativo que podem ser responsáveis por várias infecções, sendo *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* as espécies mais frequentemente envolvidas. Os antibióticos β -lactâmicos e as fluoroquinolonas constituem as principais escolhas terapêuticas para o tratamento das infecções provocadas por estes microrganismos. A resistência aos antibióticos β -lactâmicos em *Enterobacteriaceae* está fundamentalmente associada a genes que codificam para beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs), principalmente genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}. Estes podem ser disseminados por expansão clonal ou por mecanismos de transferência horizontal (THG). A THG consiste na transferência de material genético para outro organismo que não seja seu descendente. Essa transferência ocorre por intervenção de elementos genéticos móveis, assumindo os plasmídeos conjugativos um papel preponderante na sua disseminação.

Desta forma, com o presente estudo pretendeu-se avaliar a frequência de dispersão dos genes *bla*_{ESBLs} por conjugação em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar de Portugal, bem como comparar essa taxa de transferência entre diferentes espécies e tipos de genes *bla*_{ESBL}. Para isso, foram estudados 210 isolados de *Enterobacteriaceae* previamente identificados como produtores de ESBLs obtidos de hospitais da região Norte (n=1) e Centro (n=2) de Portugal. A avaliação da transferência de genes *bla*_{ESBL} foi efectuada através de ensaios de conjugação em meio sólido, utilizando como estirpes receptoras *Escherichia coli* BM21NR ou *E. coli* HB101. A confirmação da transferência por conjugação dos genes *bla*_{ESBL} foi efectuada através do teste de duplo sinergismo.

Foi detectada a transferência de genes *bla*_{ESBL} em 98 dos 210 isolados testados (correspondendo a uma taxa de conjugação de 47%). A transferência de genes *bla*_{ESBL} por conjugação foi observada em *E. coli* (n=84), *K. pneumoniae* (n=8), *P. mirabilis* (n=2), *K. oxytoca* (n=1), *E. cloacae* (n=1), *E. aerogenes* (n=1) e *M. morgani* (n=1). A espécie onde se observou mais frequentemente a transferência de genes *bla*_{ESBL} por conjugação foi *E. coli*, apresentando uma taxa de conjugação de 57% (84/147), seguindo-se *K. pneumoniae* (20%, 8/40) e *E. cloacae* (8%, 1/12). Entre as ESBLs do tipo TEM foi observada uma taxa de conjugação de 58% [TEM-10 (60%); TEM-52

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

(67%); TEM-116 (50%); outras TEM (50%)]. A frequência de conjugação foi inferior entre os isolados produtores de CTX-M [52%; CTX-M-1 (33%); CTX-M-14 (83%); CTX-M-15 (51%)] ou SHV [27%; SHV-12 (26%); outras SHV (33%)].

Neste estudo verificou-se que é frequente a disseminação de genes *bla*_{ESBL} por conjugação em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar em Portugal. Constatou-se ainda que *E. coli* foi a espécie em que se observou uma maior taxa de transferência por conjugação de genes *bla*_{ESBL}. As ESBLs do tipo TEM-52 e CTX-M-14 foram as que apresentaram taxas de transferência por conjugação mais elevadas, estando possivelmente associadas a plasmídeos *narrow-host range*. SHV-12 foi a ESBL cuja transferibilidade esteve associada a maior diversidade de espécies, provavelmente demonstrando o sucesso da disseminação de plasmídeos contendo esta ESBL em Portugal.

ABSTRACT

Enterobacteriaceae is composed by a variety of genus and species of negative Gram bacteria that may be responsible for many infections, being *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* the most frequently involved. The β -lactam antibiotics and fluoroquinolones are the main therapeutic choices for the treatment of infections caused by these microorganisms. The resistance to β -lactam antibiotics in *Enterobacteriaceae* is fundamentally linked to genes encoding Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs), particularly *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M}. These can be spread by clonal expansion or by Horizontal Gene Transfer (HGT) mechanisms. The HGT is the mobilization of genetic material to another organism that is not its offspring and occurs through the intervention of mobile genetic elements, assuming the conjugative plasmids a leading role.

The present study aimed to evaluate the dispersion frequency of *bla*_{ESBLs} genes by conjugation in *Enterobacteriaceae* isolates of hospital origin and to compare the transfer rate between different species and diverse *bla*_{ESBL} genes. For this work, 210 *Enterobacteriaceae* isolates previously identified as ESBL producers were analysed. They were obtained from hospitals in the Northern (n=1) and Central (n=2) regions of

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

Portugal. The evaluation of bla_{ESBL} gene transfer was carried out by conjugation tests on solid medium, using *Escherichia coli* BM21NR or *E. coli* HB101 as receptor strains. The transfer by conjugation of bla_{ESBL} genes was confirmed using the double disk synergy test (DDST).

The transfer of bla_{ESBL} genes was detected in 98 of the 210 isolates tested (corresponding to a conjugation rate of 47%). Transfer by conjugation of bla_{ESBL} genes was observed in *E. coli* (n=84), *K pneumoniae* (n=8), *P. mirabilis* (n=2), *K oxytoca* (n=1), *E. cloacae* (n=1), *E. aerogenes* (n=1) and *M. morgani* (n=1). The species where the transfer by conjugation of bla_{ESBL} genes was more frequently observed was *E. coli* (57%, 84/147), followed by *K pneumoniae* (20%, 8/40) and *E. cloacae* (8%, 1/12). Among the TEM-type ESBLs, a conjugation rate of 58% was observed [TEM-10 (60%), TEM-52 (67%), TEM-116 (50%); other TEM (50%)]. The conjugation frequency was lower among the CTX-M - 52%; CTX-M-1 (33%), CTX-M-14 (83%), CTX-M-15 (51%) or SHV - 27%; SHV-12 (26%); other SHV (33%) – producing isolates.

This study confirmed that the dissemination of bla_{ESBL} genes by conjugation in *Enterobacteriaceae* isolates of hospital origin is relatively frequent. *E. coli* was the species where a higher rate of transfer by conjugation of bla_{ESBL} genes was observed. The TEM-52 and CTX-M-14 ESBLs were those with higher transfer rates by conjugation, being possibly associated to narrow-host range plasmids. SHV-12 was the ESBL whose transferability was associated to a larger diversity of species, demonstrating the success of dissemination of plasmids containing this ESBL.

DEDICATÓRIAS

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
Mas não esqueço de que minha vida
É a maior empresa do mundo...
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
Se tornar um autor da própria história...
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar
Um oásis no recôndito da sua alma...
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um “Não”!!!
É ter segurança para receber uma crítica,
Mesmo que injusta...

Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

Aos meus pais

Aos meus irmãos, Artur e Rui

À minha avó

Ao Bernardo

A todos os meus

AGRADECIMENTOS

Iniciar uma Tese de Mestrado constitui tanto uma alegria como um desafio. Uma alegria, porque reflecte o fim de um percurso, de uma caminhada de cinco anos. Um desafio, porque é mais uma batalha que vamos vencer.

Há pessoas, no entanto, que tornam o desafio muito mais fácil, e, sendo assim, gostaria de agradecer a todas elas.

À minha orientadora, Professora Doutora Elisabete Machado, um grande obrigada pelo seu inesgotável entusiasmo, sabedoria, dedicação e paciência. Obrigada pela confiança depositada em mim, pela atenção despendida, pelos conselhos e críticas sempre com o intuito de melhorar a minha evolução, assim como o meu trabalho.

Gostaria de agradecer também a amizade, o apoio constante e a partilha de conhecimentos do técnico Ricardo Silva.

Aos meus pais, irmãos, avó Emília por me apoiarem sempre e por me terem proporcionado as condições necessárias para que chegasse ao fim desta etapa através da elaboração desta Dissertação.

Aos meus amigos e companheiros da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa que estiveram presentes durante os momentos de reflexão e intervalo do trabalho, sempre com uma palavra positiva, apontando para a concretização deste trabalho.

Aos meus amigos, por todos os momentos divertidos que passámos juntos.

Ao Bernardo, por toda a paciência, por todo o seu amor, por estar sempre disposto a ajudar-me em qualquer situação e por querer que eu chegue sempre mais longe.

E finalmente a Deus por me guiar...

Obrigada!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
I- Introdução	1
1 – Perspectiva geral da resistência aos antibióticos	1
1.1 – <i>Enterobacteriaceae</i> : importância clínica e resistência a antibióticos.....	3
2 – Antibióticos β -lactâmicos.....	4
2.1 – Características gerais	4
2.2 – Mecanismo de acção.....	5
2.3 – Mecanismo de resistência	7
2.4 – Origem da resistência aos antibióticos β -lactâmicos	9
3 – Beta-lactamases.....	10
3.1 – Generalidades	10
3.2 – As diversas classificações das β -lactamases.....	12
4 – β -lactamases de espectro alargado (ESBLs)	13
4.1 – Tipos de ESBLs	14
4.1.1 – TEM.....	15
4.1.2 – SHV	15
4.1.3 – CTX-M	16
4.1.4 – OXA	18
5 – Epidemiologia de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBLs	18
5.1 – Europa.....	20
5.2 – América do Norte, América Latina e América do Sul.....	21

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

5.3 – Ásia	21
5.4 – África	22
6 – Mecanismos de disseminação de genes <i>bla</i> _{ESBL} em <i>Enterobacteriaceae</i>	22
6.1 – Expansão clonal de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de ESBL	23
6.2 – Transferência horizontal de genes (THG) <i>bla</i> _{ESBL}	24
6.2.1 – Elementos genéticos móveis.....	24
6.2.1.1 – Plasmídeos	25
6.2.1.2 – Transposões	29
6.2.2 – Mecanismos de transferência horizontal de genes	30
6.2.2.1 – Conjugação	30
II – Objectivos	34
III – Material e Métodos	35
1 – Isolados bacterianos	35
2 – Avaliação da transferência de genes <i>bla</i> _{ESBL}	35
2.1 – Ensaio de conjugação	35
2.2 – Teste de duplo sinergismo	37
IV – Resultados e Discussão	38
V – Conclusão	51
VI – Referências bibliográficas	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – História da descoberta dos antibióticos e desenvolvimento concomitante da resistência aos antibióticos (adaptado de Davies e Davies, 2010)	2
Figura 2 – Estrutura básica dos quatro grupos de antibióticos β -lactâmicos (adaptado de Rang <i>et al.</i> , 2004)	5
Figura 3 – Local de actuação e mecanismo de permeação da parede celular de bactérias de Gram negativo pelos antibióticos β -lactâmicos (adaptado de Ferreira <i>et al.</i> , 2010)	6
Figura 4 – Principais mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em <i>Enterobacteriaceae</i> (adaptado de Nordmann <i>et al.</i> , 2012).....	7
Figura 5 – Estrutura cristalina de β -lactamases (adaptado de Perez <i>et al.</i> , 2007).....	11
Figura 6 – Aumento do número de publicações sobre a incidência de ESBLs ao longo dos anos (adaptado de Paterson e Bonomo, 2005).....	14
Figura 7 – Distribuição global das enzimas CTX-M (adaptado de Hawkey e Jones, 2009).....	17
Figura 8 – Factores que contribuem para a emergência, manutenção e disseminação das ESBLs do tipo CTX-M (adaptado de Cantón <i>et al.</i> , 2012)	17
Figura 9 – Mecanismos de emergência e disseminação da resistência a antibióticos em diferentes nichos ecológicos (adaptado de Davies e Davies, 2010).....	19
Figura 10 – Complexidade hierárquica dos genes <i>bla</i> _{CTX-M} dentro das estruturas genéticas e clones bacterianos participando na mobilização, disseminação e manutenção (adaptado de Cantón <i>et al.</i> , 2012).....	23
Figura 11 – Mecanismo de mobilização plasmídica (adaptado de Synder e Champness, 2003).....	28
Figura 12 – Mapa genético do factor F (factor de Fertilidade) (adaptado de Ferreira <i>et al.</i> , 2010).....	31
Figura 13 – Etapas da conjugação bacteriana (adaptado de Ferreira <i>et al.</i> , 2010)	32

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Percentagem de isolados com ensaios de conjugação positivos e negativos.....	38
Gráfico 2 – Percentagem de isolados com ensaios de conjugação positivos e negativos durante o estudo realizado no período 2002 - 2004 (Machado <i>et al.</i> , 2007)	39
Gráfico 3 – Distribuição da taxa de conjugação por espécie de <i>Enterobacteriaceae</i>	41
Gráfico 4 – Distribuição da taxa de conjugação por espécie de <i>Enterobacteriaceae</i> (2002-2004) (Machado <i>et al.</i> , 2007).....	42
Gráfico 5 – Distribuição da taxa de conjugação por tipos de ESBL	46
Gráfico 6 – Distribuição da taxa de conjugação por tipos de ESBL (2002-2004) (Machado <i>et al.</i> , 2007).....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

β	Beta
CLED	Meio de cistina, lactose e deficiente em electrólitos
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTX-M	Cefotaximase
DDST	<i>Double Disc Sinergy Test</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
<i>E. aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
ESBL	Beta- Lactamases de Espectro Alargado
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Factor F	Factor de fertilidade
In	Integrão
Inc	Incompatibilidade
IR	Sequências de Repetição Invertidas
IRT	Inhibitor-Resistant TEM
IS	Sequência de Inserção
ITU	Infecção do tracto urinário
kb	Kilobases
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>M. morganii</i>	<i>Morganella morganii</i>
MAC	MacConkey agar
MIR	<i>Miriam Hospital</i>
mL	Mililitro
Mob	Mobilizável
NAG	N-acetilglucosamina
NAMA	N-acetilmurâmico
OMPs	<i>Outer Membrane Proteins</i>
OXA	Oxacilinasas
PBPs	<i>Penicillin Binding Proteins</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
THG	Transferência horizontal de genes

I - INTRODUÇÃO

1- Perspectiva global da resistência aos antibióticos

Ao longo dos tempos sempre houve uma co-relação entre microrganismos e doenças infecciosas. O Homem desde sempre teve curiosidade em perceber a origem destas doenças e em procurar tratá-las, e por isso foi aperfeiçoando os seus conhecimentos nesta área (Namora, 1977). Exemplo de uma dessas investigações foi a desenvolvida por Alexander Fleming (1881-1955), médico e bacteriologista inglês, que descobre uma enzima natural que possui uma ação bactericida sobre as bactérias. Trata-se da lisozima, presente na saliva e nas lágrimas (Ferreira *et al.*, 2010).

Ainda Fleming, em 1928, ao trabalhar com culturas de *Staphylococcus aureus* observou que uma colónia de um fungo do género *Penicillium notatum* tinha crescido numa das placas de Petri contendo meio de cultura. Constatou também que este fungo impediu o crescimento das colónias bacterianas na sua proximidade. Fleming isolou o fungo em cultura pura e demonstrou que ele produzia e excretava uma substância antibacteriana à qual denominou penicilina (Rang *et al.*, 2004; Sousa, 2006). Estava assim descoberto o primeiro antibiótico, munido de propriedades antibacterianas (Sousa, 2006).

No final dos anos 40 e início dos anos 50, foram sendo introduzidos novos antibióticos. Relativamente ao termo antibiose (a vida impede a vida), este já tinha sido criado por Vuillemin em 1889 para designar o antagonismo entre os seres vivos em geral. Todavia, o termo antibiótico foi usado pela primeira vez em 1942 por Waksman, para designar substâncias produzidas por microrganismos que antagonizam o crescimento ou a vida de outros microrganismos (Dias *et al.*, 1990; Sousa, 2006), sendo esta a maior conquista médica e o “milagre científico da nossa era” (Dias *et al.*, 1990). A elevada morbidade e mortalidade provocada pelas doenças infecciosas mobilizou os cientistas na pesquisa de compostos naturais e de síntese química dotados de propriedades antimicrobianas. A descoberta dos antibióticos e a sua utilização no tratamento das doenças infecciosas constitui um dos maiores avanços da Medicina no século XX (Ferreira *et al.*, 2010). Neste sentido, os antibióticos são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, utilizadas para tratar infecções bacterianas e outras, destruindo ou detendo a reprodução dos

(<http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Paginas/AntibioticosResi.aspx>). Além disso, as doenças infecciosas são responsáveis a nível Europeu, por muitos milhões de pacientes hospitalizados por ano e cerca de dois milhões adquirem infecções hospitalares (Chopra *et al.*, 2008).

Actualmente, realizam-se investigações com o objectivo de garantir fármacos eficazes no combate às bactérias (e outros microrganismos) (Normark e Normark, 2002) e tem-se também tentado delinear acções para aprofundar o conhecimento sobre as relações entre a utilização dos antibióticos e a emergência de estirpes resistentes, com o intuito de minimizar as consequências clínicas, económicas e sociais. Estas acções têm conduzido, sobretudo, a uma racionalização da utilização dos antibióticos disponíveis, alicerçada num conhecimento da realidade epidemiológica (Caldeira *et al.*, 2002).

Para potenciar as capacidades dos antibióticos é necessário racionalizar o seu uso, evitando a utilização abusiva destes fármacos. É importante cumprir a duração e a dosagem adequadas ao tratamento, controlando também o uso de antibióticos na pecuária e na agricultura (<http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Paginas/AntibioticosResi.aspx>).

1.1 –*Enterobacteriaceae*: importância clínica e resistência a antibióticos

Uma das famílias bacterianas mais importantes na medicina humana é *Enterobacteriaceae*, sendo responsável por várias infecções, tanto no Homem, como no animal (Kayser *et al.*, 2005). Muitas das espécies pertencentes a esta família são agentes patogénicos fulcrais, possuindo vários factores de virulência, muitas vezes implicados em processos infecciosos tanto em instituições hospitalares como na comunidade, como por exemplo, infecções do tracto urinário (ITU), pneumonias e infecções intra-abdominais (Paterson, 2006).

A família *Enterobacteriaceae* inclui bacilos de Gram negativo quimiorganotróficos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, podendo ser móveis por flagelos peritricos ou imóveis. Os membros desta família são oxidase negativo, produtores de catalase, fermentam a glicose e reduzem os nitratos a nitritos (Pelczar *et al.*, 1980; Collee *et al.*,

1993; Ferreira e Sousa, 1998; Tortora *et al.*, 2003; Woerther *et al.*, 2010). Esta família inclui algumas espécies de bactérias que habitam o tracto intestinal do Homem e de outros animais, e outras que apresentam uma distribuição ubiquitária, podendo ser encontradas no solo, nas águas e nas plantas (Ferreira e Sousa, 1998; Paterson, 2006; Coque *et al.*, 2008; Lösch *et al.*, 2008). Muitas das espécies desta família também estão envolvidas em infecções como já referido anteriormente, destacando-se *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Cantón *et al.*, 2008; Falagas e Karageorgopoulos., 2009). Os antibióticos β -lactâmicos e as fluoroquinolonas constituem as principais escolhas terapêuticas para o tratamento das infecções provocadas por estes microrganismos (Ferreira e Sousa, 1998; Denton, 2007; Coque *et al.*, 2008; Coenen *et al.*, 2009), contudo rapidamente diversas bactérias patogénicas se tornaram resistentes a estas e outras classes de agentes antimicrobianos, devido principalmente à sua utilização indiscriminada no tratamento das infecções, tanto em hospitais como na comunidade (Sousa, 2006; Hawkey e Jones, 2009).

2- Antibióticos β -lactâmicos

2.1. – Características gerais

Os antibióticos β -lactâmicos integram o grupo de agentes antimicrobianos mais importante, com utilização terapêutica generalizada na clínica hospitalar e de ambulatório, devido à sua acção antimicrobiana, eficácia, espectro de acção e baixa toxicidade (Mascaretti, 2003; Rang *et al.*, 2004; Sousa, 2006).

Os antibióticos β -lactâmicos possuem um anel β -lactâmico, o qual dá o nome ao grupo, constituído por três átomos de carbono e um de nitrogénio, apresentando depois radicais substituintes, como pode ser observado na Figura 2 (Sousa, 2006). Neste grupo de antibióticos incluem-se as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactams e os carbapenems (Figura 2) (Georgopapadaku, 1993; Ferreira e Sousa, 1998; Poole, 2004; Livermore e Woodford, 2006).

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

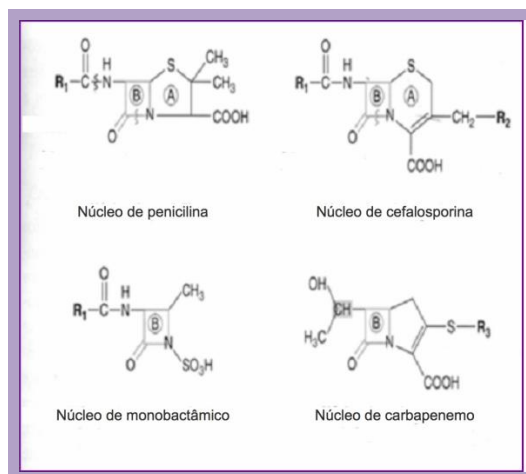


Figura 2 – Estrutura básica dos quatro grupos de antibióticos β -lactâmicos (adaptado de Rang *et al.*, 2004). O anel β -lactâmico está representado pela letra B.

O anel β -lactâmico encontra-se fundido com um anel tiazolidina nas penicilinas ou com um anel di-hidrotiazina nas cefalosporinas (Sousa e Prista, 1988; Sousa, 2006). O grupo dos carbapenemos exibe uma cadeia lateral hidroxietil associada ao anel β -lactâmico (Normark e Normark, 2002). Os monobactamos apresentam uma estrutura simples, isto é, uma estrutura monocíclica onde o anel β -lactâmico não está fundido com outro anel secundário (Marín e Gudiol, 2003).

Nas penicilinas e nas cefalosporinas observa-se a existência de radicais (R_1 , R_1 e R_2 , respectivamente), sendo que o tipo de radical presente modifica o espectro antibacteriano, podendo também alterar a farmacocinética do antibiótico (Sousa e Prista, 1988). Assim sendo, foram realizadas múltiplas tentativas de modificação destes antibióticos com o fim de melhorar o espectro antimicrobiano, a via de administração e/ou a farmacocinética (Sousa, 2006).

2.2. – Mecanismo de ação

Os β -lactâmicos estão incluídos no grupo dos antibióticos antiparietais, uma vez que têm ação na fase parietal da biossíntese do peptidoglicano, sendo este o principal constituinte da parede celular. É importante salientar que a biossíntese do peptidoglicano passa por três fases: a fase citoplasmática, a fase membranar e a fase parietal (Sousa, 2006). Na fase parietal da biossíntese do peptidoglicano, as ligações

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

covalentes entre N-acetilglucosamina (NAG) e o ácido N-acetilmurâmico (NAMA) da parede celular são quebradas por autolisinas, permitindo a inserção de unidades de NAG e NAMA recém-sintetizadas. Por outro lado, no folheto externo da membrana citoplasmática da célula bacteriana encontram-se também enzimas com funções biossintéticas (glicosiltransferases, transpeptidases e carboxipeptidases). Estas enzimas na fase parietal são essenciais para que ocorram as ligações interpeptídicas: primeiro é incorporado o precursor NAG-NAMA no peptidoglicano pré-formado, estabelecendo-se assim ligações glicosídicas β -(1,4) com o peptidoglicano já existente, e em seguida estabelecem-se ligações peptídicas entre o último resíduo de glicina e o 4º aminoácido da cadeia peptídica vizinha. Estas enzimas funcionam como os alvos dos antibióticos β -lactâmicos, sendo também designadas de PBPs (*Penicillin Binding Proteins*). Estes antibióticos atravessam a parede celular, como se pode analisar na Figura 3, e acilam os PBPs [impedindo a transpeptidação (*cross-linking*) entre as cadeias peptídicas vizinhas do peptidoglicano que está a ser sintetizado pelas bactérias em crescimento], o que requer a integridade do anel β -lactâmico. Desta forma, os antibióticos β -lactâmicos ligam-se aos PBPs conduzindo à paragem da síntese do peptidoglicano, que juntamente com a exacerbação das autolisinas bacterianas, conduz à lise celular (Ferreira e Sousa, 1998; Rang *et al.*, 2004).

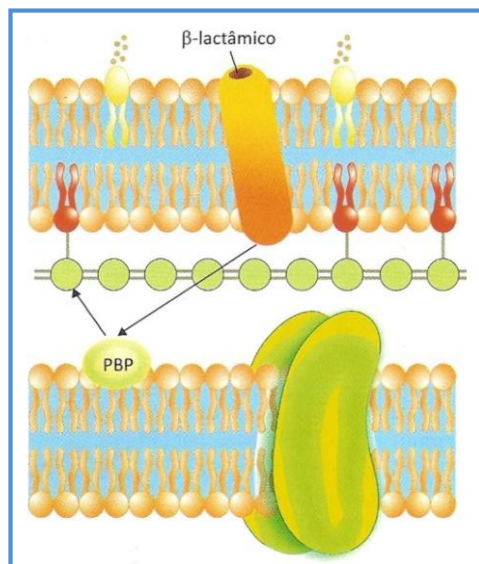


Figura 3 – Local de actuação e mecanismo de permeação da parede celular de bactérias de Gram negativo pelos antibióticos β -lactâmicos (adaptado de Ferreira *et al.*, 2010).

PBP - *Penicillin Binding Proteins*

2.3 – Mecanismos de resistência

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos pode ocorrer devido a modificações dos alvos (PBPs), impermeabilização da membrana externa das bactérias de Gram negativo, existência de bombas de efluxo ou hidrólise enzimática dos β -lactâmicos por β -lactamases (Sousa, 2006). Na Figura 4, são ilustrados os quatro principais mecanismos de resistência aos β -lactâmicos.

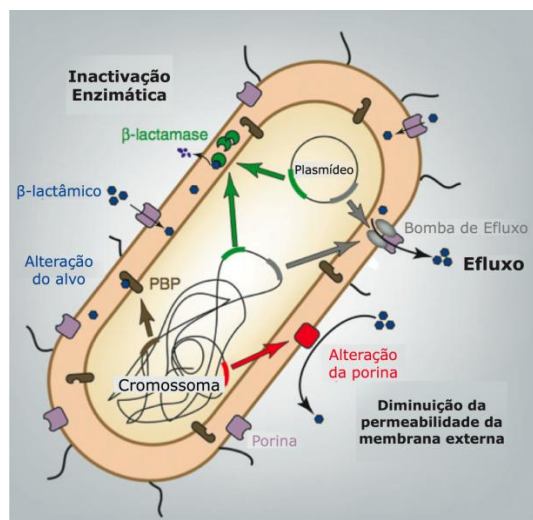


Figura 4 – Principais mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em *Enterobacteriaceae* (adaptado de Nordmann *et al.*, 2012) PBP - *Penicillin Binding Proteins*

ξ Modificação dos alvos (PBPs)

As alterações aminoacídicas nas enzimas que constituem o alvo do antibiótico, os PBPs, são um dos mecanismos através dos quais as bactérias se tornam resistentes aos antibióticos β -lactâmicos (Sousa, 1991). Este mecanismo de resistência não assume muita relevância, em termos quantitativos, em *Enterobacteriaceae* (Sousa e Prista, 1988). É, contudo, frequente em bactérias de Gram positivo (Georgopapadakou e Liu, 1980; Sousa e Prista, 1988; Georgopapadakou, 1993).

ξ Impermeabilização da membrana externa

Nas bactérias de Gram negativo, a membrana exterior da parede celular constitui uma barreira entre o antibiótico β -lactâmico e os seus alvos letais, que se localizam no folheto externo da membrana citoplasmática, sendo que o fluxo de certas moléculas

para o interior da célula é assegurado através de complexos de proteínas de membrana, denominadas OMPs (*Outer Membrane Proteins*), os quais formam canais de porina (Harbottle *et al.*, 2006). A carga, o peso molecular e a natureza hidrofílica influenciam a passagem dos antibióticos β -lactâmicos através dos canais de porina (Sousa e Prista, 1988; Harbottle *et al.*, 2006). Em *E. coli*, as OMPs mais comuns são OmpF, OmpC e OmpE, onde a perda de função destas proteínas por mutação pode efectivamente causar diminuição da susceptibilidade a vários antibióticos que passam nestes canais (Livermore, 2003; Nikaido, 2003; Harbottle *et al.*, 2006).

ξ Bombas de efluxo

As bactérias possuem bombas com funções biológicas as quais estão implicadas na expulsão de metabolitos, detergentes, açúcares, aminoácidos, pigmentos, entre outros, do periplasma/citoplasma para o exterior da célula bacteriana. Este mecanismo reduz assim a sua acumulação no interior da bactéria (Mahamound *et al.*, 2007). Porém, algumas bactérias ou usam essas mesmas bombas para expulsar antibióticos ou adquirem genes que levam à existência de bombas de efluxo específicas para expulsar certos antibióticos. A resistência mediada por bombas de efluxo é normalmente atribuída a mutações que podem ocorrer nos repressores transcricionais dos genes que codificam para as proteínas que constituem a bomba. As mutações que conduzem a resistência envolvem então a hiper-expressão de genes que codificam para a bomba de efluxo ou ainda a substituição de aminoácidos, o que faz com que a proteína de efluxo seja mais eficiente, exportando os antibióticos para fora da célula (Harbottle *et al.*, 2006). Este fenómeno tem sido encontrado em bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, podendo conduzir à resistência a uma variedade de antimicrobianos, incluindo β -lactâmicos (Rahall, 2009). Certas espécies da família *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *K. pneumoniae*, entre outras) apresentam bombas de efluxo com funções fisiológicas, podendo algumas delas ser responsáveis pela expulsão de antibióticos do periplasma/citoplasma para o exterior da célula bacteriana (Martínez *et al.*, 2009).

ξ Hidrólise enzimática dos β -lactâmicos por β -lactamases

O principal mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos observado em bactérias de Gram negativo é a produção de β -lactamases, que hidrolisam o anel β -lactâmico, inactivando-o (Livermore, 1995; Poole, 2004; Falagas e Karageorgopoulos,

2009). Existem dois mecanismos pelos quais as β -lactamases podem actuar: umas utilizam o zinco para romper directamente o anel β -lactâmico – metalo- β -lactamases; outras acilam os antibióticos β -lactâmicos e quebram a ligação amida do anel β -lactâmico – serina- β -lactamases (Livermore, 1995; Sousa, 2006).

As β -lactamases apresentam diferentes afinidades para as distintas classes de antibióticos β -lactâmicos, sendo classificadas segundo a sua especificidade em penicilinases, cefalosporinas e carbapenemas (Sousa, 2006). As β -lactamases são um grupo heterogéneo de enzimas, produzidas por diferentes espécies bacterianas, contudo uma espécie bacteriana específica pode produzir vários tipos de β -lactamases diferentes (Bradford, 2001; Sousa, 2006).

O desenvolvimento de novos compostos químicos β -lactâmicos, estáveis à acção das hidrolases bacterianas, contribuiu para o aparecimento de novas variantes por mutação da estrutura clássica da referida enzima, como consequência da pressão exercida pelos antibióticos β -lactâmicos. A introdução dos antibióticos de amplo espectro de acção (os oximino- β -lactâmicos), na terapêutica clínica para tratamento de infecções por *Enterobacteriaceae*, induziu a alteração das β -lactamases clássicas com o aparecimento e disseminação de novas β -lactamases, entre elas as β -lactamases de espectro alargado (ESBLs) (Bradford, 2001; Sousa, 2006; Baquero *et al.*, 2008).

2.4 – Origem da resistência aos antibióticos β -lactâmicos

A resistência bacteriana aos antibióticos pode ser natural (intrínseca) ou adquirida (Normark e Normark, 2002; Livermore, 2003; Harbottle *et al.*, 2006). A resistência natural é observada em todos os membros de determinada espécie, género ou família. Por exemplo, *Mycoplasma* sp. é sempre resistente a antibióticos β -lactâmicos devido à ausência do peptidoglicano (Normark e Normark., 2002; Marquez, 2005; Ferreira *et al.*, 2010). A resistência adquirida aos antibióticos tanto ocorre por mutações (deleções, inserções, entre outros) como por transferência horizontal de genes (Normark e Normark, 2002; Bennett, 2008). Esta resistência ocorre numa proporção variável de isolados de uma espécie, variando no tempo e no espaço (Harbottle *et al.*, 2006).

Em determinadas espécies da família *Enterobacteriaceae* verifica-se a existência da resistência natural a diversos antibióticos β -lactâmicos (Ferreira e Sousa, 1998). Assim, as bactérias do género *Enterobacter* sp. são naturalmente resistentes à cefoxitina (Cavallo *et al.*, 2008). A maioria das bactérias de Gram negativo são naturalmente resistentes à vancomicina e teicoplanina, isto porque a membrana exterior é impermeável às grandes moléculas de glicopéptidos (Arthur e Courvalin, 1993). No entanto, actualmente a resistência adquirida aos antibióticos β -lactâmicos é cada vez mais comum e principalmente mediada pela produção de β -lactamases (Paterson, 2006; Coque *et al.*, 2008), algumas delas representando uma grande ameaça entre os isolados bacterianos, destacando-se entre as *Enterobacteriaceae*, as β -lactamases de espectro alargado (ver secção 4), tendo sido observadas não só em quase todos os países Europeus (Cantón *et al.*, 2008), como também em outros continentes (Perez *et al.*, 2007).

3- Beta-lactamases

3.1 – Generalidades

As β -lactamases, enzimas que degradam antibióticos β -lactâmicos, estão entre os grupos mais heterogêneos de enzimas que conferem resistência a antibióticos. São proteínas globulares, compostas de alfa-hélices e de folhas beta-pregueadas, e apesar de possuírem uma variedade de aminoácidos diferentes, compartilham uma topologia global comum, tal como mostra a Figura 5 (Perez *et al.*, 2007).

As β -lactamases encontram-se no espaço periplasmático da parede celular das bactérias de Gram negativo, enquanto nas bactérias de Gram positivo são produzidas e excretadas para o meio exterior, podendo ser codificadas por genes de localização cromossómica ou plasmídica (Samaha-Kfoury e Araj, 2003; Sousa, 2006). A produção de β -lactamases pode ser constitutiva quando ocorre independentemente da presença do antimicrobiano, ou indutível quando determinados agentes antimicrobianos estimulam a produção da enzima pela bactéria (Livermore, 1995).

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

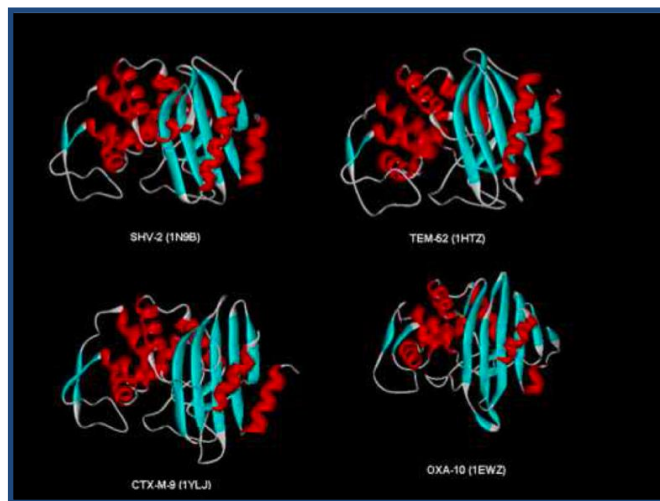


Figura 5 – Estrutura cristalina de β -lactamases (adaptado de Perez *et al.*, 2007).

As alfa-hélices destacam-se a vermelho e as folhas beta-pregueadas a azul. A proteína correspondente encontra-se entre parêntesis.

As beta-lactamases são denominadas de forma anárquica, de acordo com: o nome do doente em que foram identificadas (por exemplo TEM, identificada num isolado de *E. coli* da doente grega de nome Temoniera), o seu substrato (OXA, actividade hidrolítica sobre a oxacilina; CTX-M, actividade hidrolítica sobre a cefotaxima) ou o nome do hospital onde foram detectadas (MIR, Miriam Hospital) (Sousa, 2006).

A primeira β -lactamase foi descrita em 1940 por Abraham e Chain em *E. coli* (Sousa, 2006; Livermore, 2009). Poucos anos após a primeira identificação, as β -lactamases disseminaram-se por todo o mundo, e por diferentes membros da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, entre outras espécies (Bradford, 2001). Nas últimas décadas, novos antibióticos β -lactâmicos foram desenvolvidos, mas devido ao seu uso abusivo, novas β -lactamases têm emergido e disseminado. Por exemplo, as cefalosporinas de terceira geração começaram a ser usadas no tratamento de infecções provocadas por bacilos de Gram negativo, mas rapidamente surgiram mecanismos de resistência mediados por produção de novas variantes de β -lactamases, denominadas de β -lactamases de espectro alargado (ESBL, do inglês, *Extended-Spectrum β -Lactamases*), as quais possuem um amplo espectro de actividade, principalmente contra oximino-cefalosporinas (Bradford, 2001; Paterson e Bonomo, 2005). Também depois da introdução dos carbapenemos surgiram as

carbapenemases, primeiramente encontradas em *K. pneumoniae*, mas também identificadas em diversos bacilos de Gram negativo como *E. coli*, *Serratia marcescens*, entre outros.

3.2 – As diversas classificações das β -lactamases

A classificação e a nomenclatura das β -lactamases constituem um problema, uma vez que após a introdução de um novo antibiótico β -lactâmico na prática clínica, se foi observando o aparecimento de uma nova β -lactamase que o hidrolisava. Deste modo, o número de β -lactamases aumentou e tem aumentado continuamente, o que requer novas classificações e actualizações constantes, podendo ser consultadas em <http://www.lahey.org/Studies> (Bush, 1989).

Hoje em dia, as β -lactamases são frequentemente classificadas de acordo com dois esquemas: a classificação molecular de Ambler e a classificação funcional de Bush - Jacoby - Medeiros (que mais recentemente sofreu uma actualização) (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995; Thomson e Moland, 2000; Bush, 2001; Poole, 2004; Paterson e Bonomo, 2005; Bush e Jacoby, 2010).

O esquema de Ambler divide as β -lactamases em quatro classes principais – A, B, C e D. Este esquema de classificação baseia-se na homologia de proteínas. Neste esquema, as classes A, C e D incluem serino- β -lactamases (contêm serina no seu local activo), enquanto que na classe B se encontram as metalo- β -lactamases (contêm um ião zinco no local activo) (Philippon *et al.*, 1994; Livermore, 1995; Samaha-Kfoury e Araj, 2003; Poole, 2004; Paterson e Bonomo, 2005; Bush e Jacoby, 2010).

A classificação funcional de Bush - Jacoby - Medeiros, permite que as β -lactamases possam ser classificadas num grande número de grupos funcionais, segundo o seu espectro de acção hidrolítica sobre os diferentes β -lactâmicos e a resposta aos inibidores de β -Lactamases, baseando-se assim na similaridade funcional das enzimas incluídas nos grupos de Ambler. Esta classificação é mais útil para o médico ou para o microbiólogo que faz o diagnóstico laboratorial, visto considerar o comportamento frente a substratos e a inibidores das β -lactamases (ácido clavulânico, sulbactamo,

tazobactamo) (Paterson e Bonomo, 2005; Giske *et al.*, 2009). Nesta classificação, as β -lactamases são divididas em quatro grupos principais e vários subgrupos (Bush *et al.*, 1995; Thomson e Moland, 2000; Bush e Jacoby, 2010). No grupo 1 encontram-se as enzimas correlacionadas com a classe molecular C (Ambler) (cefalosporinas que não são inibidas pelo ácido clavulânico ou sulbactamo) (Bush e Jacoby, 2010). No grupo 2, as enzimas correlacionam-se com as classes A e D da classificação de Ambler (penicilinas, cefalosporinas, oxacilinas, carbapenemas e ESBLs, sensíveis à acção dos inibidores das β -lactamases) (Bush e Jacoby, 2010). O grupo 3 apresenta as únicas β -lactamases que pertencem à classe B de Ambler (metalo- β -lactamases, capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos, as quais são fracamente inibidas pelos inibidores clássicos, mas são inibidas pelo EDTA e *p*-cloromercuribenzoato) (Bush e Jacoby, 2010). Finalmente no grupo 4, encontram-se as penicilinas que não são inibidas pelo ácido clavulânico, não estando até ao momento englobadas em nenhuma classe molecular (Bush e Jacoby, 2010).

4 – β -lactamases de Espectro Alargado (ESBLs)

As ESBLs são β -lactamases que hidrolisam praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos, encontrando-se frequentemente em *Enterobacteriaceae* (Poole, 2004; Oteo *et al.*, 2006; Galas *et al.*, 2008). A maioria das ESBLs pertence à classe molecular A de Ambler (1980) e ao grupo 2be da classificação funcional de Bush - Jacoby - Medeiros (1995).

As ESBLs têm a particularidade de hidrolisar muitas cefalosporinas de largo espectro, como as oximino-cefalosporinas (por exemplo ceftazidima, ceftriaxona e cefotaxima) e os monobactams (aztreonam) (Jacoby e Han, 1996; Coudrnu *et al.*, 1997; Emery e Weymouth, 1997; Sousa, 2006; Delton, 2007). Estas não hidrolisam as cefamicinas (cefotetan e cefoxitina) nem os carbapenemos, no entanto, são inibidas pelo ácido clavulânico e por outros inibidores de β -lactamases, como o sulbactamo e o tazobactamo (Inoue *et al.*, 1995; Poole, 2004; Paterson e Bonomo, 2005; Paterson, 2006; Sousa, 2006; Coque *et al.*, 2008).

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

A Figura 6 mostra como as ESBLs têm vindo a emergir nas últimas décadas, tornando-se um problema crescente que dificulta o tratamento de infeções causadas pelas bactérias que as produzem. A sua aparição está relacionada com o uso excessivo das cefalosporinas de largo espectro e do aztreonamo (Gobernado, 2005).

Escherichia coli e *Klebsiella pneumoniae* são as espécies bacterianas mais comumente identificadas como produtoras de ESBLs (Cantón *et al.*, 2002; Moland *et al.*, 2002; Livermore *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2008; Falagas e Karageorgopoulos, 2009; Tansawai *et al.*, 2009; Chong *et al.*, 2011). No entanto, estas enzimas já foram observadas em diversas espécies de *Enterobacteriaceae* (Cormican *et al.*, 1996; Bradford, 2001; Hadziyannis *et al.*, 2000; Poole, 2004). Recentemente, foram também descritas ESBLs em *Pseudomonas* sp. e *Aeromonadaceae* (Livermore, 2009).

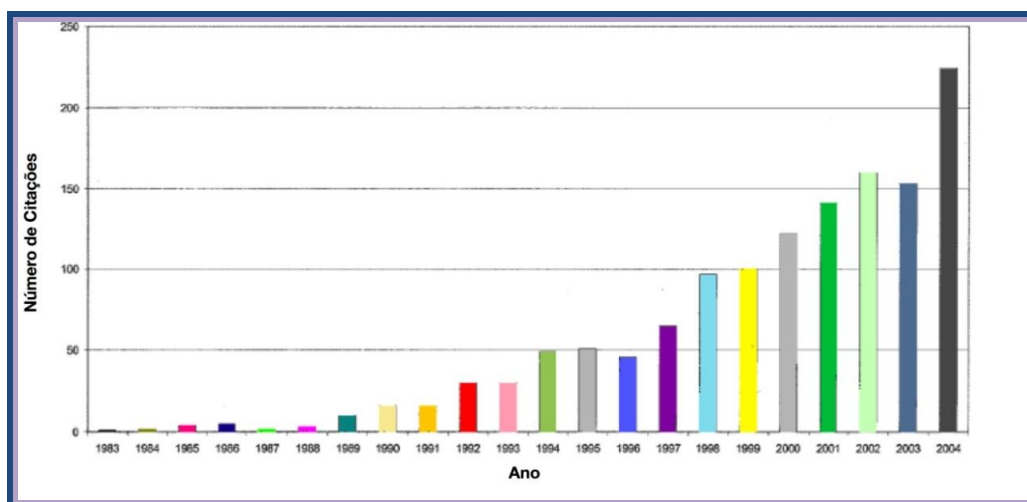


Figura 6- Aumento do número de publicações sobre a incidência das ESBLs ao longo dos anos (adaptado de Paterson e Bonomo, 2005).

4.1 – Tipos de ESBLs

As famílias de ESBLs mais prevalentes são do tipo TEM, SHV e CTX-M, embora existam descritas outras famílias em *Enterobacteriaceae*, como por exemplo, as PER, GES ou VEB, em diferentes regiões geográficas (Thomson e Moland, 2000; Bonnet, 2004; Hernández *et al.*, 2005; Paterson e Bonomo, 2005; Oteo *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2008; Pitout e Laupland, 2008; Pinto *et al.*, 2010).

4.1.1 – TEM

Das enzimas do tipo TEM, as primeiras a serem descritas foram TEM-1 e TEM-2, não sendo nenhuma delas considerada ESBL, pois não exibem actividade hidrolítica sobre as cefalosporinas de largo espectro. A enzima TEM-1 é a β -lactamase mais frequentemente detectada em bactérias de Gram negativo. Esta enzima foi a primeira β -lactamase mediada por plasmídeos a ser descrita neste grupo bacteriano, facto que favoreceu a sua rápida disseminação a nível global (Livermore, 1995). A primeira enzima do tipo TEM exibindo um fenótipo de ESBL foi a TEM-3. Embora as ESBLs do tipo TEM sejam encontradas com maior frequência em *E. coli* e *K. pneumoniae*, foram já detectadas em *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis* e também em *P. aeruginosa*, entre outras espécies (Bradford, 2001; Samaha-Kfoury e Araj, 2003; Gupta, 2007). Até ao momento foram descritas mais de 200 variantes diferentes de β -lactamases do tipo TEM, sendo a maioria do tipo ESBL e apresentando pontos isoeléctricos que vão desde 5.2 a 6.5. É de referir que foram descritas bactérias que produzem enzimas do tipo TEM resistentes aos inibidores de β -lactamases (IRT, *Inhibitor-Resistant TEM*), e que estas enzimas diferem de TEM-1 e TEM-2 pela substituição de 1, 2 ou 3 aminoácidos em diferentes posições (Poole, 2004).

4.1.2 – SHV

Em 1983, a primeira enzima do tipo SHV a ser descrita foi a SHV-1. Contudo, esta não é considerada ESBL pela mesma razão referida previamente para TEM-1 e TEM-2. A primeira ESBL do tipo SHV foi a SHV-2, descoberta em *Klebsiella ozaenae*. As ESBLs do tipo SHV podem hoje também ser encontradas em outras *Enterobacteriaceae*, como em *E. coli* e *Enterobacter* spp. (Bradford, 2001; Gupta, 2007). Foram descritas mais de 170 variantes alélicas, apresentando uma distribuição mundial (Bonnet, 2004).

4.1.3 – CTX-M

Na actualidade, as enzimas CTX-M constituem o grupo de ESBLs em ascensão e a sua disseminação global tem sido notória na última década (Bonnet, 2004; Cantón e Coque, 2006). A denominação CTX-M reflecte a potente actividade hidrolítica destas ESBLs frente à cefotaxima, embora algumas variantes também tenham grande actividade hidrolítica sobre a ceftazidima (Bauernfeind *et al.*, 1989; Bonnet, 2004; Harada *et al.*, 2008). Neste sentido, nos nossos dias, reconhecem-se mais de 140 variantes de β -lactamases CTX-M, as quais podem ser divididas em função da homologia da sequência de aminoácidos em cinco grupos denominados CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (Mendonça *et al.*, 2007; Pitout e Laupland, 2008; Falagas e Karageorgopoulos, 2009). As β -lactamases do tipo CTX-M estão extremamente relacionadas com as β -lactamases cromossómicas de distintas espécies do género *Kluyvera* sp., apontando para uma origem a partir destas bactérias largamente disseminadas no ambiente (Cantón e Coque, 2006; Cantón *et al.*, 2008). Os grupos CTX-M-1 e CTX-M-2 derivam de β -lactamases cromossómicas de *Kluyvera ascorbata* (Bonnet, 2004; Cantón e Coque, 2006; Livermore *et al.*, 2007), enquanto que os grupos CTX-M-8 e CTX-M-9 parecem ter uma origem em β -lactamases cromossómicas de *Kluyvera georgiana* (Bonnet, 2004; Paterson e Bonomo, 2005). Em termos filogenéticos, as enzimas CTX-M apresentam cerca de 40% de homologia com as β -lactamases TEM e SHV, sugerindo uma origem diferente para estas enzimas (Bradford, 2001; Paterson e Bonomo, 2005).

Hoje em dia, as enzimas CTX-M são mais prevalentes que as ESBLs do tipo TEM e SHV, observando-se um aumento exacerbado em *E. coli* e em pacientes da comunidade, sendo CTX-M-15 a ESBL mais disseminada pelo mundo tal como se pode observar na Figura 7, provavelmente devido a rearranjos genéticos bem sucedidos (o gene correspondente aparece normalmente associado à sequência de inserção *ISEcp1*) (Cantón e Coque, 2006; Mendonça *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2007), associados a plasmídeos epidémicos que albergam outros genes de resistência e/ou virulência, e/ou a clones epidémicos com características de virulência (Coque *et al.*, 2008; Ruppé, 2010).

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

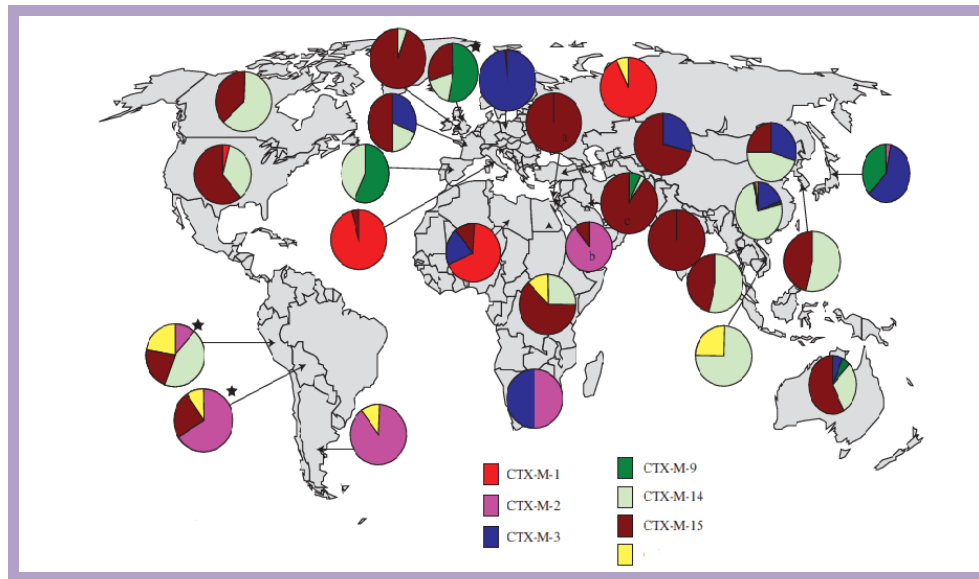


Figura 7 – Distribuição global das enzimas CTX-M (adaptado de Hawkey e Jones, 2009).

Desta forma, pensa-se que o sucesso da pandemia de CTX-M-15 esteja associado a clones de *E. coli* pertencentes ao grupo filogenético B2 (elevada virulência), bem como a plasmídeos contendo os genes *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1} e *aac(6')-Ib-cr* (Cantón e Coque, 2006; Machado *et al.*, 2006). Na Figura 8 são ilustrados os diferentes factores que suportam o surgimento, manutenção e disseminação das ESBLs do tipo CTX-M.

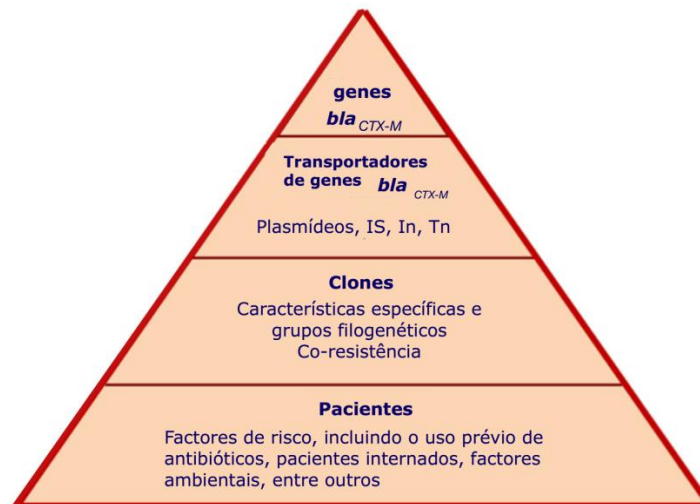


Figura 8 - Factores que contribuem para a emergência, manutenção e disseminação das ESBLs do tipo CTX-M (adaptado de Cantón *et al.*, 2012).

IS – Sequência de Inserção, In - Inserção, Tn – Transposição

4.1.4 – OXA

As β -lactamases OXA foram encontradas principalmente em *P. aeruginosa* (OXA-11, OXA-13) (Bradford, 2001; Sturenburg e Mack, 2003; Sousa, 2006; Harada *et al.*, 2008), mas também já foram descritas em *Enterobacteriaceae* (Naas e Nordmann, 1999; Gupta, 2007; Garcia *et al.*, 2010). As β -lactamases do tipo OXA (oxacilinas) apresentam uma elevada actividade hidrolítica frente à cloxacilina e oxacilina, e são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico (Paterson e Bonomo, 2005; Sousa, 2006). Algumas variantes OXA (por exemplo, OXA-1) são consideradas ESBLs uma vez que hidrolisam a cefotaxima, ceftriaxona e aztreonamo (embora em menor grau do que as ESBLs anteriormente referidas) originando uma redução da sensibilidade de muitos microrganismos a estes antibióticos (Paterson e Bonomo, 2005).

5 – Epidemiologia de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs

As *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs encontram-se distribuídas por todo o mundo e são frequentemente descritas nos hospitais. No entanto, têm sido cada vez mais detectadas em nichos particulares da comunidade, nomeadamente clínicas de reabilitação, lares de idosos (Rupp e Fey, 2003; Perez *et al.*, 2007; Coque *et al.*, 2008; Rodríguez-Baño *et al.*, 2009; Falagas e Karageorgopoulos, 2009), animais (porcos, galinhas, aves de rapina, cães, gatos, entre outros) (Carattoli *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2010; O’Keefe *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2010; Randall *et al.*, 2011; Dierikx *et al.*, 2012; Ewers *et al.*, 2012; Huber *et al.*, 2013), ambiente (Witte, 2000; Machado *et al.*, 2009), entre outros. Para isso têm contribuído a utilização excessiva de antibióticos β -lactâmicos, nomeadamente cefalosporinas de terceira geração, mas também de outros grupos, como as quinolonas e aminoglicosídeos, com o objectivo terapêutico ou para profilaxia de infecção (Bonnet, 2004; Paterson, 2006; Mendonça *et al.*, 2007). Os animais constituem importantes reservatórios de genes de resistência, particularmente de genes codificando para ESBLs, contribuindo para a entrada e disseminação na cadeia alimentar e no meio ambiente de espécies bacterianas produtoras de ESBLs e/ou genes *bla*_{ESBL} (Witte 2000; Bradford, 2001; Carattoli, 2008; Machado *et al.*, 2009). As diversas vias de transmissão de bactérias e genes de resistência aos antibióticos podem ser visualizadas na Figura 9, observando-se a

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

interação de diferentes formas dos diversos reservatórios de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs e/ou genes bla_{ESBL} .

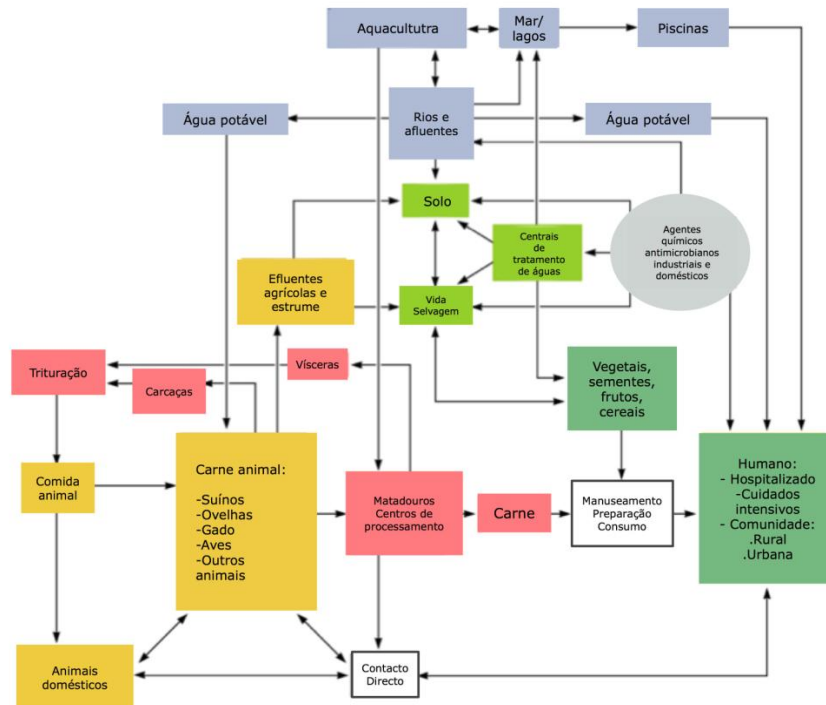


Figura 9- Mecanismos de emergência e disseminação da resistência a antibióticos em diferentes nichos ecológicos (adaptado de Davies e Davies, 2010).

A epidemiologia mundial de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs tem sofrido alterações ao longo dos anos. Na década de 80 e princípios dos anos 90, as principais ESBLs detectadas eram do tipo TEM e SHV (Cantón e Coque, 2006; Rodríguez-Baño *et al.*, 2009), e encontravam-se principalmente em clones epidémicos de *K. pneumoniae* envolvidos em infecções nosocomiais (Woodford *et al.*, 2004; Paterson e Bonomo, 2005; Livermore *et al.*, 2007). Hoje em dia, na maioria dos países, as ESBLs mais frequentemente identificadas são do tipo CTX-M, maioritariamente em *E. coli* de origem comunitária (Livermore *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2008). O seu êxito epidemiológico deve-se à presença de genes bla_{CTX-M} em elementos genéticos móveis (plasmídeos ou transposões), em integrões (García *et al.*, 2010) e/ou em certos clones bacterianos (Livermore *et al.*, 2007).

5.1- Europa

Na Europa existem várias diferenças geográficas relativamente à prevalência e distribuição de tipos de ESBLs em *Enterobacteriaceae*. As ESBLs mais frequentes na actualidade na Europa são TEM-4, TEM-24, TEM-52, SHV-12, CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-15 e CTX-M-32 (Diestra *et al.*, 2008; García *et al.*, 2010). A prevalência das ESBLs na Europa é mais alta do que nos Estados Unidos da América, mas mais baixa do que na Ásia e na América do Sul (Cantón *et al.*, 2008; Coque *et al.*, 2008, García *et al.*, 2010).

Relativamente à prevalência das CTX-M, a CTX-M-15 é a mais relatada na maioria dos países Europeus (Delton, 2007; Livermore *et al.*, 2007) e também em outras regiões do mundo (América do Norte e do Sul, África, Ásia) (Cantón e Coque, 2006). Os tipos CTX-M-1, CTX-M-15 e CTX-M-32 predominam em quase toda a Europa (Cantón *et al.*, 2008), enquanto que CTX-M-2 e CTX-M-3 são descritas principalmente na Europa Oriental (Edelstein *et al.*, 2003; Livermore *et al.*, 2007; Cantón *et al.*, 2008).

O novo cenário epidemiológico além de incluir o aumento do número de diferentes enzimas do tipo CTX-M, também inclui o reconhecimento de múltiplos clones e elementos genéticos que transportam genes *bla*_{CTX-M} (Cantón e Coque, 2006).

Relativamente ao nosso país, este é um dos países Europeus que apresenta maiores taxas de ESBLs (Bouchillon *et al.*, 2004), no entanto os estudos disponíveis a nível molecular sobre a epidemiologia de genes *bla*_{ESBL} em Portugal descrevem apenas a emergência de tipos particulares, a dispersão de clones específicos produtores de ESBLs ou a ocorrência de ESBLs em hospitais específicos por curtos períodos de tempo (Machado *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2007; Coque *et al.*, 2008;). Mesmo assim, o que se tem verificado é que a prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em Portugal tem aumentado ao longo dos anos, verificando-se que *K. pneumoniae* e *E. coli* são as espécies produtoras de ESBLs mais prevalentes (Machado *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2007; Mendonça *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2009).

5.2 - América do Norte e América do Sul

No Canadá e nos Estados Unidos, têm sido relatados casos de infecções provocadas por espécies produtoras de ESBLs do tipo SHV e CTX-M (Paterson e Bonomo, 2005).

Um estudo recente demonstrou que a taxa de produção de ESBLs foi maior entre os isolados de *K. pneumoniae* na América Latina, seguida pela Ásia/Pacífico, Europa e América do Norte (44.0%, 22.4%, 13.3% e 7.5%, respectivamente) (Falagas e Karageorgopoulos, 2009). Na mesma ordem de regiões geográficas foi observada a prevalência de ESBLs entre os isolados de *E. coli*, mas com taxas inferiores (13.5%, 12.0%, 7.6% e 2.2%) (Falagas e Karageorgopoulos, 2009). No Brasil, as ESBLs foram detectadas predominantemente em *Klebsiella* spp., sendo os genes *bla*_{SHV-5}, *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-9} os mais frequentes (Minarini *et al.*, 2007). Neste país, verificou-se também uma alta diversidade de enzimas do tipo CTX-M, principalmente entre isolados clínicos de *K. pneumoniae* e *E. coli* (Lopes *et al.*, 2010; Peirano *et al.*, 2011; Tollentino *et al.*, 2011). Em Buenos Aires (Argentina), a enzima CTX-M-2 foi encontrada em 75% dos isolados de *Enterobacteriaceae*, tornando-se claramente a ESBL mais predominante no país (Villegas *et al.*, 2008). No Peru e na Bolívia também foram relatados os genes *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-15} (Pallecchi *et al.*, 2004).

5.3 - Ásia

Na Ásia, a prevalência de estirpes produtoras de ESBLs em *Enterobacteriaceae* varia de país para país e de espécie para espécie. Pesquisas realizadas no continente Asiático indicaram a presença de ESBLs em 5% a 8% dos isolados de *E. coli* provenientes da Coreia, Japão, Malásia e Singapura e em 12% a 24% de *E. coli* da Tailândia, Filipinas, Taiwan e Indonésia (Paterson e Bonomo, 2005). As ESBLs do tipo SHV foram reportadas principalmente no Japão e Taiwan, enquanto que as CTX-M foram comuns na Índia, China e Japão (Paterson e Bonomo, 2005). Estudos realizados na China, revelaram taxas de produção de ESBL de 16% e 17% em *E. coli* e *K. pneumoniae*, respectivamente, sendo predominantes ESBLs do tipo CTX-M, onde o gene *bla*_{CTX-M-14} é o mais dominante (Ling *et al.*, 2006).

5.4.- África

A ocorrência de infecções provocadas por organismos produtores de ESBLs foi observada em alguns países Africanos (Rupp e Fey, 2003). Um dos países afetados foi a África do Sul onde foram relatados surtos de infecções por microrganismos portadores de genes *bla*_{ESBL}. Em 1998 e 1999, num único hospital, observou-se uma taxa de 36.1% de isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBLs. A caracterização das ESBLs revelou a presença de TEM e SHV (especialmente SHV-2 e SHV-5) (Paterson e Bonomo, 2005). Quanto à prevalência das CTX-M, CTX-M-15 foi a mais referida (Cantón e Coque, 2006).

6- Mecanismos de disseminação de genes *bla*_{ESBL} em *Enterobacteriaceae*

Segundo Coque *et al.*, o uso de antibióticos em excesso (tanto nos seres humanos como nos animais), a cadeia alimentar, a migração humana e a transferência de pacientes entre instituições de saúde, parecem ter contribuído para a disseminação de ESBLs (Coque *et al.*, 2008). Tipicamente, as ESBLs podem ser disseminadas por expansão clonal de estirpes bacterianas específicas ou por transferência horizontal de genes (através de plasmídeos, ou integrões, ou transposões albergando genes *bla*_{ESBL} e, mais raramente, por bacteriófagos) (Martínez e Baquero, 2002; Cantón *et al.*, 2003; Livermore, 2003; Oliver *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2008; Carattoli, 2009; Bortolaia *et al.*, 2010). Na Figura 10, é ilustrado o exemplo dos genes *bla*_{CTX-M}, altamente mobilizáveis em plataformas genéticas, incluindo os plasmídeos e os transposões, mas também são visíveis essas plataformas dentro de clones de sucesso (Cantón e Coque, 2006; Rogers *et al.*, 2011; Woodford *et al.*, 2011).

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

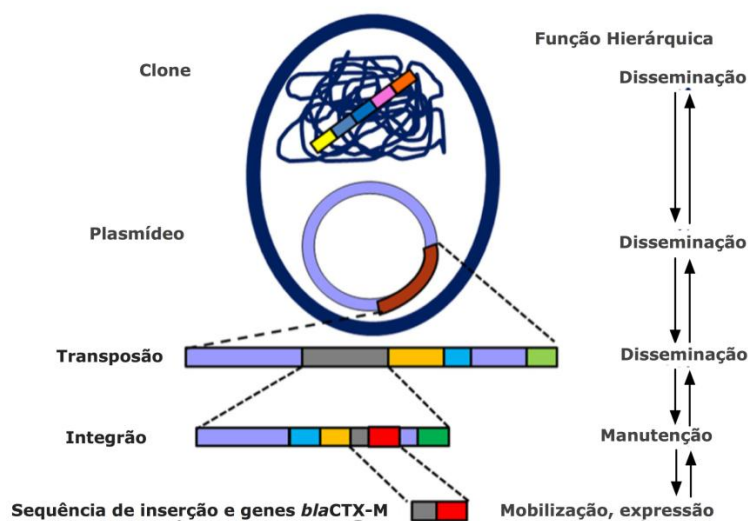


Figura 10 - Complexidade hierárquica dos genes *bla*_{CTX-M} dentro das estruturas genéticas e clones bacterianos que participam na sua mobilização, disseminação e manutenção (adaptado de Cantón *et al.*, 2012).

6.1– Expansão clonal de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs

Um dos principais factores envolvidos na prevalência actual de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL é a expansão clonal. A disseminação do clone de *E. coli* O25:H4-ST131 tem sido apontada como a principal responsável pela disseminação pandémica de CTX-M-15 (Woodford *et al.*, 2004; Oteo *et al.*, 2006; Coque *et al.*, 2008; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008; Rogers *et al.*, 2011). Este clone parece ter favorecido a expansão de CTX-M-15 no continente Europeu, tendo sido detectado na França, Grécia, Itália, Noruega, Espanha, Portugal, Suíça, Turquia e Reino Unido. O aparecimento deste clone também foi evidenciado noutros continentes (Woodford *et al.*, 2004; Lavollay *et al.*, 2006; Oteo *et al.*, 2006; Diestra *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2008; Yumuk *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2010; Peirano *et al.*, 2010; Peirano *et al.*, 2010).

Foram descritos outros exemplos representativos da expansão clonal associada à disseminação de ESBLs noutras espécies de *Enterobacteriaceae*, como é o caso de clones de *E. aerogenes* produtores de TEM-24 na Bélgica, França, Espanha e Portugal (Machado *et al.*, 2007; Coque *et al.*, 2008).

6.2- Transferência horizontal de genes (THG) *bla*_{ESBL}

A transferência horizontal de genes é uma importante ferramenta na adaptação de procariotas a um nicho específico, pois a aquisição de um conjunto de genes já preparado e melhorado aumenta a adaptabilidade destes organismos (Lawrence, 2002). Uma das mais fortes evidências da THG são as ilhas genômicas: os mesmos genes em distintos organismos, que apresentam a mesma função em diferentes contextos ecológicos. Estas podem ser classificadas em: i) ilhas de resistência a antibióticos - os organismos bacterianos podem adquirir genes de resistência aos antibióticos através da THG (de la Cruz *et al.*, 2000), sendo a sua transferência promovida por elementos genéticos móveis como plasmídeos, entre outros; e ii) ilhas de patogenicidade - são geralmente adquiridas em *clusters* tal como acontece com as ilhas de resistência a antibióticos, mas para além de vários genes de virulência, são encontrados também genes que codificam para integrases e transposases (Hentschel e Hacker, 2001).

A transferência horizontal de genes encontra-se dentro das forças geradoras de variabilidade, onde um organismo transfere material genético para outro que não é seu descendente. Sabe-se hoje que a disseminação de genes *bla*_{ESBL} é também facilitada pela sua presença em elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos conjugativos, transposões e/ou integrões (localizados em plasmídeos conjugativos ou transposões) (Cantón *et al.*, 2003; Chong *et al.*, 2011).

6.2.1 - Elementos genéticos móveis envolvidos na THG *bla*_{ESBL}

A THG é um processo que ocorre por intervenção de elementos genéticos móveis: plasmídeos, transposões e bacteriófagos. Os integrões são estruturas com capacidade de capturar genes sob a forma de *cassetes genéticas* e têm também sido associados à disseminação de algumas ESBLs (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{GES} e *bla*_{VEB}), mas não são dotados de mobilidade própria, pois não codificam as proteínas necessárias para a sua mobilização (têm de estar em plasmídeos ou transposões) (Sabaté *et al.*, 2002; Saladin *et al.*, 2002; Cantón *et al.*, 2003; Bennet, 2008). No caso dos bacteriófagos (vírus que infectam bactérias), em 2005 foi descrita pela primeira vez a disseminação de ESBLs do tipo CTX-M-10 através de bacteriófagos, mas são mais raramente associados à

disseminação de ESBLs (Oliver *et al.*, 2005). Embora as transposições e as sequências de inserção sejam importantes elementos de mobilização e disseminação de genes *bla*_{ESBL}, os plasmídeos têm desempenhado um papel mais relevante na disseminação destes genes (Coque *et al.*, 2008). Desta forma, apenas os plasmídeos serão abordados de seguida com maior destaque, sendo apenas feita uma breve referência às transposições.

6.2.1.1– Plasmídeos

Os plasmídeos são elementos genéticos extracromossômicos que apresentam um sistema de replicação próprio e autónomo (Waters, 1999; Ferreira e Sousa, 1998; Carattoli *et al.*, 2005; Carattoli, 2009). Estes têm a capacidade de transportar genes que conferem resistência para as classes mais importantes de antibióticos (incluindo β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, quinolonas, entre outros) (Carattoli, 2009), genes que codificam enzimas que degradam substratos orgânicos complexos, e genes que codificam para factores de virulência, entre outros (Waters, 1999; Rasooly e Rasooly, 1997; Smillie *et al.*, 2010). Os plasmídeos parecem estar envolvidos na diversidade genética bacteriana, apresentando capacidade de transferência para outros hospedeiros que poderão ser de estirpes diferentes, e até de espécies diferentes. Deste modo, permitem a aquisição e a perda de genes, que podem ser trocados horizontalmente por diferentes populações, por conjugação ou mobilização (Francia *et al.*, 2004; Thomas e Nielsen, 2005; Johnson *et al.*, 2007).

Os plasmídeos podem ser classificados em duas categorias de acordo com a sua mobilidade: conjugativos (auto-transferíveis) ou mobilizáveis (transferível apenas na presença de funções conjugativas adicionais) (Francia *et al.*, 2004; Llosa e de la Cruz, 2005; Smoravinska *et al.*, 2012). Os plasmídeos conjugativos transportam toda a maquinaria necessária para a sua auto-transferência (sistema de conjugação referido no ponto 6.2.2.1), enquanto que os plasmídeos mobilizáveis transportam apenas um gene *relaxase*, uma ou mais proteínas acessórias auxiliares e um componente *oriT*, não sendo capazes de se mobilizar de forma autónoma. Existem ainda os plasmídeos não-mobilizáveis, que não são incluídos na classificação dos plasmídeos uma vez que eles nem são conjugativos nem mobilizáveis, eles espalham-se por transformação natural ou transdução (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009; Smillie *et al.*, 2010).

A complexidade de organização genética dos plasmídeos aumenta com o tamanho. Os plasmídeos de maiores dimensões (peso molecular >30 kb), frequentemente conjugativos ou auto-transferíveis, apresentam uma replicação estritamente regulada, onde o número de cópias por célula é baixo, e têm a capacidade de transportar genes que codificam para a sua transferência (genes *tra*), englobando a síntese de pili sexual, elemento essencial à reunião de duas células, primeira etapa do processo de conjugação (Garcillán- Barcia *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2010; Smillie *et al.*, 2010). Os plasmídeos não-conjugativos, mas mobilizáveis (peso molecular <15 kb), possuem unicamente a informação para a sua auto-replicação e por terem baixo peso molecular só codificam resistência a uma ou duas famílias de antibióticos. Estes plasmídeos não são auto-transferíveis mas podem ser transferidos por outro plasmídeo auto-transferível partilhando a mesma célula (Garcillán- Barcia *et al.*, 2009; Smillie *et al.*, 2010).

Os **plasmídeos conjugativos** para além da propriedade de auto-replicação, necessitam de um sistema de controlo (sistema de partição) que garanta a distribuição das suas réplicas durante a divisão celular. O controlo de replicação e partição das cópias está codificado numa região específica que engloba o local onde se dá o início da replicação do plasmídeo (*oriV*). Deste modo, os plasmídeos que contêm o mesmo sistema de controlo de replicação não podem coexistir na mesma célula, são incompatíveis. Nesta base, dois plasmídeos pertencentes ao mesmo grupo Inc (incompatibilidade) não podem ser propagados na mesma linha celular (Datta e Hughes, 1983; Couturier *et al.*, 1988). Com base nesta propriedade, os plasmídeos foram classificados em grupos de incompatibilidade (Inc) (Novick, 1987; Kelly *et al.*, 2009; Carattoli, 2009; Ferreira *et al.*, 2010).

Este esquema Inc é baseado na introdução de um plasmídeo com um grupo Inc desconhecido, por conjugação ou transformação, numa estirpe transportando um plasmídeo com um grupo Inc conhecido. Se o plasmídeo residente é eliminado do progenitor, o plasmídeo desconhecido tem o mesmo grupo Inc que o plasmídeo residente (Datta e Hedges, 1971). Assim sendo, os plasmídeos com o mesmo mecanismo de replicação são incompatíveis e os plasmídeos com mecanismos de replicação diferentes são compatíveis. Portanto, dois plasmídeos pertencentes ao mesmo grupo Inc não podem proliferar na mesma linha celular (Datta e Hughes, 1983;

Couturier *et al.*, 1988; Carattoli *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2009). Este método tem sido uma importante ferramenta para seguir o desenvolvimento de plasmídeos conferindo resistência a antibióticos e também para seguir a evolução e disseminação de plasmídeos emergentes (Anderson *et al.*, 1977; Carattoli *et al.*, 2005).

Existem grupos Inc diferentes e os plasmídeos são normalmente classificados pelos seus grupos. Por exemplo, RP4 (também denominado RK3) é um plasmídeo IncP (Synder e Champness, 2003). Por outro lado, RSF1010 é um plasmídeo IncQ, podendo coexistir estavelmente com RP4, visto pertencerem a grupos Inc diferentes (Synder e Champness, 2003; Garcillán-Barcia *et al.*, 2011). Os plasmídeos IncN estão envolvidos na disseminação de resistência a múltiplos antibióticos em *Enterobacteriaceae*, enquanto que os plasmídeos IncP estão envolvidos na disseminação de vias catabólicas para os xenobióticos (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009). Os plasmídeos IncF são dos mais predominantes em *Enterobacteriaceae*, e frequentemente são responsáveis pela propagação de determinantes da resistência aos antibióticos (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009).

Os **plasmídeos mobilizáveis** são plasmídeos que não podem ser transferidos por si só, mas que podem ser transferidos por outros plasmídeos, e o processo pelo qual são transferidos é denominado de mobilização. Por razões históricas, os genes *tra* de um sistema Dtr [sistema responsável pela replicação dos plasmídeos e pelo processamento dos plasmídeos conjugativos para um componente de transferência intermediária (proteína – DNA conjugado)] de um plasmídeo mobilizável podem ser chamados de genes MOB, e a região requerida para a mobilização é denominada de região MOB (Synder e Champness, 2003). O sistema Dtr é um componente dos plasmídeos auto-transferíveis envolvido na preparação de DNA plasmídico, fazendo parte deste sistema várias proteínas como a *relaxase*, *relaxosome*, entre outras. Um plasmídeo contendo somente a sequência *oriT* de um plasmídeo auto-transferível pode ser mobilizado somente pelo sistema *tra* desse plasmídeo, e não por outro plasmídeo auto-transferível que não partilhe o mesmo local *oriT* (Synder e Champness, 2003).

O processo de mobilização de um plasmídeo por um plasmídeo auto-transferível é ilustrado na Figura 11. O processo é idêntico ao da transferência de plasmídeos auto-

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

transferíveis, excepto que o sistema Mpf (o sistema que mantém juntas as células dadora e receptora durante a conjugação, formando o canal pelo qual o DNA é transferido durante a conjugação) de um plasmídeo auto-transferível age não só no seu próprio sistema Dtr, mas também no sistema Dtr do plasmídeo mobilizável (Synder e Champness, 2003). O plasmídeo auto-transferível forma uma ponte com a célula receptora e comunica essa informação através da proteína de acoplamento, não só pela sua *relaxase*, mas também pela *relaxase* do plasmídeo mobilizável (Synder e Champness, 2003).

A relação filogenética entre as relaxases foi investigada, levando também a uma classificação dos plasmídeos mobilizáveis. Esta classificação inclui seis famílias MOB: MOB_F, MOB_H, MOB_Q, MOB_C, MOB_P e MOB_V. Esta classificação estende-se a toda a região de mobilidade, que inclui as proteínas acessórias auxiliares e as proteínas de acoplamento (Francia *et al.*, 2004; de la Cruz e Davies, 2000; Garcillán-Barcia *et al.*, 2011).

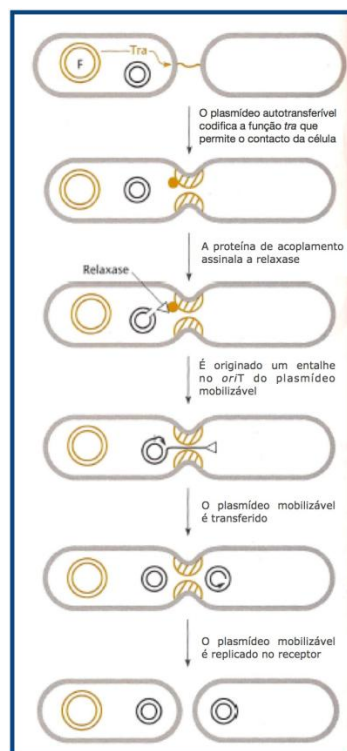


Figura 11 - Mecanismo de mobilização plasmídica (adaptado de Synder e Champness, 2003).

A célula dadora transporta dois plasmídeos, um auto-transferível, F, que codifica as funções *tra* que promovem o contacto com a célula receptora e a transferência plasmídica, e um plasmídeo mobilizável (a preto). As funções MOB codificadas pelo plasmídeo mobilizável fazem um corte no *oriT* na região MOB. Ocorre então a transferência e replicação do plasmídeo mobilizável.

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

Na disseminação de várias ESBLs (TEM, SHV, CTX-M e outras) encontram-se envolvidos diversos plasmídeos conjugativos (Cantón *et al.*, 2003; Carattoli, 2009; Zhao e Hu, 2013). Por exemplo, CTX-M-2 na Bélgica e em França associada ao plasmídeo IncHI2; CTX-M-14 em Espanha, Portugal, Reino Unido, entre outros países, associada ao plasmídeo IncK (Valverde *et al.*, 2009; Cottell *et al.*, 2011; Stokes *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2013); CTX-M-15 em Espanha, Portugal, Itália, França, entre outros países, associada ao plasmídeo IncFII (Carattoli *et al.*, 2008; Coque *et al.*, 2008; Gonullu *et al.*, 2008; Marcadé *et al.*, 2009; Peirano e Pitout, 2010; Partridge *et al.*, 2011); CTX-M-32 na região do Mediterrâneo associada ao plasmídeo IncN (Coque *et al.*, 2008; Novais *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2013); TEM-24 e TEM-52 na França, Bélgica, Portugal e Espanha, associadas aos plasmídeos IncA/C₂ e IncII, respectivamente (Machado *et al.*, 2007; Coque *et al.*, 2008; Novais *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2013).

Os plasmídeos contendo genes *bla*_{ESBL} são encontrados não só em *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar, mas também na flora comensal de humanos saudáveis, em animais e no ambiente (Witte, 2000; Machado *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2013).

6.2.1.2– Transposões

Existem segmentos de DNA móveis que podem saltar de um ponto para outro do genoma bacteriano levando consigo alguns genes adjacentes, de que resultam modificações na estrutura de DNA genómico. Os segmentos de DNA móveis são designados de transposões (Ferreira e Sousa, 1998).

Os transposões mais simples, denominados sequências de inserção (IS), contêm apenas um gene que codifica uma enzima (transposase) e os locais de reconhecimento. Estes locais de reconhecimento são sequências curtas invertidas de repetição (IR) de DNA, que a enzima reconhece como locais de recombinação entre o transposão e o cromossoma/plasmídeo (Tortora *et al.*, 2003; Bennet, 2008). Os transposões complexos transportam adicionalmente outros genes não relacionados com o processo de transposição, como por exemplo, genes de resistência a antibióticos (Murray *et al.*,

2006). Estes movem-se segundo uma unidade, podendo saltar do cromossoma para um plasmídeo ou vice-versa.

Os transposões conjugativos, tal como os plasmídeos, podem ter um largo espectro de hospedeiros e contribuem certamente para a ampla dispersão dos genes de resistência a antibióticos (Ferreira e Sousa, 1998), estando associados à disseminação de ESBLs, como é o caso do Tn21, Tn402 e Tn1213, que contêm os genes *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-M-9} e *bla*_{PER-1}, respectivamente (Poirel *et al.*, 2003; Novais *et al.*, 2006).

6.2.2 – Mecanismos de THG

As bactérias podem transferir material genético entre elas por meio de três mecanismos: transformação, transdução e conjugação (Gomis-Rüth e Coll, 2006; Smillie *et al.*, 2010). A transdução e a transformação são mecanismos de transferência genética incomuns em bactérias de Gram negativo. A primeira caracteriza-se por uma troca genética via bacteriófago e a segunda por transferência de DNA livre entre espécies compatíveis (Gomis-Rüth e Coll, 2006; Kelly *et al.*, 2009). O mecanismo mais comum pelo qual ocorre a transferência genética nas bactérias de Gram negativo é a conjugação. É por este mecanismo que os plasmídeos, os transposões e/ou os integrões (neles localizados) são principalmente disseminados (eventos de conjugação *in vivo* e *in vitro*/ensaios de conjugação). Desta forma, será este o mecanismo abordado de seguida.

6.2.2.1 – Conjugação

A conjugação é o mecanismo de THG mais frequente e também o mais eficiente uma vez que pode ocorrer não só entre microrganismos pertencentes à mesma espécie, mas também entre microrganismos filogeneticamente distantes. A conjugação é um processo de transferência de material genético, sendo na maioria dos casos mediado por um plasmídeo. As células bacterianas envolvidas no processo de conjugação geralmente devem ser de tipos opostos de acasalamento: as células dadoras (F^+) têm a capacidade para transferir genes, enquanto as células receptoras (F^-) usualmente não (Ferreira *et al.*, 2010).

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

Neste processo o DNA é passado directamente por um contacto célula-a-célula durante o acasalamento das bactérias. Ocorre uma transferência unidirecional de DNA da célula dadora para a célula receptora através do pili sexual (Murray *et al.*, 2006). Um dos elementos mais estudados, identificados em *E. coli*, é o factor F (factor de Fertilidade) (Prescott *et al.*, 2002), que possui um sistema de replicação autónomo, onde se situa a origem de replicação *oriV*, que possibilita o seu próprio controlo na replicação e partição durante a divisão celular. Possui ainda a sequência *oriT*, local onde ocorre o corte de uma das cadeias, etapa necessária para o início da replicação do elemento e simultaneamente para a sua transferência (Ferreira *et al.*, 2010). O factor F transporta também um conjunto de genes denominados *tra*, importantes para promover a transferência, tal como se pode observar na Figura 12.

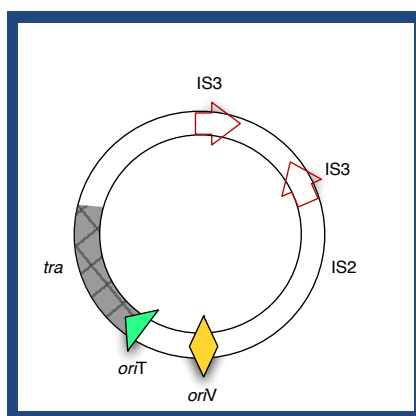


Figura 12 – Mapa genético do factor F (factor de Fertilidade) (adaptado de Ferreira *et al.*, 2010).

Na Figura 13 observa-se que as células dadoras que transportam o factor F (células F^+) transferem o plasmídeo às células receptoras (células F^-), originando células F^+ (com características da receptora e com genes da dadora). Depois desta transferência, o destinatário torna-se um transconjugante, possuindo capacidade para iniciar novos ciclos de conjugação (Gomis-Rüth e Coll, 2006).

Os sistemas de conjugação têm três componentes essenciais: o transferossoma (sistema de secreção tipo IV, T4SS, responsável pela síntese do pili conjugativo na célula dadora); o relaxossoma, um complexo de proteínas envolvidas no processamento do DNA e na clivagem de DNA num local chamado *oriT*; e a proteína de acoplamento, que

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

liga as duas entidades em conjunto (o relaxossoma ao transferossoma, formando um canal através do qual o DNA passa para a célula receptora) (Llosa e de la Cruz, 2005; Filutowicz *et al.*, 2008; de la Cruz e Davies, 2000). Assim, durante o processo de conjugação a clivagem de DNA no *oriT* é realizada por uma proteína designada de relaxase. Esta posteriormente liga-se covalentemente ao DNA *oriT*, sendo o complexo formado transportado para a célula receptora pelo sistema de secreção tipo IV. O DNA é activamente bombeado para a célula receptora pela proteína de acoplamento (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009).

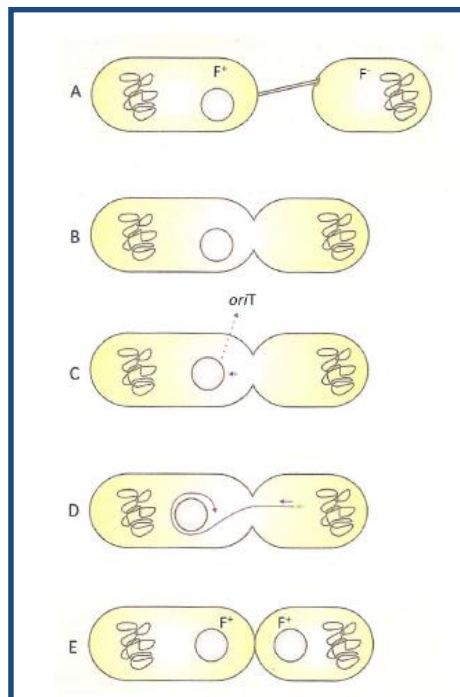


Figura 13 – Etapas da conjugação bacteriana (adaptado de Ferreira *et al.*, 2010).

Na etapa A verifica-se o reconhecimento da célula dadora e da célula receptora; na etapa B ocorre o contacto entre células com formação de um poro; em C ocorre o corte de uma das cadeias em *oriT*; na etapa D verifica-se a replicação do DNA plasmídico e posteriormente a transferência de cadeia simples para a célula receptora. Nesta etapa ainda ocorre a síntese da cadeia complementar; por fim, na etapa E, obtém-se um transconjugante contendo o plasmídeo funcional.

A conjugação pode ser explorada em laboratório para avaliar a transferência de plasmídeos (ou mesmo outros elementos genéticos móveis) codificando para a resistência a um ou mais agentes antimicrobianos de uma bactéria dadora (resistente ao antibiótico) para uma bactéria receptora (susceptível ao antibiótico). A técnica usada é simples: a bactéria dadora e uma estirpe bacteriana receptora são misturadas por um período de tempo e durante esse período de contacto o plasmídeo vai passar da célula

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

dadora para a célula receptora. É crítico evitar agitações da mistura durante esse período de tempo, dado que estas poderiam resultar na ruptura do contacto físico e impossibilitar a transferência completa dos plasmídeos. A eficiência do processo aumenta se for efectuado em filtro (0.45 μ m ou 0.2 μ m) e em meio nutritivo sem agentes selectivos, de forma a melhorar o crescimento da bactéria. O crescimento obtido é depois colocado num meio selectivo, onde somente a bactéria receptora que recebeu a informação genética (codificada no plasmídeo) para a propriedade desejada é capaz de crescer. Isto é crítico, porque somente uma quantidade pequena de células receptoras consegue receber da população dadora o plasmídeo funcional (Benedi *et al.*, 2000).

Este processo pode acontecer *in vivo*, pelo que a transferência conjugativa de DNA é um fenómeno chave que facilita a disseminação de genes de resistência aos antibióticos, incluindo os genes *bla*_{ESBL} (Cantón *et al.*, 2003; Filutowicz *et al.*, 2008).

II - OBJECTIVOS

A resistência das bactérias aos antimicrobianos é considerada um dos mais graves problemas mundiais nos hospitais, bem como na comunidade. Um dos mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos com maior impacto clínico é a produção de β -lactamases de espectro alargado (ESBLs). Tendo em conta tudo o que foi anteriormente referido, estudos epidemiológicos e de análise da localização plasmídica/transferibilidade de ESBLs assumem elevada relevância na adopção de medidas mais eficazes de controlo da sua disseminação.

Desta forma os objectivos deste estudo foram:

- Avaliar a frequência da dispersão de genes *bla*_{ESBL} por conjugação em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar de Portugal;
- Comparar a frequência de transferência por conjugação de diferentes tipos de genes *bla*_{ESBL}.

III – MATERIAL E MÉTODOS

1 – Isolados bacterianos

Foram incluídos no presente estudo 210 isolados de *Enterobacteriaceae* (147 *Escherichia coli*, 40 *Klebsiella pneumoniae*, 12 *Enterobacter cloacae*, 4 *Klebsiella oxytoca*, 3 *Proteus mirabilis*, 2 *Enterobacter aerogenes*, 1 *Serratia marcescens*, 1 *Morganella morganii*) previamente identificados como produtores de ESBLs do tipo TEM-10 (n=5), TEM-24 (n=1), TEM-52 (n=3), TEM-116 (n=2), TEM-199 (n=1), SHV-2 (n=1), SHV-5 (n=1), SHV-12 (n=19), SHV-145 (n=1), CTX-M-1 (n=3), CTX-M-14 (n=6), CTX-M-15 (n=84), TEM-116 + SHV-12 (n=3), TEM-116 + CTX-M-15 (n=3), TEM-116 + CTX-M-1 (n=1), TEM-10 + CTX-M-15 (n=1) ou de outras variantes não caracterizadas a nível molecular à data do presente estudo (n=75). Os isolados foram provenientes de dois hospitais Portugueses da região Centro (Hospitais B e C) (2006-2007) e um da região Norte (Hospital A) (2007), e pertencem a uma colecção que tem vindo a ser caracterizada no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

2 – Avaliação da transferência de genes *bla*_{ESBL}

2.1 - Ensaio de conjugação

A avaliação da transferência de genes *bla*_{ESBL} foi efectuada através de ensaios de conjugação em meio sólido, utilizando como estirpes receptoras *Escherichia coli* BM21R (resistente ao ácido nalidíxico e à rifampicina, fermentadora da lactose e sem plasmídeos) ou *E. coli* HB101 (resistente à estreptomicina, à gentamicina e à azida, não fermentadora da lactose e sem plasmídeos), esta última usada nos ensaios de conjugação de isolados bacterianos apresentando resistência à rifampicina. As estirpes receptoras utilizadas foram gentilmente cedidas pela Doutora Teresa Coque e pelo Prof. Doutor Rafael Cantón do Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid, Espanha).

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

As estirpes dadora e receptora foram semeadas em meio de CLED (Oxoid, Cambridge, Reino Unido) e incubadas durante 18-24h, a 37°C, em estufa de atmosfera aeróbia. Posteriormente, transferiu-se uma colónia de cada cultura bacteriana para tubos com 5mL de caldo Luria-Bertani (LB) (Oxoid, Cambridge, Reino Unido) e incubou-se durante 18-24h a 37°C, em atmosfera aeróbia. No dia seguinte, retirou-se 1mL da cultura líquida obtida e colocou-se num matraz contendo 50mL de caldo LB. Incubou-se durante 4h a 37°C, com agitação, de forma a obter culturas bacterianas em fase de crescimento exponencial.

Para a etapa de conjugação propriamente dita, que decorreu em meio sólido, misturou-se previamente num *ependorf* estéril 200 μ L da cultura líquida anterior da estirpe receptora e 100 μ L da cultura líquida anterior da estirpe dadora, e procedeu-se a uma mistura sob agitação (Coque *et al.*, 2008; Novais *et al.*, 2010). De seguida, colocou-se esta mistura no centro de uma placa de Muëller-Hinton agar (Oxoid, Cambridge, Reino Unido). Colocaram-se as placas a incubar a 37°C, durante 16 a 24h, de modo a promover possíveis trocas genéticas. Posteriormente, recolheu-se todo o crescimento bacteriano com zaragatoa e suspendeu-se o mesmo num tubo contendo 10mL de soro fisiológico estéril.

Para seleccionar os possíveis transconjugantes obtidos foram utilizadas placas contendo MacConkey agar (MAC) (Oxoid, Cambridge, Reino Unido) suplementado com cefotaxima (2mg/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) e rifampicina (100mg/L) (Fluka, Chicago, Estados Unidos), ou cefotaxima (2mg/L) e azida sódica (200mg/L) (Merck, Darmstadt, Alemanha), dependendo da estirpe receptora usada, nas quais se semearam por espalhamento (utilizando um espalhador de vidro) 100 μ L da suspensão obtida anteriormente. As placas foram incubadas a 37°C, 16 a 24h em atmosfera aeróbia. Quando ocorreu crescimento nas placas de selecção, efectuou-se a repicagem de 4 colónias (no máximo) para uma nova placa de selecção, de forma a confirmar a presença de isolados resistentes aos antibióticos incluídos na placa correspondente (possíveis transconjugantes).

De referir que previamente a todo este processo foi feito um controlo do crescimento bacteriano nos meios contendo antibióticos que foram usados para selecção dos

transconjugantes. Para isso, semearam-se as bactérias dadoras e a bactéria receptora nas placas contendo meio de MacConkey agar suplementado com cefotaxima, rifampicina, ou cefotaxima e rifampicina. Para que as bactérias dadoras seguissem no processo de conjugação era necessário que crescessem nos meios de MacConkey agar contendo cefotaxima e não crescessem em meio contendo rifampicina. No caso da bactéria receptora, esta apenas deveria crescer em meio de MacConkey agar suplementado com rifampicina. Se as bactérias dadoras apresentassem crescimento nas placas com MacConkey agar contendo rifampicina, então teria de se optar por outra receptora (*E. coli* HB101), substituindo-se a rifampicina usada nos meios anteriores por azida sódica e seguindo-se o mesmo tipo de controlo de crescimento nos meios referido anteriormente.

2.2 - Teste de duplo sinergismo

A confirmação da transferência por conjugação de genes *bla*_{ESBL} foi efectuada através do teste de duplo sinergismo (DDST, *Double Disc Sinergy Test*), utilizando um disco de amoxicilina e ácido clavulânico (30 μ g) colocado ao centro e a uma distância de 20 mm (de centro a centro) de dois dos seguintes discos de antibióticos: cefotaxima (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), cefepime (30 μ g) ou aztreonamo (30 μ g) (Jarlier *et al.*, 1988).

Este teste realizou-se segundo as normas do CLSI (CLSI, 2007) para a avaliação da susceptibilidade a antibióticos pelo método de difusão em agar. Inicialmente foi efectuada uma suspensão bacteriana ajustada a 0.5 unidades na escala de McFarland, em tubos contendo soro fisiológico estéril, a qual posteriormente foi semeada numa placa contendo Muëller-Hinton agar (Sousa *et al.*, 2005). Sobre esta placa foram colocados os 3 discos com antibióticos contendo concentrações definidas pelas normas CLSI, sendo dispostos como referido anteriormente. As placas posteriormente foram incubadas a 37°C durante 18-24 horas (Phillippon *et al.*, 1989). Considerou-se o teste do duplo sinergismo positivo quando se observou uma ampliação do halo de inibição de cefotaxima, ceftazidima, cefepime e/ou aztreonamo na zona de intersecção com o halo de inibição observado para o disco de amoxicilina e ácido clavulânico. Quando se observou este fenómeno, considerou-se tratar de bactérias produtoras de ESBLs (transconjugantes) e que portanto houve sucesso na conjugação de genes *bla*_{ESBL}.

IV – RESULTADOS e DISCUSSÃO

1 – Transferência de genes *bla*_{ESBL} por conjugação

Os ensaios de conjugação foram efectuados em 210 bactérias da família *Enterobacteriaceae*, tendo-se verificado a transferência de genes *bla*_{ESBL} em 98 desses isolados (o que corresponde a uma taxa de conjugação de 47%) (Gráfico 1). Todos estes 98 isolados conjugaram com a estirpe receptora *E. coli* BM21NR, não se observando nenhum ensaio de conjugação positivo quando houve necessidade de usar a estirpe receptora *E. coli* HB101.

A transferência de genes *bla*_{ESBL} por conjugação foi observada em *E. coli* (n=84), *K. pneumoniae* (n=8), *P. mirabilis* (n=2), *E. cloacae* (n=1), *K. oxytoca* (n=1), *E. aerogenes* (n=1) e *M. morgani* (n=1).

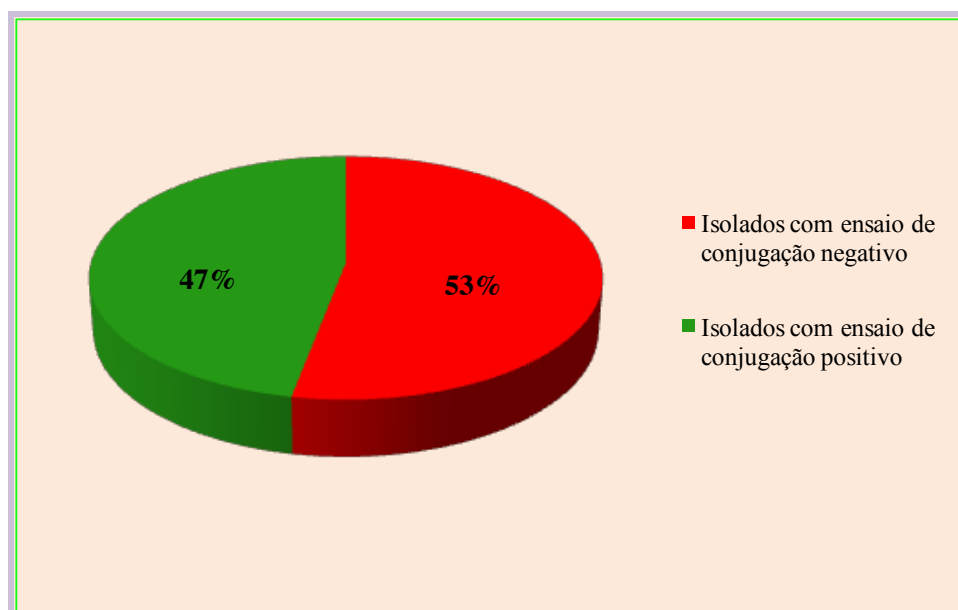


Gráfico 1 – Percentagem de isolados com ensaios de conjugação positivos e negativos.

Comparando o presente estudo com outro efectuado também em Portugal durante o período de 2002-2004 (Machado *et al.*, 2007), verifica-se que a transferibilidade de

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

genes bla_{ESBL} por conjugação foi inferior (47% versus 67%, respectivamente) como se pode observar no Gráfico 2.

Num outro estudo realizado por Coque *et al.* (2002) num hospital em Madrid verificou-se a transferência de genes bla_{ESBL} em 28 dos 35 isolados testados (o que corresponde a uma taxa de conjugação de 81%).

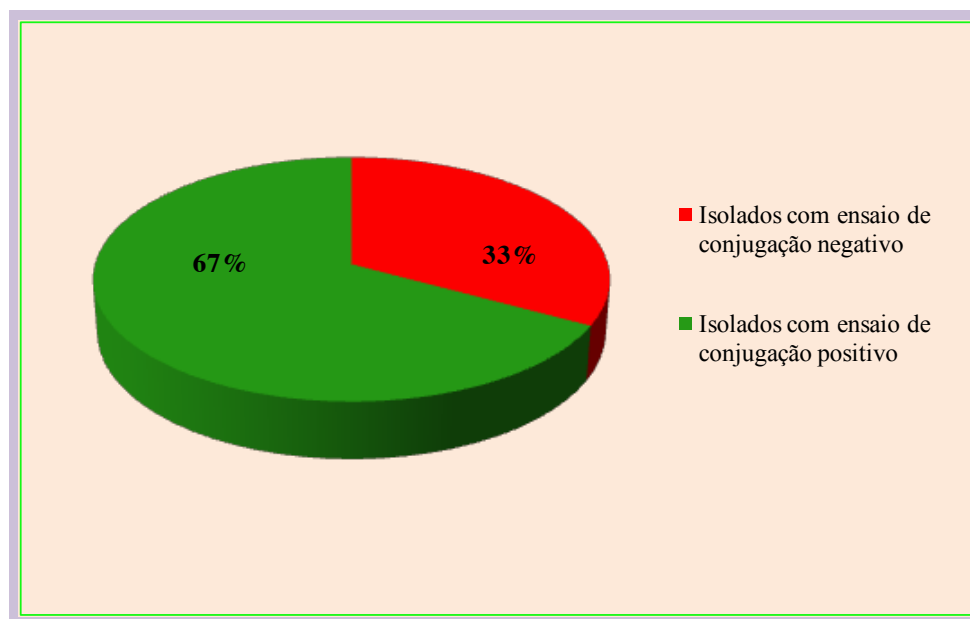


Gráfico 2 – Percentagem de isolados com ensaios de conjugação positivos e negativos durante o estudo realizado no período 2002-2004 (Machado *et al.*, 2007).

Desta forma, pode-se observar que existem diferenças nas percentagens de conjugação, quer comparando os resultados obtidos no presente estudo com o efectuado por Machado *et al.* (2007), quer com o trabalho de Coque *et al.* (2002). Uma das justificações para esta diferença poderá residir no facto do número de isolados avaliados não ser igual nos três estudos (n=210, n=180, n=35, respectivamente), assim como o número de espécies e tipos de ESBLs produzidas por esses mesmos isolados.

Por outro lado, devido ao curto período de tempo para o desenvolvimento da parte experimental deste trabalho, apenas foi possível a realização de um ensaio de conjugação por isolado. Mas para se obterem resultados mais conclusivos dever-se-ão,

no futuro, realizar mais dois ensaios de conjugação, totalizando, assim, 3 ensaios por isolado bacteriano, tal como referido nos estudos de Dionisio *et al.*, (2002) e de Molbak (2003). Outro aspecto que poderá ser alterado para averiguar se a taxa de conjugação aumenta, é colher bactérias de duas ou três colónias de cultura pura do microrganismo a testar para os ensaios de conjugação, tal como efectuado nos trabalhos de Moreira (2009) e Sá (2009) realizados em *Enterococcus* sp.. Desta forma, poderá haver uma maior probabilidade de se repicarem colónias correspondentes a populações bacterianas contendo plasmídeos com genes bla_{ESBL} e/ou com maior capacidade de transferência de genes bla_{ESBL} por conjugação. Finalmente, avaliar o sucesso da conjugação a outras temperaturas (por exemplo, 22°C) e ainda efectuar ensaios de conjugação em filtro nos isolados bacterianos com resultado negativo nos ensaios realizados, visto que esta metodologia poderá aumentar a taxa de conjugação (Dionisio *et al.*, 2002), devido às condições de conjugação serem potencialmente óptimas, dada a utilização de uma alta densidade de células (Molbak, 2003). Na conjugação em filtro os primeiros passos são semelhantes aos que foram efectuados neste estudo, contudo neste processo é necessário usar um filtro de membrana de celulose (0.45 μ m ou 0.2 μ m de diâmetro de poro) que é colocado numa placa de meio de cultura e sobre o qual se distribuem as culturas bacterianas (Werner *et al.*, 2011).

2- Distribuição da taxa de conjugação por espécie

De entre as *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, *E. coli* foi a espécie incluída no estudo onde mais frequentemente se observou a transferência por conjugação de genes bla_{ESBL} , apresentando uma taxa de conjugação de 57% (n=84/147) tal como se pode observar no Gráfico 3.

K. pneumoniae foi a segunda espécie que apresentou uma maior taxa de conjugação, com um valor de 20% (n=8/40), seguindo-se a espécie *E. cloacae* com uma taxa de conjugação de 8% (n=1/12). É de salientar que o grupo que forma as outras espécies de *Enterobacteriaceae* também possui uma taxa de conjugação significativa (45%, n=5/11) (Gráfico 3). Contudo, as espécies que englobam este grupo, quando separadas, não assumem muita importância, isto porque o número de isolados que foi incluído nos ensaios não foi significativo (1 ou 2 isolados), pelo que para tirar conclusões mais

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

relevantes teriam de se efectuar ensaios com um maior número de isolados dessas mesmas espécies.

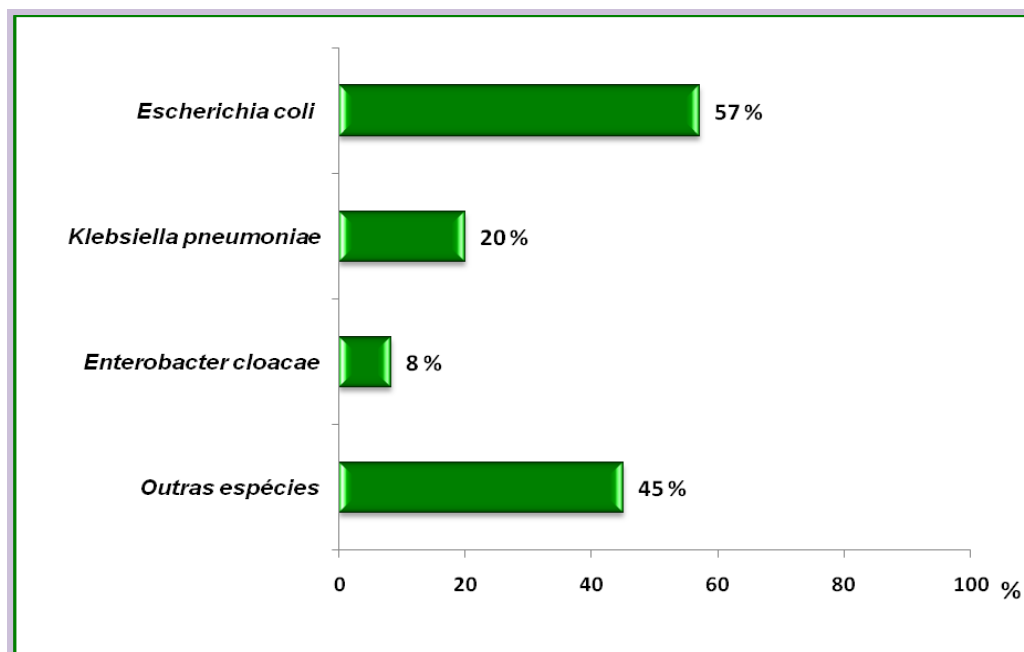


Gráfico 3 – Distribuição da taxa de conjugação por espécies de *Enterobacteriaceae*.

(*) Outras espécies (número de transconjugantes obtidos/número de isolados testados): *K. oxytoca* (n=1/4), *P. mirabilis* (n=2/3), *E. aerogenes* (n=1/2), *M. morgani* (n=1/1) e *S. marcescens* (n=0/1).

Comparando o presente trabalho, com o realizado por Machado *et al.* em 2007 (Gráfico 4), verificou-se que *E. coli* apresenta uma taxa de conjugação semelhante nos dois estudos (57% versus 59%, respectivamente).

Isto também se deve ao facto de tanto num estudo como no outro a espécie *E. coli* produzir maioritariamente o mesmo tipo de ESBLs (TEM-52, CTX-M-1, CTX-M-14 e CTX-M-15), verificando-se assim pequenas diferenças entre os dois estudos. No presente estudo, foram incluídos isolados de *E. coli* produtores das seguintes ESBLs (número de isolados transferindo o gene bla_{ESBL} por conjugação/número de isolados testados possuindo o gene bla_{ESBL} é indicado entre parêntesis): TEM-52 (n=2/3), SHV - 12 (n=1/5), CTX-M-1 (n=1/3), CTX-M-14 (n=5/6), CTX-M-15 (n=41/79), TEM-10 + CTX-M-15 (n=1/1), TEM-116 + CTX-M-1 (n=1/1), TEM-116 + CTX-M-15 (n=2/3) e outras ESBLs (n=30/46). Nos ensaios de conjugação efectuados no estudo de Machado

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

et al. (2007), para além das ESBLs do tipo TEM-52 (n=9/9), CTX-M-1 (n=1/1), CTX-M-14 (n=4/4) e CTX-M-15 (n=4/17), foram também incluídos isolados de *E. coli* produtores de TEM-24 (n=4/4), TEM-154 (n=0/1) e outras ESBLs (n=0/1).

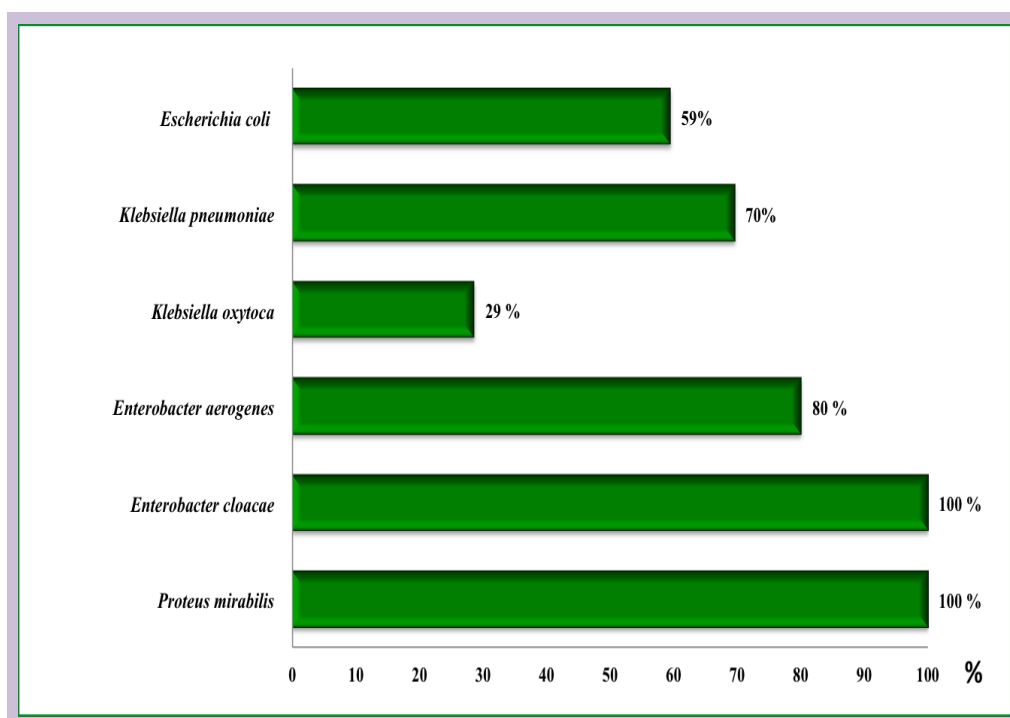


Gráfico 4 – Distribuição da taxa de conjugação por espécies de *Enterobacteriaceae* (2002-2004) (Machado *et al.*, 2007).

Relativamente à espécie *K. pneumoniae*, obteve-se um valor significativamente inferior na taxa de conjugação comparativamente ao observado no estudo feito por Machado *et al.* (2007). No estudo de 2002-2004, *K. pneumoniae* apresentava uma taxa de conjugação de 70% (n=32/46), enquanto no presente estudo apenas se obteve uma taxa de conjugação de 20% (n=8/40). Analisando estas diferenças constata-se que o tipo de ESBLs presente nesta espécie nos dois estudos não é igual, sendo que no presente trabalho os tipos de ESBLs mais predominantes foram (número de isolados transferindo o gene bla_{ESBL} por conjugação/número de isolados testados possuindo o gene bla_{ESBL} é indicado entre parêntesis): SHV-12 (n=3/9), TEM-10 (n=2/3) e outras ESBLs não caracterizadas genotipicamente (n=2/22), apresentando também TEM-24 (n=0/1), TEM-116 (n=0/1), SHV-2 (n=0/1), SHV-5 (n=1/1), SHV-145 (n=0/1) e CTX-M-15 (n=0/1).

No entanto, no estudo de Machado *et al.* (2007), TEM-24 (n=11/13), SHV-5 (n=6/6), SHV-12 (n=5/6) e SHV-90 (n=5/6) destacaram-se nesta espécie. Contudo, entre os 46 isolados de *K. pneumoniae* do estudo anterior também existiam ESBLs do tipo TEM-12 (n=1/1), TEM-52 (n=1/1), TEM-116 (n=1/3), SHV-2 (n=1/2), SHV-55 (n=0/4), SHV-99 (n=0/1), CTX-M-15 (n=1/2) e GES-1 (n=0/1). Desta forma, observa-se que nesta espécie é notória a diferença dos tipos de ESBLs predominantes nos dois estudos, facto que não acontecia na espécie anterior (*E. coli*). Observou-se também uma menor diversidade de tipos de ESBLs no presente estudo, o que pode justificar assim a diferença nos resultados obtidos. Isto porque os tipos de ESBLs mais frequentes nesta espécie, tanto num estudo como no outro, poderão estar contidos em plasmídeos pertencendo a grupos de incompatibilidade distintos, podendo ser mais facilmente dissemináveis entre bactérias ou, então, não apresentarem tanta facilidade nessa disseminação, correspondendo aos *broad-host range plasmids* (por exemplo, IncA/C, IncN, IncQ, IncP, IncL/M) (Götz *et al.*, 1996; Sakai e Komano, 1996; Scott *et al.*, 2003; Dermanne *et al.*, 2005; Lavollay *et al.*, 2006; Novais *et al.*, 2006; Novais *et al.*, 2007; O'Sullivan *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2010; Kakirde *et al.*, 2011; Bartosik *et al.*, 2012) ou aos *narrow-host range plasmids* (IncHI1, IncHI2, IncI1, IncF, entre outros) (Cantón e Coque, 2006; Lavollay *et al.*, 2006; Novais *et al.*, 2007; Coque *et al.*, 2008; Carattoli, 2009; Marcadé *et al.*, 2009; Valverde *et al.*, 2009; Carattoli, 2011). Os primeiros encontram-se mais associados às ESBLs do tipo TEM-24, SHV-2, SHV-12 e CTX-M-1, e os segundos às ESBLs CTX-M-14, CTX-M-15, entre outras (Pukall *et al.*, 1996; Novais *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2010). Os *broad-host range plasmids* além de estarem envolvidos na propagação rápida de múltiplos determinantes de resistência a antibióticos, deslocam-se e expandem-se numa gama de hospedeiros muito ampla a longo prazo e, assim, persistem mais tempo em diferentes espécies bacterianas (De Gelder *et al.*, 2008). Por outro lado, os *narrow-host range plasmids* constituem a maioria dos plasmídeos identificados até agora e parecem possuir um papel na transferência horizontal de genes limitado a espécies estreitamente relacionadas (Smorawinska *et al.*, 2012).

Na espécie *E. cloacae* verificou-se que no presente estudo esta apresentou uma taxa de conjugação de 8% (n=1/12), enquanto a mesma espécie no estudo de Machado *et al.* (2007) apresentava uma taxa de conjugação de 100% (n=3/3). Esta diferença poderá

estar relacionada com o facto de no estudo anterior apenas existirem 3 isolados (2 SHV-12; 1 TEM-10), todos eles transferindo a enzima por conjugação. Para além disso, no presente estudo observou-se uma maior variabilidade de ESBLs (número de transconjugantes obtidos/número de isolados testados): SHV-12 (n=1/4), CTX-M-15 (n=0/1), TEM-116 + SHV-2 (n=0/3) e ESBLs não caracterizadas genotipicamente (n=0/4).

No que concerne às outras espécies verificou-se que algumas possuíam ESBLs diferentes das descritas no trabalho anterior [por exemplo, TEM-10 (n=1/1) *versus* TEM-24 (n=1/1) e SHV-12 (n=0/1) *versus* SHV-5 (n=1/2) em *K. oxytoca*; ESBLs não caracterizadas genotipicamente (n=1/2) *versus* TEM-24 (n=8/8) em *E. aerogenes*; TEM-199 (n=1/1) e CTX-M-15 (n=1/2) *versus* TEM-24 (n=6/6) em *P. mirabilis*]; outras não estavam aí representadas [TEM-10 (n=0/1) em *S. marcescens* e TEM-116 (n=1/1) em *M. morgani*].

3 – Distribuição da taxa de conjugação por tipos de ESBL

No presente trabalho foram obtidas maiores taxas de conjugação em bactérias com ESBLs do tipo TEM (58%, 7/12) do que do tipo CTX-M (52%, 48/92) e SHV (27%, 6/22). No estudo anterior (Machado *et al.*, 2007) verificou-se também que as ESBLs do tipo TEM apresentavam maior taxa de conjugação (86%, 43/50, comparando com SHV (61%, 20/33) e CTX-M (42%, 10/24).

Por outro lado, ao observar-se o Gráfico 5 constata-se que existem ESBLs transferíveis que estão associadas a maior diversidade de espécies. A ESBL do tipo SHV-12 foi a ESBL cuja transferência por conjugação foi observada numa maior diversidade de espécies (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. cloacae*). Para esta ESBL, *K. pneumoniae* foi a espécie em que se observou uma maior taxa de conjugação (14% *versus* 5% para *E. coli* e 5% para *E. cloacae*). Para a ESBL do tipo TEM-10, a transferência por conjugação envolve apenas duas espécies (*K. pneumoniae* e *K. oxytoca*), sendo mais uma vez *K. pneumoniae* a espécie associada a uma maior taxa de conjugação (40% *versus* 20%, respectivamente). Para CTX-M-15 também se verifica o envolvimento de duas espécies (*E. coli* e *P. mirabilis*), constatando-se ser *E. coli* a espécie onde se observou uma maior

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

taxa de conjugação (49% *versus* 1%, respectivamente). A transferência por conjugação das restantes ESBLs esteve apenas associada a uma espécie [TEM-52 e CTX-M-14 em *E. coli*; TEM-116 em *M. morgani*]. Ao compararmos o Gráfico 5 com o Gráfico 6, verifica-se que no estudo de Machado *et al.* (2007) TEM-24 foi a ESBL que esteve associada a transferência a partir de uma maior diversidade de espécies [5 espécies; *K. pneumoniae*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis*], seguindo-se as ESBLs do tipo TEM-52 [2 espécies; *K. pneumoniae* e *E. coli*], SHV-5 [2 espécies; *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*], SHV-12 [2 espécies; *K. pneumoniae* e *E. cloacae*] e CTX-M-15 [2 espécies; *K. pneumoniae* e *E. coli*]. A transferência por conjugação envolveu apenas uma espécie para as ESBLs do tipo TEM-12, TEM-116, SHV-2, SHV-90 (*K. pneumoniae*), TEM-10 (*E. cloacae*), e CTX-M-1 e CTX-M-14 (*E. coli*).

Relativamente à transferência por conjugação de ESBLs do tipo TEM, nos dois estudos, a enzima TEM-52 foi a que apresentou maiores taxas de conjugação, associadas sobretudo a *E. coli*, verificando-se que no presente estudo esta enzima esteve associada a uma taxa de conjugação de 67% (n=2/3) e no estudo de Machado *et al.*, 2007 a uma taxa de conjugação de 90% (n=9/10) (Gráficos 5 e 6). Estas elevadas taxas de conjugação poder-se-ão dever ao facto do gene *bla*_{TEM-52} estar associado a plasmídeos IncII, um tipo de plasmídeos epidémico frequentemente implicado na disseminação de TEM-52 (Carattoli, 2009). Nos resultados obtidos verificou-se um decréscimo na taxa de conjugação de *bla*_{TEM-52} comparativamente com o estudo anterior. No entanto, o número de isolados com TEM-52 analisados no presente estudo foi diminuto (n=3).

Disseminação horizontal de genes que codificam para β-lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

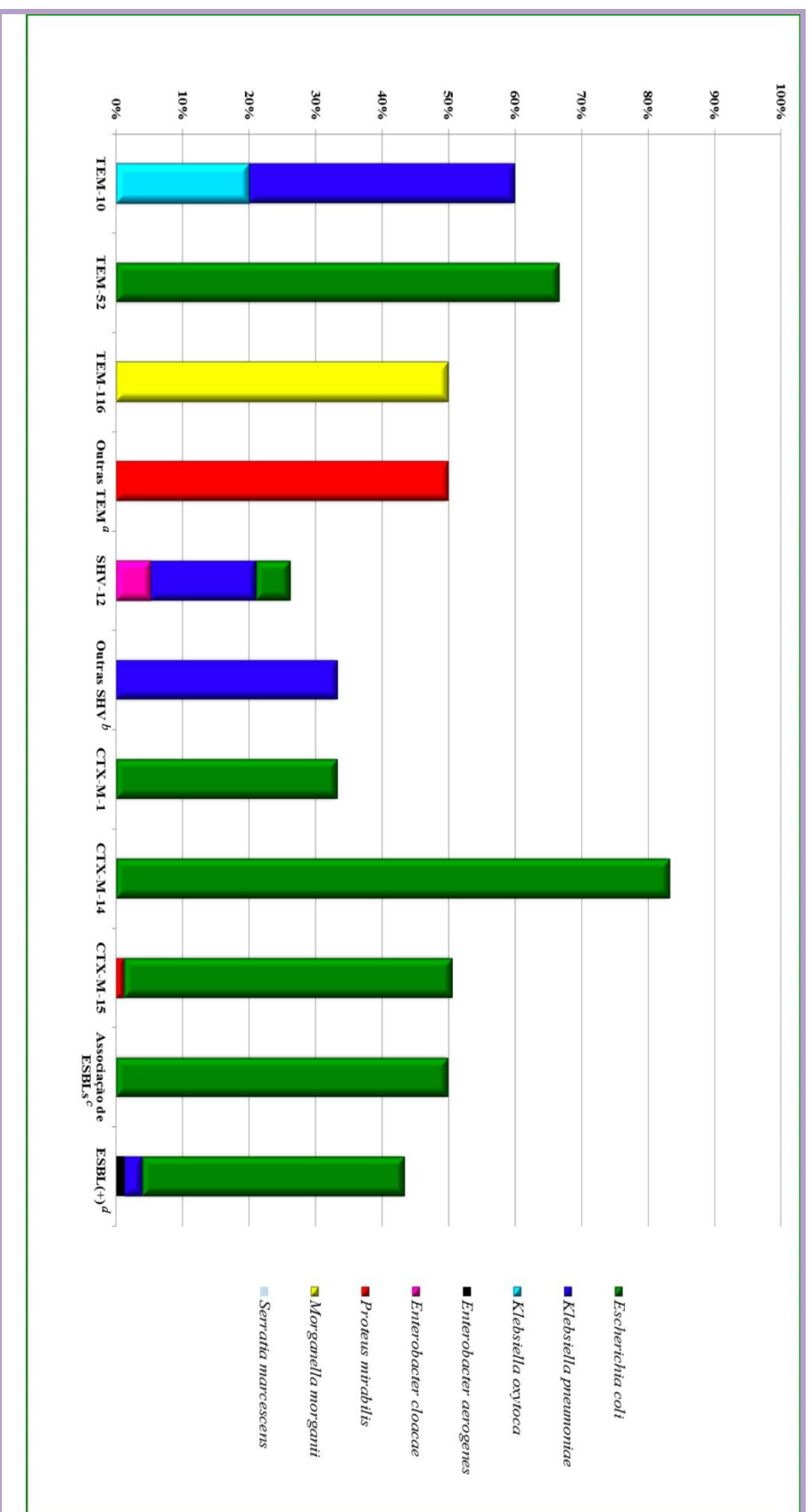


Gráfico 5 – Distribuição da taxa de conjugação por tipos de ESBL.

^a TEM-109 (n=1/2); ^b SHV-5 (n=1/3); ^c TEM-10 + CTX-M-15 (n=1/1); TEM-116 + CTX-M-15 (n=2/3); TEM-116 + CTX-M-1 (n=1/1); ^d ESBLs não caracterizadas genotipicamente.

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

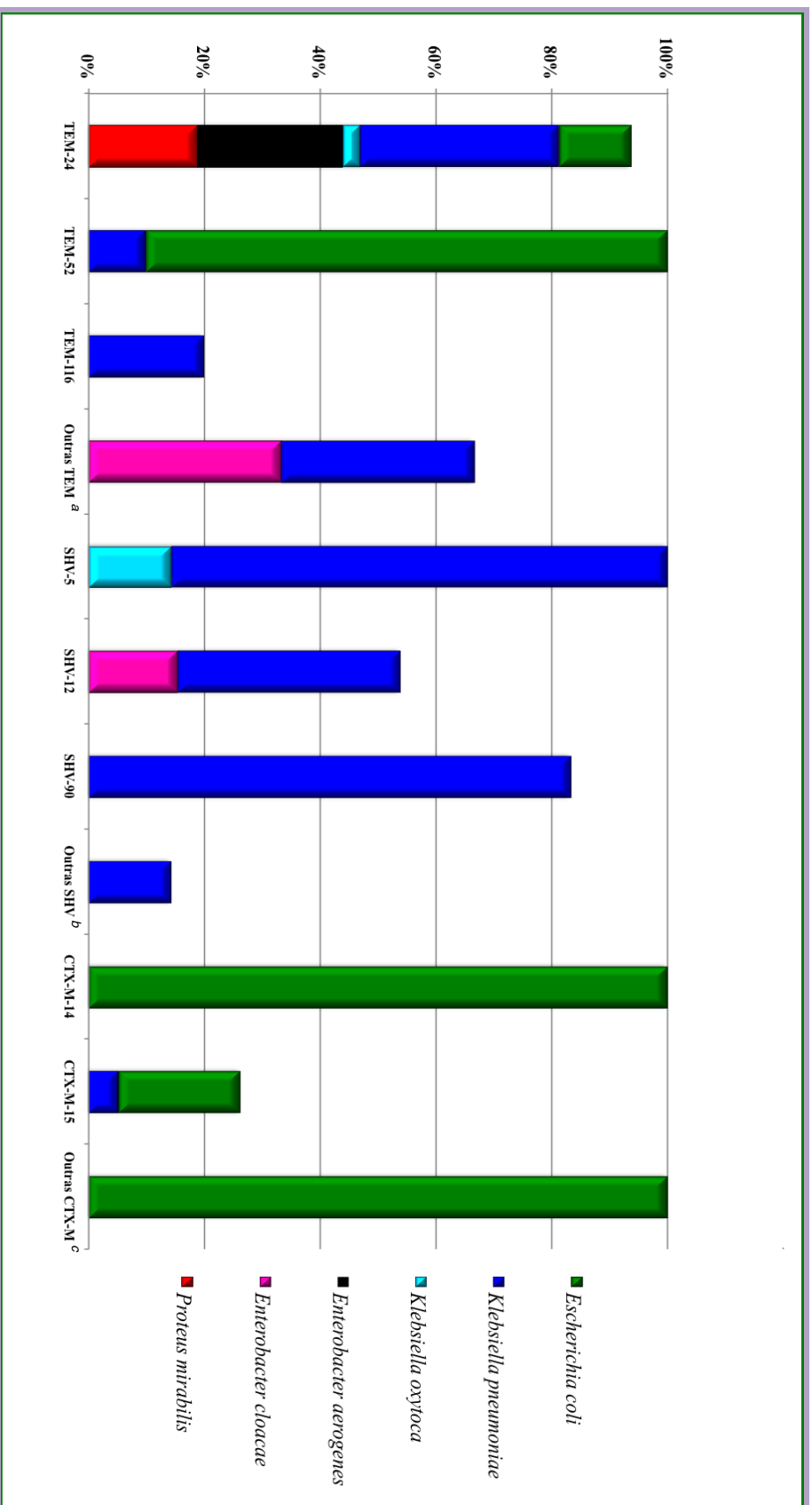


Gráfico 6 – Distribuição da taxa de conjugação por tipos de ESBL (2002-2004) (Machado et al., 2007).

^a TEM-10 (n=1/3), TEM-12 (n=1/3); ^b SHV-2 (n=1/7); ^c CTX-M-1 (n=1/1).

Outros estudos revelaram taxas de conjugação de *bla*_{TEM-52} maiores em Portugal, como no estudo que se tem vindo a comparar (Machado *et al.*, 2007), inclusivamente em nichos ecológicos não hospitalares (Costa *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2013), podendo reflectir o sucesso da propagação epidémica de plasmídeos do grupo IncI, pois sendo do mesmo grupo de incompatibilidade a disseminação torna-se mais fácil. Esta possibilidade também é suportada pela ausência de relação clonal entre isolados de pacientes hospitalizados nos hospitais Portugueses e animais produtores de TEM-52 localizados nas mesmas regiões estudadas (Machado *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2013).

Neste estudo não se verificou a transferência por conjugação da enzima TEM-24 (apenas um isolado de *K. pneumoniae* foi testado). Contudo, no estudo de Machado *et al.* (2007) a transferência por conjugação de TEM-24 (97%, 30/32) (Gráfico 6) foi observada numa grande diversidade de espécies [*E. coli* (13%, 4/32), *K. pneumoniae* (34%, 11/32), *K. oxytoca* (3%, 1/32), *E. aerogenes* (25%, 8/32), *P. mirabilis* (19%, 6/32)]. Esta enzima representa uma ESBL amplamente disseminada, principalmente associada a estirpes epidémicas de *E. aerogenes* e *Klebsiella* spp. (também detectadas em Portugal) e a plasmídeos epidémicos IncA/C₂ contendo múltiplos genes de resistência (Novais *et al.*, 2008; Novais *et al.*, 2010).

Tanto no presente estudo como no estudo de Machado *et al.* (2007) a enzima CTX-M-14 foi a ESBL do tipo CTX-M para a qual se obteve uma maior taxa de conjugação [83% (n=5/6) *versus* 100% (n=4/4)], associada apenas à espécie *E. coli* (Gráficos 5 e 6). Estas percentagens elevadas dever-se-ão principalmente à disseminação de genes *bla*_{CTX-M-14} através de plasmídeos, provavelmente plasmídeos do tipo IncK (Liebana *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2007; Diestra *et al.*, 2009; Valverde *et al.*, 2009; Cottell *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2013). Em Espanha, os genes *bla*_{CTX-M-14} foram localizados em plasmídeos com diferentes possibilidades de transferência (*bla*_{CTX-M-14} foi transferido por conjugação em 75.4% dos isolados) (Valverde *et al.*, 2009). Ao realizar-se hibridação com sondas específicas, verificou-se que esses isolados pertenciam aos grupos de incompatibilidade IncI e/ou IncK (94.9%, 37/39) e com menor extensão IncHI₂ (5.1%, 2/39), sendo estes três *narrow-host range plasmids* (Valverde *et al.*, 2009). No entanto, os dados provenientes de outros países onde esta ESBL é

vulgarmente detectada indicam que outros grupos de incompatibilidade podem estar envolvidos na sua disseminação (Marcadé *et al.*, 2009).

A ESBL do tipo CTX-M-15, apesar de muito representada na colecção de isolados analisada, não apresentou elevadas taxas de conjugação (51%, 42/83) (Gráfico 5). A disseminação dos genes *bla*_{CTX-M-15} está associada principalmente a plasmídeos epidémicos IncFII, associados à sua disseminação internacional (Lavollay *et al.*, 2006; Novais *et al.*, 2006; Rijavec *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007; Coque *et al.*, 2008; Peirano *et al.*, 2011). Os plasmídeos IncFII são encontrados principalmente em *Enterobacteriaceae* e têm recentemente sido denominados como “plasmídeos epidémicos de resistência”, devido à sua propensão para adquirir genes de resistência e de transferência entre bactérias (Carattoli, 2011). Estes plasmídeos não são um grupo homogéneo, apresentam vários tamanhos (85-160 kb), são de baixo número de cópias, e podem ter evoluído por eventos de recombinação entre plasmídeos (Coque *et al.*, 2008). O replicão FII pode existir sozinho ou em associação com o replicão FIA ou FIB facilitando a rápida evolução e diversificação plasmídica (Coque *et al.*, 2008; Villa *et al.*, 2010; Cantón *et al.*, 2012).

No presente estudo, poderá haver muita disseminação clonal de *bla*_{CTX-M-15}, daí observar-se menores taxas de conjugação. Não só nos hospitais de Portugal, mas em todo o mundo, o gene *bla*_{CTX-M-15} é transferido principalmente por: estirpes epidémicas de *E. coli* pertencentes ao grupo filogenético B2 (ST131) e D (ST405) e plasmídeos epidémicos IncF contendo múltiplos determinantes de resistência a antibióticos, incluindo genes que codificam para serino-carbapenemases, aminoglicosídeos [*aac*(6′)-*Ib-cr armA*, entre outros] (Carattoli, 2009).

No que diz respeito às enzimas do tipo SHV, quando se observa o Gráfico 5, verifica-se que entre as ESBLs do tipo SHV, o tipo SHV-12 foi o que foi mais frequentemente transferido por conjugação (26%, 5/19) e como referido anteriormente, associado a mais espécies, o que poderá estar relacionado com plasmídeos *broad-host range* (de larga gama de hospedeiros). No estudo de 2002-2004 a taxa de conjugação foi superior (54%, 7/13), verificando-se que no presente estudo as taxas de conjugação foram mais baixas para *K. pneumoniae* (16%, n=3/19 *versus* 38%, n= 5/13) e para *E. cloacae* (5%, n=1/19

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

versus 15%, n=2/13) (Gráficos 5 e 6). Segundo Carattoli (2009), o gene *bla*_{SHV-12} é frequente entre isolados de *K. pneumoniae* na Europa e tem sido localizado em plasmídeos de diferentes famílias, como por exemplo IncI1, IncFII, IncK, entre outros (Poirel *et al.*, 2006; Diestra *et al.*, 2009, Marcadé *et al.*, 2009). A heterogeneidade entre os plasmídeos que codificam para os genes *bla*_{SHV-12} sugere um potencial notável de disseminação (Carattoli *et al.*, 2006).

V – CONCLUSÃO

Após o término desta investigação, os resultados alcançados mostram que a disseminação de genes *bla*_{ESBL} é frequente em *Enterobacteriaceae* de hospitais Portugueses.

Esta disseminação é frequente em várias espécies de *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, entre outras), mas é de salientar que *E. coli* foi a espécie em que se observou uma maior taxa de transferência por conjugação de genes *bla*_{ESBL}.

Neste estudo, verificou-se também a associação de maiores taxas de conjugação a isolados bacterianos (*E. coli*) produzindo ESBLs do tipo TEM-52 e CTX-M-14, o que poderá dever-se à disseminação de genes *bla*_{TEM-52} e *bla*_{CTX-M-14} através de plasmídeos *narrow-host range* (provavelmente do tipo IncII e IncK, respectivamente). No caso da ESBL do tipo SHV-12, foi ainda notória a grande diversidade de espécies associadas à sua transferência por conjugação, o que poderá demonstrar também algum sucesso da sua disseminação plasmídica em Portugal.

Desta forma, a dispersão de elementos genéticos móveis entre *Enterobacteriaceae* parece continuar a ser um factor importante para a disseminação de genes *bla*_{ESBL} em Portugal, o que poderá agravar ainda mais no futuro o problema da resistência aos antibióticos β -lactâmicos.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, E. P. e Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Reviews of Infectious Diseases*, 10, pp. 677–78.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 289 (1036), pp. 321-31.
- Anderson, E. S. *et al.* (1977). Clonal distribution of resistance plasmid carrying Salmonella Typhimurium, mainly in the Middle East. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 79, pp. 425-48.
- Arthur, M. e Courvalin, P. (1993). Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 37, pp. 1563-71.
- Baquero, F. *et al.* (2008). *Evolutionary biology of bacterial and fungal*. Washington, American Society Microbiology.
- Bartosik, A. A. *et al.* (2012). Novel broad-host-range vehicles for cloning and shuffling of gene cassettes. *Journal of Microbiological Methods*, 88, pp.53-62.
- Bauernfeind, A., Chong, Y. e Scweighart, S. (1989). Extended broad-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection*, 17 (5), pp. 316-21.
- Beers, M. H. e Fletcher, A. S. (2008). *Manual Merck de Saúde para a Família*. Barcelona, Editorial Oceano.
- Benedi, J. V. *et al.* (2000). *Antimicrobial Resistance: A Laboratory Approach*. Compress, Madrid, ISBN: 84-607-1399-7.
- Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153 (1), pp. S347-57.
- Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (1), pp. 1-14.
- Bortolaia, V. *et al.* (2010). High Diversity of Extended-Spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Italian Broiler Flocks. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (4), pp. 1623- 26.
- Bouchillon, S. K. *et al.* (2004). Determining incidence of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the

- PEARLS study 2001-2002. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24 (2), pp. 119-24.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum β -lactamase in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (4), pp. 933-51.
- Bradford, P. A. (2001). What's new in β -lactamases? *Current Infections Disease Reports*, 3, pp. 13-19.
- Bush, K. (1989). Characterization of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33 (3), pp. 259-63.
- Bush, K., Jacoby, G. A. e Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Agents and Antimicrobial Chemotherapy*, 39 (6), pp. 1211-33.
- Bush, K. (2001). New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 32 (7), pp. 1085-89.
- Bush, K. e Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (3), pp. 969-76.
- Caldeira, L. *et al.* (2002). *Caracterização da prescrição de antibióticos em infecções do tracto respiratório por parte dos médicos de Clínica Geral e da carreira de Medicina Geral e Familiar do continente português*. Lisboa, Infarmed.
- Cantón, R. *et al.* (2002). Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (4), pp. 1237-43.
- Cantón, R., Coque, T. M. e Baquero, F. (2003). Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16 (4), pp. 315-25.
- Cantón, R. e Coque, T. (2006). The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9 (5), pp. 466-75.
- Cantón, R. *et al.* (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (1), pp. 144-53.
- Cantón, R., González-Alba, J. M. e Galán, J. C. (2012). CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, 110 (3), pp. 1-19.

- Carattoli, A. *et al.* (2005). Extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (2), pp. 833-35.
- Carattoli, A. *et al.* (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63, pp. 219-28.
- Carattoli, A. *et al.* (2006). Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer β -lactams. *Emerging Infectious Diseases*, 12 (7), pp. 1145-48.
- Carattoli, A. (2008). Animal reservoirs for extended-spectrum β -lactamase producers. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (1), pp. 117-23.
- Carattoli, A. *et al.* (2008). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases isolated in Rome, Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (1), pp. 103-08.
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, pp. 2227-38.
- Carattoli, A. (2011). Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, pp. 654 -58.
- Cavallo, J. *et al.* (2008). *Comite de l'antibiogramme de la Societe Française de Microbiologie*. Paris, France.
- Chong, Y. *et al.* (2011). Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a long-term study from Japan. *European Journal of Clinical. Microbiology & Infectious Diseases*, 30, pp. 83-87.
- Chopra, I. *et al.* (2008). Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria: a consensus statement. *The Lancet Infectious Diseases*, 8, pp.133-39.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 17th.Approved standard M100-S17.*Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI, Wayne, Pa.
- Coenen, S. *et al.* (2009). European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient parenteral antibiotic treatment in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, pp. 200-05.
- Collee, J. G. *et al.* (1993). *Microbiologia Médica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, Sexta Edição.
- Coque, T. *et al.* (2002). Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single

- hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (2), pp. 500-10.
- Coque, T. *et al.* (2008). Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (2), pp. 195-00.
- Coque, T., Baquero, F. e Cantón, R. (2008). Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveillace*, 13 (47), pp. 1-11.
- Cormican, M. G. *et al.* (1996). Detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) – producing strains by the Etest ESBL screen. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (8), pp. 1880-84.
- Costa, D. *et al.* (2004). Detection of CTX-M-1 and TEM-52 β -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, pp. 960-1.
- Costa, D. *et al.* (2006). Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV class in faecal samples of wild animals in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, pp. 1311-2.
- Costa, D. *et al.* (2009). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Veterinary Microbiology*, 138 (3-4), pp. 339-44.
- Cottell, J. L. *et al.* (2011). Complete sequence and molecular epidemiology of IncK epidemic plasmid encoding *bla*_{CTX-M-14}. *Emerging Infectious Diseases*, 17, pp. 645–52.
- Coudron, P. E., Moland, E. S. e Sanders, C. C. (1997). Occurrence and detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a veteran's medical center: seek and you may find. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (10), pp. 2593-7.
- Couturier, M. *et al.* (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *FEMS Microbiology Reviews*, 52, pp. 375–95.
- Datta, N. e Hedges, R.W. (1971). Compatibility groups among fi-R factors. *Nature*, 234, pp. 222–23.
- Datta, N. e Hughes, V. M. (1983). Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature*, 306, pp.616–17.
- Davies, J. e Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74 (3), pp. 417-33.

- de la Cruz, F. e Davies, J. (2000). Horizontal gene transfer and the origin of species : lessons from bacteria. *Trends in Microbiology*, 8, pp. 28-33.
- de la Cruz, F. *et al.* (2010). Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, pp. 18-40.
- Denton, M. (2007). *Enterobacteriaceae*. *Internacional Journal of Antimicrobial Agents*, 29 (3), pp. S9-S22.
- Dias, P. G. *et al.* (1990). *Antibióticos em Pediatria*. Lisboa, Edição do Instituto Pasteur de Lisboa.
- Díaz, M. A. *et al.* (2008). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de beta-lactamases de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27 (9), pp. 503-10.
- Dierikx, C. M., *et al.* (2012). Occurrence and characteristics of extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, pp. 1368–74.
- Diestra, K. *et al.* (2008). Caracterización y epidemiología molecular de beta-lactamases de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en once hospitales españoles (2004). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26 (7), pp. 404-10.
- Diestra, K. *et al.* (2009). Characterization of plasmids encoding *bla*_{ESBL} and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63 (1), pp. 60-66.
- Dionisio, F., Matic, I. e Radman, M. (2002). Plasmids spread very fast in heterogeneous bacterial communities. *Genetics Society of America*, 162, pp. 1525-32.
- Edelstein, M. *et al.* (2003). Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (12), pp. 3724-32.
- Emery, C. e Weymouth, L. A. (1997). Detection and clinical significance of extended-spectrum β -lactamases in a tertiary-care medical center. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (8), pp. 2061-67.
- Ewers, C. *et al.* (2012). Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, pp. 646–55.

- Falagas, M. E. e Karageorgopoulos, D. E. (2009). Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *The Journal of Hospital Infection*, 73 (4), pp. 345-54.
- Ferreira, W. F. C. e Sousa, J. C. (1998). *Microbiologia*. Porto, Edição Lidel, Volume 1.
- Ferreira, W. F. C. e Sousa, J. C. (1998). *Microbiologia*. Porto, Edição Lidel, Volume 2.
- Ferreira, W. F. C., Sousa, J. C. e Lima, N. (2010). *Microbiologia*. Lisboa, Edição Lidel.
- Filutowicz, M. *et al.* (2008). Bacterial conjugation-based antimicrobial agents. *Plasmid*, 60, pp. 38-44.
- Francia, M. V. *et al.* (2004). A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiology Reviews*, 28 (1), pp. 79 – 00.
- Galas, M. *et al.* (2008). Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (2), pp. 786-9.
- García, C. S. *et al.* (2010). Betalactamasas de espectro extendido en enterobactérias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28 (1), pp. 12-18.
- Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V. e de la Cruz, F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, pp. 657-87.
- Garcillán-Barcia, M. P., Alvarado, A. e de la Cruz, F. (2011). Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, pp. 936-56.
- Georgopapadakou, N. e Liu, F. (1980). Penicillin-binding proteins in bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18 (1), pp. 148-57.
- Georgopapadakou, N. (1993). Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to β -lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37 (10), pp. 2045-53.
- Giske, C. G. *et al.* (2009). Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, pp. 1-4.
- Gobernado, M. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases on the rise. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 18 (2), pp. 115-7.
- Gomis-Rüth, F. X. e Coll, M. (2006). Cut and move: protein machinery for DNA processing in bacterial conjugation. *Structural Biology*, 16, pp. 744-52.

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

- Gonçalves, A. *et al.* (2010). Genetic characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates of pigs from a Portuguese Intensive swine farm. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7 (12), pp. 1569-73.
- Gonullu, N. *et al.* (2008). Dissemination of CTX-M-15 beta-lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids, among clinical isolates of *Escherichia coli* in a university hospital in Istanbul, Turkey. *Journal Clinical Microbiology*, 46 (3), pp. 1110-2.
- Götz, A. *et al.* (1996). Detection and Characterization of Broad-Host-Range Plasmids in Environmental Bacteria by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (7), pp. 2621-28.
- Gupta, V. (2007). An update on newer β -lactamases. *Indian Journal of Medical Research*, 126 (5), pp. 417-27.
- Hadziyannis, E. *et al.* (2000). Screening and confirmatory testing for extended spectrum β -lactamases (ESBL) in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 36, pp. 113-17.
- Harada, S., Ishii, Y. e Yamaguchi, K. (2008). Extended-spectrum β -lactamases: Implications for the clinical laboratory and therapy. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, 28, pp. 401-12.
- Harbottle, H. *et al.* (2006). Genetics of antimicrobial resistance. *Animal Biotechnology*, 17, pp. 111-24.
- Hawkey, P. M. e Jones, A. M. (2009). The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64 (1), pp. i3-10.
- Hentschel, U. e Hacker, J. (2001). Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. *Microbes and Infection*, 3, pp. 545-48.
- Hernández, J. R. *et al.* (2005). Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (5), pp. 2122-5.
- Huber, H. *et al.* (2013). ESBL- producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Switzerland. *Veterinary Microbiology*, 162, pp. 992-96.
- Inoue, M. *et al.* (1995). Characterization of an extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli* mediated by a plasmid. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 1, pp. 70-72.
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge [Em linha]. Disponível em:<http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Paginas/AntibioticosResi.aspx>. [Consultado em 17/02/12].

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

- Jacoby, G. A. e Han, P. (1996). Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (4), pp. 908-11.
- Jarlier, V. *et al.* (1988). Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactams agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10 (4), pp. 867-78.
- Johnson, J. R. *et al.* (2010). *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E.coli* infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 51, pp. 286-94.
- Johnson, T. J. *et al.* (2007). Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, pp. 1976-83.
- Kakirde, K. S. *et al.* (2011). Gram negative shuttle BAC vector for heterologous expression of metagenomic libraries. *Gene*, 475, pp. 57-62.
- Kayser, F. H. *et al.* (2005). *Medical Microbiology*. New York, Thieme Stuttgart.
- Kelly, B. G., Vespermann, A. e Bolton, D. J. (2009). The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food and Chemical Toxicology*, 47, pp. 951-68.
- Kelly, B. G., Vespermann, A. e Bolton, D. J. (2009). Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food and Chemical Toxicology*, 47, pp. 969-77.
- Laheyclinic. [Em linha]. Disponível em: <http://www.lahey.org/Studies/>. [Consultado em 16/02/12].
- Lavollay, M. *et al.* (2006). Clonal dissemination of a CTX-M-15 β -lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis, and Bangui. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (7), pp. 2433–8.
- Lawrence, J. G. (2002). Gene Transfer in Bacteria. Speciation without species? *Theoretical Population Biology*, 61, pp. 449-60.
- Liebana, E. *et al.* (2006). Longitudinal farm study of extended- spectrum β -lactamase-mediated resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, pp. 1630-34.
- Ling, T. K. W. *et al.* (2006). Multicenter Antimicrobial Susceptibility Survey of Gram-negative bacteria isolated from patients with community-acquired infections in the people's Republic of China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (1), pp. 374–78.

- Livermore, D. M. (1995). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8 (4), pp. 557-84.
- Livermore, D. M. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical Infectious Diseases*, 36 (1), pp. S11-23.
- Livermore, D. M. *et al.* (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59 (2), pp. 165-74.
- Livermore, D. M. e Woodford, N. (2006). The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*, 14 (9), pp. 413-18.
- Livermore, D. M. (2009). Beta-lactamases - the threat renews. *Current Protein and Peptide Science*, 10 (5), pp. 397-00.
- Llosa, M. e de la Cruz, F. (2005). Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. *Microbiology*, 156, pp. 1-6.
- Lopes, A. C. S. *et al.* (2010). *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105, pp. 163-7.
- Lösch, L. S., Alonso, J. M. e Merino, L. A. (2008). Occurrence of antimicrobial-resistant *Enterobacteriaceae* in water from different sources in a subtropical region of Argentina. *Revista Ambiente & Água*, 3 (2), pp. 28-36.
- Machado, E. *et al.* (2006). Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (9), pp. 3220-1.
- Machado, E. *et al.* (2007). High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60 (6), pp. 1370-4.
- Machado, E. *et al.* (2008). Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62 (2), pp. 296-02.
- Machado, E. *et al.* (2009). Leakage into Portuguese aquatic environments of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63 (3), pp. 616-8.

- Machado, E. *et al.* (2013). Commensal *Enterobacteriaceae* as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons, and *sul* genes in Portugal. *Frontiers in Microbiology*, 80 (4), pp. 1-7.
- Mahamound, A. *et al.* (2007). Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59 (6), pp. 1223-9.
- Marcadé, G. *et al.* (2009). Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 63, pp. 67-71.
- Marín, M. e Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21 (1), pp. 42-55.
- Marquez, B. (2005). Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*, 87, pp. 1177-47.
- Martínez, J. L. e Baquero, F. (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (4), pp. 647-79.
- Martínez, J. L. *et al.* (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 33 (2), pp. 430-49.
- Mascaretti, O. (2003). *Bacteria versus Antimicrobial Agents: an integrated Approach*. Washington, American Society Microbiology.
- Mendonça, N. *et al.* (2007). Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (6), pp. 1946-55.
- Minarini, L. A. R. *et al.* (2007). Prevalence of community-occurring extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. *Current Microbiology*, 54, pp. 335-41.
- Moland, E. S. *et al.* (2002). Occurrence of newer β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 U.S. hospitals. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 46, pp. 3837-42.
- Molbak, L. (2003). *Conjugative plasmids and the transfer of mobile genetic elements among bacteria in plant rhizosphere environments*. PhDs thesis. National Environmental Research Institute, Denmark.
- Moreira, L. (2009). *Disseminação horizontal de genes que conferem resistência à tetraciclina em isolados de Enterococcus spp de origem humana e animal*. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Farmacêuticas) – Porto, Universidade Fernando Pessoa.

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

- Murray, P., Rosenthal, K. e Pfaller, M. (2006). *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro, Elsevier, quinta edição.
- Naas, T. e Nordmann, P. (1999). OXA-type beta-lactamases. *Current Pharmaceutical Design*, 5, pp. 865-79.
- Namora, J. (1977). *Deuses e Demónios na Medicina*. Círculo de Leitores, Vol. 2.
- Navarro, F. *et al.* (2007). Evidence for convergent evolution of CTX-M-14 ESBL in *Escherichia coli* and its prevalence. *FEMS Microbiology Letters*, 273, pp.120-23.
- Nicolas-Chanoine, M. H. *et al.* (2008) Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, pp. 273-81.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, pp. 593-56.
- Nordmann, P., Dortet, L. e Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*, 18 (5), pp. 263-71.
- Normark, B. H. e Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252, pp. 91-06.
- Novais, Â. *et al.* (2006). Dissemination and persistence of *bla*_{CTX-M-9} are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from *Tn402* located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1- α , and IncFI groups. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (8), pp. 2741-50.
- Novais, Â. *et al.* (2007). Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (2), pp. 796-9.
- Novais, Â. *et al.* (2008). International dissemination of a multi-resistant IncA/C2 plasmid containing *bla*_{TEM-24}, Tn21 and Tn1696 among epidemic and non-epidemic *Enterobacteriaceae* species. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) Barcelona.
- Novais, Â. *et al.* (2010). International spread and persistence of TEM-24 is caused by the confluence of highly penetrating *Enterobacteriaceae* clones and an IncA/C2 plasmid containing Tn1696::Tn1 and IS5075-Tn21. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (2), pp. 825-34.
- Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility. *FEMS Microbiology Reviews*, 51, pp. 381-95.

- O'Sullivan, L. E., Nickerson, C. A. e Wilson, J. W. (2010). A series of IncQ-based reporter plasmids for use in a range of Gram negative genera. *Journal of Microbiology And Biotechnonology*, 20, pp. 871-74.
- Oliver, A. *et al.* (2005). CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among *Enterobacteriaceae* in a Spanish hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (4), pp. 1567-71.
- Oteo, J. *et al.* (2006). Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospitals institutions. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (7), pp. 2359-66.
- Pallecchi, L. *et al.* (2004). Detection of CTX-M-Type β -lactamase genes in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy children in Bolivia and Peru. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (12), pp. 4556-61.
- Partridge, S. R. *et al.* (2011). Complete sequence of pJIE143, a pir-type plasmid carrying ISEcp1-*bla*_{CTX-M-15} from an *Escherichia coli* ST131 isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, pp. 5933–35.
- Paterson, D. L. e Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18 (4), pp. 657-86.
- Paterson, D. L. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Infection Control*, 34 (1), pp. S20-8.
- Peirano, G. e Pitout, J. D. (2010). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, pp. 316-21.
- Peirano, G. *et al.* (2010). High prevalence of ST131 isolates producing CTX-M-15 and CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, pp. 1327-30.
- Peirano, G., Costello, M. e Pitout, J.D., (2010). Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from the Chicago area: high prevalence of ST131 producing CTX-M-15 in community hospitals, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, pp. 19-23.
- Peirano, G. *et al.* (2011). Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, pp. 1039–43.
- Peirano, G., Greune, C. e Pitout, J. (2011). Characteristics of infections caused by extended-spectrum β -lactamase- producing *Escherichia coli* from community hospitals in South Africa. *Diagnostic Microbiology and Infections Disease*, 69, pp. 449-53.

- Pelczar, M. *et al.* (1980). *Microbiologia I*. Brasil, McGraw-Hill.
- Perez, F. *et al.* (2007). The continuing challenge of ESBLs. *Current Opinion in Pharmacology*, 7 (5), pp. 459-69.
- Philippon, A., Arlet, G. e Labrange, P.H. (1994). Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infections Diseases*, 13 (1), pp.17-29.
- Philippon, A., Labia, R. e Jacoby, G. (1989). Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33 (8), pp. 1131-36.
- Pinto, L. *et al.* (2010). Genetic detection of extended-spectrum β -lactamase-containing *Escherichia coli* isolates from birds of prey from Serra da Estrela natural reserve in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (12), pp. 4118-20.
- Pitout, J. D. e Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health. *The Lancet Infectious Diseases*, 8 (3), pp. 159-66.
- Poirel, L., Decousser, J. W. e Nordmann, P. (2003). Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*_{CTX-M} beta-lactamase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (9), pp. 2938-45.
- Poirel, L. *et al.* (2006). Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolona resistance determinants QnrA and QnrS in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, pp. 3992-97.
- Poole, K. (2004). Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61 (17), pp. 2200-23.
- Prescott *et al.* (2002). *Microbiología*. Madrid, McGraw-Hill-interamericana, quinta edição.
- Pukall, R., Tschipe, H. e Smalla, K. (1996). Monitoring the spread of broad-host and narrow-host range plasmids in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 20 (1), pp. 53-66.
- Rahall, J. J. (2009). Antimicrobial among and Therapeutic Options against Gram-Negative Pathogens. *Clinical Infections Diseases*, 45 (1), pp. S4-10.
- Randall, L. P. *et al.* (2011). Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum β -lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, pp. 86-95.
- Rang, H.P. *et al.* (2004). *Farmacologia*. Rio de Janeiro, Elsevier.

- Rasooly, A. e Rasooly, R. S. (1997). How rolling circle plasmids control their copy number. *Microbiology*, 5 (11), pp. 440- 46.
- Rijavec, M. *et al.* (2006). High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups. *Current Microbiology*, 53, pp. 158-62.
- Rodríguez-Baño, J. *et al.* (2009). *Escherichia coli* producing SHV-type extended-spectrum β -lactamase is a significant cause of community-acquired infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, pp. 781-84.
- Rodrigues, C. *et al.* (2013). Inc11/ST3 and IncN/ST1 plasmids drive the spread of *bla*_{TEM-52} and *bla*_{CTX-M-1/-32} in diverse *Escherichia coli* clones from different piggeries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68 (10), pp. 2245-48.
- Rogers, B. A., Sidjabat, H. E. e Paterson, D. L. (2011). *Escherichia coli* O25b: ST131: a pandemic, multiresistant, community- associated strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, pp. 1-14.
- Rupp, M. E. e Fey, P. D., (2003). Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)- producing *Enterobacteriaceae*. *Drugs*, 63 (4), pp. 353-65.
- Ruppé, E. (2010). Epidemiology of expanded-spectrum β -lactamases: the rise of CTX-M. *Antibiotiques*, 12, pp. 3-16.
- Sá, V. (2009). *Avaliação da disseminação horizontal de pbp5 em isolados de Enterococcus sp resistentes a β -lactâmicos de origem humana, animal e ambiental*. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Farmacêuticas) –Porto, Universidade Fernando Pessoa.
- Sabaté, M. *et al.* (2002). Novel complex sul 1 – type integron in *Escherichia coli* carrying *bla* (CTX-M-9). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, pp. 2656-61.
- Sakai, H. e Komano, T. (1996). DNA Replication of IncQ Broad-host-range Plasmids in Gram-negative Bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60 (3), pp. 377-82.
- Saladin, M. *et al.* (2002). Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiology Letters*, 209, pp. 161- 68.
- Samaha- Kfoury, J. N. e Araj, G. F. (2003). Recent developments in β -lactamases and extended spectrum β -lactamases. *British Medical Journal*, 327, pp. 1209-13.
- Scott, H. N., Laible, P. D. e Hanson, D. K. (2003). Sequences of versatile broad-host-range vectors of the RK2 family. *Plasmid*, 50, pp. 74-79.

- Smillie, C. *et al.* (2010). Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74 (3), pp. 434-52.
- Smorawinska, M. *et al.* (2012). Mobilizable narrow host range plasmids as natural suicide vectors enabling horizontal gene transfer among distantly related bacterial species. *FEMS Microbiology Letters*, 326, pp. 76-82.
- Snyder, L. e Champness, W. (2003). *Molecular Genetics of Bacteria*. Washindton, DC, ASM Press, Second Edition.
- Sousa, J. C. e Prista, L. (1988). *Antibióticos Inibidores da Biosíntese do Peptidoglicano*. Porto, Ordem dos Farmacêuticos, Primeira Edição.
- Sousa, J. C. (1991). *Antibióticos β -lactâmicos*. Queluz, Edição Beecham.
- Sousa, J. C. *et al.* (2005). *Microbiologia – protocolos laboratoriais*. Porto, Ed. Universidade Fernando Pessoa.
- Sousa, J. C. (2006). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Porto, Ed. Universidade Fernando Pessoa, Segunda Edição.
- Stokes, M. O. *et al.* (2012). Detection and characterization of pCT-like plasmid vectors for *bla*_{CTX-M-14} in *Escherichia coli* isolates from humans, turkeys and cattle in England and Wales. *Journal Antimicrobial and Chemotherapy*, 67, pp. 1639–16
- Sturenburg, E. e Mack, D. (2003). Extended- Spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *Journal Infection*, 47, pp. 273-95.
- Suzuki, H. *et al.* (2010). Predicting plasmid promiscuity based on genomic signature. *Journal of Bacteriology*, 192, pp. 6045-55.
- Tansawai, U. *et al.* (2009). SHV-12 Extended spectrum β -lactamase associated with high-level ceftazidime resistance in *Enterobacter cloacae* isolated from Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 40 (1), pp. 148-54.
- Thomas, C. M. e Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3, pp. 711-21.
- Thomson, K. S. e Moland, E. S. (2000). Version 2000: the new β -lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes and Infection*, 2, pp. 1225-35.
- Tollentino, F. M. *et al.* (2011). High prevalence of *bla*_{CTX-M} extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-31}, *bla*_{SHV-38}, and *bla*_{CTX-M-15} in Brazil. *Microbial Drug Resistance*, 17, pp. 7-16.

- Tortora, G. J. *et al.* (2003). *Microbiologia*. Porto Alegre, Editora Artmed, sexta edição.
- Valverde, A. *et al.* (2009). Spread of *bla*_{CTX-M-14} is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A,B1, and D in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (12), pp. 5204-12.
- Villa, L. *et al.* (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, pp. 2518-29.
- Villegas, M. V. *et al.* (2008). Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. *Journal Compilation*, 14 (1), pp. 154-58.
- Waters, V. L. (1999). Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Frontiers in Bioscience*, 4, pp. 416–39.
- Werner, G. *et al.* (2011). Host range of enterococcal *vanA* plasmids among Gram-positive intestinal bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66 (2), pp. 273-82.
- Witte, W. (2000). Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14 (4), pp. 321-5.
- Woerther, P. *et al.* (2010). Emergence and dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in the community: lessons from the study of a remote and controlled population. *The Journal of Infectious Diseases*, 202 (4), pp. 515-23.
- Woodford, N. *et al.* (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, pp. 736-55.
- Woodford, N. *et al.* (2004). Community and hospital spread *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in the UK. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 54, pp. 735-43.
- Yumuk, Z. *et al.* (2008). Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62 (2), pp. 284-8.
- Zhao, W. H. e Hu, Z. Q. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39, pp. 79–01.

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em
isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar

Disseminação horizontal de genes que codificam para β -lactamases de espectro alargado em
isolados de *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar