

---

**Natalina Maria Rodrigues Cardoso**

**Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amónio  
Quaternário em *Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos**

**Universidade Fernando Pessoa**

**Faculdade Ciências da Saúde**

**Ciências Farmacêuticas**

**Porto, 2011**

---

---

---

---

**Natalina Maria Rodrigues Cardoso**

**Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amónio  
Quaternário em *Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos**

**Universidade Fernando Pessoa**

**Faculdade Ciências da Saúde**

**Ciências Farmacêuticas**

**Porto, 2011**

---

---

**Natalina Maria Rodrigues Cardoso**

Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em  
*Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos

**Declaração de Originalidade**

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

**Natalina Maria Rodrigues Cardoso**

---

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob orientação da Professora Doutora Carla Novais.

---

---

**Natalina Maria Rodrigues Cardoso**

Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amónio Quaternário em  
*Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos

**O presente trabalho resultou de uma colaboração da Universidade Fernando Pessoa, Faculdade Ciências da Saúde, com o REQUIMTE grupo Micro (Faculdade Farmácia da Universidade do Porto).**

---

## **Resumo**

Os Biocidas são compostos químicos com propriedades antisépticas e desinfectantes utilizados para eliminar ou reduzir microrganismos patogénicos. São usados em diversas áreas de aplicação, nomeadamente na indústria, agro-pecuária, cosmética e unidades hospitalares. O uso generalizado pode ter contribuído para a seleção de microrganismos resistentes aos antibióticos devido a mecanismos de resistência cruzada ou co-resistência. Assim, é de elevada importância o estudo dos determinantes genéticos associados à resistência e tolerância bacteriana aos biocidas, o conhecimento da sua distribuição em diferentes géneros bacterianos e da sua potencial contribuição para a co-selecção de bactérias resistentes aos antibióticos é fundamental.

Este trabalho teve como principal objectivo a pesquisa de genes *qac* em *Enterococcus* spp de origem animal, humana e ambiental. Doze genes *qac* foram pesquisados por PCR (*polymerase Chain Reaction*) em 333 isolados e as amplificações sequenciadas. Procedeu-se também a uma pesquisa *in silico* em bases de dados genéticas de forma a compreender a distribuição destes genes por diferentes hospedeiros bacterianos e elementos genéticos. Entre os isolados estudados foi detetado o gene *qacH* (previamente descrito em *Staphylococcus* spp) num *E. faecalis* provenientes de uma água residual de um hospital do Norte do país. A pesquisa *in silico* corroborou os dados experimentais, mostrando que são muito poucos os genomas de *Enterococcus* spp portadores de genes *qac*. O número reduzido de *Enterococcus* spp com genes *qac* observado neste estudo juntamente com os dados da pesquisa *in silico* sugere que este género bacteriano não constitui um reservatório dos diversos genes *qac* previamente descritos em bactérias de Gram positivo e de Gram negativo. No entanto, a pesquisa *in silico* também sugere que plasmídeos conjugativos e a *IS1216* poderão contribuir para a dispersão futura de genes *qac* em *Enterococcus* spp.

Apesar da ausência de genes *qac* na população estudada, continua a ser fundamental a realização de mais estudos epidemiológicos a longo prazo que nos permitem avaliar a evolução e mobilização destes genes entre bactérias de géneros diferentes.

### **Abstract**

The Biocides are chemical compounds with antiseptic and disinfectant properties used to eliminate or reduce pathogens. They are used in various application areas, particularly in industry, agribusiness, cosmetics and hospitals. The widespread use may have contributed to the selection of microorganisms resistant to antibiotics due to resistance mechanisms or co-cross-resistance. It is therefore of great importance to the study of genetic determinants associated with bacterial resistance and tolerance to biocides, knowledge of their distribution in different bacterial genera and their potential contribution to the co-selection of antibiotic-resistant bacteria is essential.

This work was a major objective search *qac* genes in *Enterococcus* spp origin of animals, human and environmental. Twelve *qac* genes were surveyed by PCR (*polymerase chain reaction*) in 333 isolates and sequenced as amplifications. Also proceeded a search *in silico* in genetic databases in order to understand a distribution of these genes by a different bacterial hosts and genetic elements. Among the isolates studied was detected *qacH* gene (previously described in *Staphylococcus* spp) in *E. faecalis* from a hospital wastewater of the North Country. The search *in silico* corroborated the experimental data, showing that very few genomes of *Enterococcus* spp carriers *qac* genes. The small number of genes in *Enterococcus* spp *qac* observed in this study along with the survey data *in silico* suggests that this genre is not bacterial reservoir of various genes previously described them Gram positive and Gram negative. However, the research *in silico* suggests that plasmids conjugative IS1216 can contribute a further spread of genes *qac* in *Enterococcus* spp.

Despite the absence of *qac* genes in the population studied, it remains vital to conduct more long-term epidemiological studies that allow us to assess the evolution and mobilization of these genes between bacteria of different genera.

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer a algumas pessoas que foram importantes para a realização deste trabalho.

À Universidade Fernando Pessoa, Faculdade Ciências da Saúde, pelo apoio financeiro que disponibilizou, tornando possível a realização da investigação experimental do presente estudo, bem como as instalações do laboratório de investigação e todo o material necessário.

Ao REQUIMTE grupo Micro (Faculdade Farmácia da Universidade do Porto), por toda a colaboração que prestaram para com o presente estudo.

À orientadora desta monografia, Professora Doutora Carla Novais, pela ajuda e disponibilidade que demonstrou em todo o trabalho. A ela, em especial um muito obrigado!

Ao Dr. Ricardo Silva, técnico do laboratório de investigação pela disponibilidade e prontidão que apresentou nos momentos da elaboração da parte experimental do trabalho.

Aos meus pais e ao meu namorado, por todo o carinho, paciência, dedicação e motivação que prestaram ao longo deste percurso de 5 anos de curso e em particular, na elaboração deste trabalho.

À minha irmã, por toda a ajuda e disponibilidade que teve para comigo sempre que necessitei.

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em  
*Enterococcus spp* oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

## **Índice**

I.	Introdução .....	12
1.	Conceitos Gerais sobre Biocidas.....	12
2.	Mecanismo de Ação de moléculas Biocidas .....	13
2.1.	Interações com componentes extracelulares .....	14
2.2.	Interacções com a membrana citoplasmática .....	14
2.3	Interacção com os componentes intracelulares .....	16
3.	Fatores que afetam a atividade dos Biocidas.....	16
4.	Mecanismos de Resistência aos Biocidas .....	17
4.1.	Mecanismos de resistência Intrínsecos.....	19
4.2.	Mecanismos de Resistência Aquiridos .....	22
5.	Compostos de Amônio Quaternário.....	24
5.1.	Mecanismos de Ação dos Compostos de Amônio Quaternário.....	25
5.2.	Mecanismos de Resistência dos Compostos de Amônio Quaternário .....	26
6.	O uso de Biocidas e Antibióticos - Motivos para Preocupação?.....	27
6.1	Co-resistência e Resistência Cruzada .....	28
II.	Objectivos .....	30
III.	Material e Métodos.....	31
3.	Sequenciação dos produtos amplificados e interpretação dos resultados .....	35
4.	Avaliação da dispersão dos genes <i>qac</i> estudados em diferentes hospedeiros bacterianos através de análise <i>in silico</i> .....	36
IV.	Resultados .....	37
1.	Pesquisa de genes resistentes aos compostos de amônio quaternário .....	37
<b>V.</b>	<b>Discussão dos Resultados.....</b>	<b>41</b>
<b>VI.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>44</b>

## **Anexos**

## **Índice de Figuras e Tabelas**

<b>Figura 1:</b> Mecanismos de acção dos biocidas em diferentes organismo.....	13
<b>Figura 2:</b> Constituição da membrana celular de bactérias de Gram negativo e de Gram de positivo.....	19
<b>Figura 3:</b> Constituição da membrana celular das micobactérias.....	20
<b>Figura 4:</b> Estrutura básica dos Compostos de Amónio Quaternário.....	24
<b>Figura 5:</b> Gene <i>marA</i> causa a hiper produção das bombas AcrAB/TolC.....	28
<b>Figura 6:</b> Reacção de PCR - Amplificação do gene <i>qacHII</i> .....	37
<b>Figura 7:</b> Sequenciação do gene <i>qacHII</i> .....	37
<b>Tabela 1:</b> Mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos aos biocidas em bactérias.....	18
<b>Tabela 2:</b> <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos genes <i>qac</i> .....	33
<b>Tabela 3:</b> Condições de PCR utilizadas para a pesquisa de genes <i>qac</i> .....	34
<b>Tabela 4:</b> Dispersão dos genes <i>qac</i> e dos elementos genéticos em que estão inseridos em diferentes hospedeiros bacterianos .....	38

## **Lista de Abreviaturas**

**LPS** – Lipopolissacarídeos

**PCR** – *Polimerase Chain Reaction*

**QAC** – em inglês, *Quaternary Ammonium Compounds*

***qac*** – genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário

## **I. Introdução**

### **1. Conceitos Gerais sobre Biocidas**

Segundo o Decreto-lei 121/2002, de 16 de Fevereiro, que transpõe para a ordem jurídica interna da directiva 98/8/CE, os produtos designados de “Biocidas” são definidos como: “substâncias activas e preparações que contenham uma ou mais substâncias activas, apresentadas sob a forma em que são fornecidas ao utilizador, que se destinam, por mecanismos químicos ou biológicos, a destruir ou travar o crescimento, tornar inofensivo, evitar ou controlar de qualquer outra forma a acção de um organismo prejudicial” (A.I.S.E, 2011).

Durante séculos, os biocidas foram utilizados como agentes antimicrobianos em ambiente aquático (ex: uso de navios de cobre e de prata), na alimentação (ex: salga e uso de especiarias naturais), na mumificação (ex: uso de bálsamos), assépsia de salas de cirurgia e controlo de infecções nosocomiais (ex: fenol). Muitas substâncias químicas introduzidas no século XIX (ex: alcatrão vegetal, cloreto de magnésio, sulfato de cobre, peróxido de hidrogénio) ainda hoje são usadas como biocidas em várias actividades (Maillard, 2002).

Actualmente, os biocidas são utilizados como antisépticos (ex: clorhexidina, compostos de amónio quaternário, o gluteraldeído) e desinfectantes (compostos de amónio quaternário, peróxido de hidrogénio, álcool isopropílico) em hospitais, agricultura, ambiente de produção animal, casas particulares e locais públicos, contribuindo para a higiene e desinfeção local. Também os podemos encontrar nas indústrias alimentar e farmacêutica como conservantes (ex: cloreto de benzalcónio) de alimentos e produtos cosméticos. Muitas moléculas usadas nos produtos biocidas, podem ainda ser usadas como promotores de crescimento animal (ex: sulfato de cobre) e ou indústria química (ex: mercúrio) (Russell *et al*, 1995; Maillard, 2002; A.I.S.E, 2011).

O papel destes produtos é importante no controlo de infecções quer na comunidade quer no meio hospitalar sendo, conseqüentemente, o seu consumo cada vez mais intenso (Gilbert e Moore, 2005). A Comissão Europeia tem recomendado estudos para avaliar

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amónio Quaternário em *Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

se o uso destes produtos pode constituir uma ameaça à Saúde Pública ao contribuir para a selecção de bactérias resistentes aos antibióticos (Schenir, 2009). Esta preocupação está associada ao facto de muitos microrganismos usarem os mesmos mecanismos de resistência para diminuir simultaneamente a actividade de biocidas e antibióticos ou de terem, co-localizados genes de resistência a estes dois grupos de moléculas nos mesmos elementos genéticos móveis/mobilizáveis (ex: plasmídeos, integrões) (Schenir, 2009).

## 2. Mecanismo de Acção de moléculas Biocidas

Os biocidas apresentam diferentes mecanismos de acção (Figura 1) e diferentes actividades de acordo com os microrganismos em causa. A interacção inicial de um biocida com uma célula microbiana envolve uma primeira ligação com a superfície celular, embora o local alvo possa ser encontrado dentro da célula.

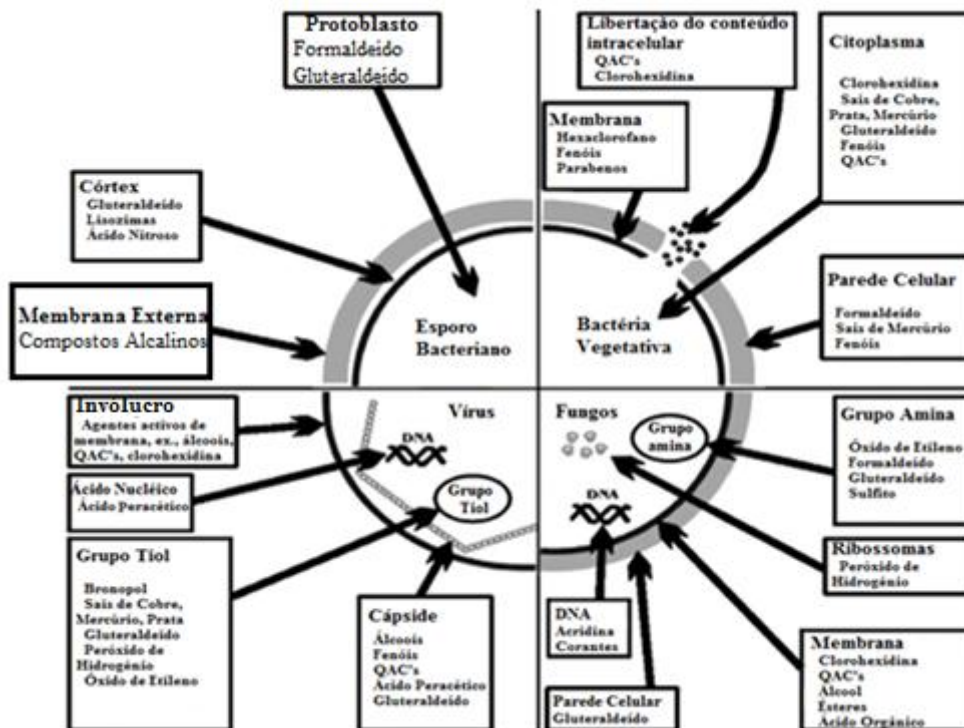


Figura 1: Mecanismos de acção dos biocidas em diferentes organismos (Russell *et al*, 1997). QAC's = *quaternary ammonium compounds*

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amónio Quaternário em  
*Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

A alteração de determinadas estruturas bacterianas como a parede celular, a membrana citoplasmática ou os constituintes do citoplasma podem contribuir para o efeito bactericida ou bacteriostático do agente químico, dependendo da extensão do dano na célula e da natureza do local alvo. É possível, no entanto, que um determinado agente químico apresente um ou todos estes mecanismos de interacção com as células bacterianas (McDonnell e Russell, 1999).

### **2.1. Interacções com componentes da membrana externa**

Vários biocidas podem interagir com componentes celulares exteriores, embora a viabilidade celular não seja afectada. Um dos efeitos visíveis de interacção do biocida com a célula bacteriana é a mudança de hidrofobicidade celular nas bactérias de Gram negativo. Alguns estudos detectaram que a hidrofobicidade é alterada quando interagem com agentes catiónicos (El Al falaha *et al*, 1985a; El Al falaha *et al*, 1985b; Jones *et al*, 1991; Fitzgerald *et al*, 1992) dada a hidrofilia que estes compostos apresentam. Uma vez que estes compostos não conseguem penetrar directamente na parede celular, a diminuição da hidrofobicidade da parede permite-lhes que estes compostos atinjam o citoplasma mais facilmente.

Determinados agentes químicos como o glutaraldeído estabelecem ligações cruzadas com componentes exteriores celulares como as lipoproteínas, impedindo a célula de realizar a maioria das funções vitais, resultando num efeito bactericida (McDonnell e Russell, 1999).

### **2.2. Interacções com a membrana citoplasmática**

O termo “agentes activos membranares” é muito usado para compostos com actividade antimicrobiana como os antibióticos pertencentes ao grupo das polimixinas ou outros compostos do grupo dos fenóis, parabenos, biguanidas, compostos de amónio quaternário e álcoois, que de uma forma ou de outra interagem com componentes da membrana celular. Estes grupos de agentes químicos podem apresentar efeitos semelhantes, mesmo que apresentem estruturas significativamente diferentes (Maillard, 2002).

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em *Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

A ruptura de membranas celulares e, conseqüentemente, o efluxo do seu conteúdo citoplasmático é considerado a melhor medida de perturbação da permeabilidade celular reflectindo-se frequentemente num efeito bactericida. Este processo ocorre fundamentalmente pela adsorção e penetração dos agentes químicos para o interior da célula. Sucedem-se interações com lípidos ou proteínas da membrana celular, a saída de componentes intracelulares como o potássio ( $K^+$ ) e fosfatos inorgânicos e a degradação das proteínas e ácidos nucleicos (Lambert e Hammond, 1973; Denyer, 1995). A lise da parede celular causada por enzimas autolíticas é o processo final que leva à morte da célula.

A taxa e a extensão deste processo dependem dos microrganismos, do tipo de agentes químicos e dos factores que afectam a sua eficácia (ex: a concentração e temperatura) (ver ponto 3). A taxa de extravasamento pode ser maior nas bactérias de Gram positivo do que nas de Gram negativo devido à estrutura da sua parede celular (Davies *et al*, 1968; Russell e Furr 1977; Broadley *et al*, 1995; Ayres *et al*, 1999).

Outra forma dos “agentes activos membranares” actuarem é através do desequilíbrio da força motriz protónica (PMF). Esta é expressa como um gradiente de protões através da membrana citoplasmática devido à desigualdade na distribuição de cargas, do interior para o exterior da célula e está envolvida com o transporte activo, com a fosforilação oxidativa e com a síntese da adenosina trifosfato (ATP) na bactéria (Mitchell 1961, 1972). Os ácidos orgânicos e os derivados esterificados assim como os parabenos apresentam como alvo a PMF. Por exemplo, o ácido sórbico acelera o movimento de protões na *Escherichia coli* a pH ácido, para o citoplasma da célula (Eklund, 1985a). Outros estudos têm demonstrado que os ácidos orgânicos inibem a recaptação activa dos aminoácidos em *E. coli* e *Bacillus subtilis*. Mlynarcik *et al* (1981) observaram que a síntese de ATP em *Staphylococcus aureus* foi completamente inibida por três substâncias químicas distintas: sal de amônio quaternário, óxido de amina e álcool esterificado.

Os biocidas podem também interagir com várias enzimas que se encontram ligadas à membrana citoplasmática, ao interagirem, por exemplo com grupos “tiol”

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amónio Quaternário em  
*Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

das proteínas. A reacção com estes grupos ou a oxidação leva à inibição ou inactivação celular. O cobre e a prata actuam por este mecanismo. A inibição de enzimas envolvidas na glicólise, na síntese de ácidos gordos e fosfolípidos e a absorção de solutos, pode ser o resultado de uma exposição directa com o etanol (Russell e Hugo, 1994; Liau *et al*, 1997).

### **2.3 Interação com os componentes intracelulares**

Determinados corantes antibacterianos como cristal de violeta e a acridina actuam interagindo com o DNA. A acridina intercala-se entre as bases do DNA, bloqueando a síntese deste e a do RNA e, conseqüentemente, a de proteínas (Ciak e Hahn, 1967). A quinacrina, um fármaco usado para a malária, bloqueia a síntese de DNA, e inibe fortemente a síntese de RNA e proteínas na *E. coli* (Ciak e Hahn, 1967), mas bloqueia selectivamente a síntese de RNA em *B. cereus* (Seligman e Mandel, 1971). Outro exemplo ocorre com os agentes alquilantes tal como o óxido de etileno e formaldeído que afectam os nucleosídeos de purina e ácidos nucleicos, ao reagirem os grupos sulfidril e hidroxil (Hoffman, 1971; Adams *et al*, 1981).

Existem ainda moléculas biocidas que interagem com os ribossomas. Estes são responsáveis pela transdução de RNA mensageiro em proteínas. Alguns exemplos de biocidas que actuam sobre estes componentes são o peróxido de hidrogénio, o *p*-cloromercuribenzoato e a proflavina, embora os ribossomas possam não ser o local alvo principal. A actuação destes compostos nos ribossomas vai comprometer a síntese proteica (Nakamura e Tamaoki, 1968).

### **3. Factores que afectam a actividade dos Biocidas**

A actividade antimicrobiana de um biocida pode ser influenciada por factores ambientais e/ou intrínsecos que condicionam a sua eficácia sobre a acção os microrganismos (Lutey, 1995). A temperatura, o pH, a concentração e o tempo de acção são factores condicionantes para que o seu efeito seja observado. De uma forma geral, quanto mais elevada for a temperatura, maior for o tempo de contacto, e mais altas forem as concentrações do biocida, melhor e maior será o grau de desinfeção (Flemming e Schaule, 1996).

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amónio Quaternário em  
*Enterococcus spp* oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

O pH trata-se de um factor que apresenta divergências consoante o composto químico utilizado. A presença de matéria orgânica (sem incluir os microrganismos) e/ou inorgânica em suspensão é outro factor condicionante uma vez que, ao interagirem com os biocidas, torna-os menos disponíveis para actuarem (Flemming e Schaule, 1996).

A presença de biofilmes condiciona significativamente a acção dos compostos biocidas. A matriz polimérica do biofilme funciona como uma barreira protectora contra factores agressivos externos dos quais os biocidas são exemplo. Para que a acção seja mais eficaz, é necessário quebrar as ligações entre os polímeros constituintes do biofilme ou desestabilizá-lo tornando os microrganismos mais acessíveis à acção do biocida (Costerton e Lashen, 1984; Brown e Gilber, 1993; Russel, e Furr, 1986).

#### **4. Mecanismos de Resistência aos Biocidas**

A resistência microbiana aos biocidas deve-se ao uso intensivo e ao um armazenamento inadequado que resulta na aplicação de compostos activos em concentrações subinibitórias (Centers for Disease Control, 1974 Russell, 2002b). O aparecimento de resistências advém da presença de mecanismos associados à diminuição da concentração intracelular do biocida, abaixo do limiar que é prejudicial a bactéria (SCENIHR, 2009).

A resistência bacteriana aos biocidas foi descrita pela primeira vez na década de 50, quando se detectou a contaminação de formulações de compostos catiónicos (Adair *et al*, 1971; Chapman, 2003; Russell, 2002b). Desde então têm sido descritas várias situações da ineficácia destes compostos, incluindo da clorhexidina (Stickler, 1974), triclosano (Bamber and Neal, 1999; Heath *et al.*, 1998), gluteraldeído (Fraud *et al.*, 2001; Nomura *et al*, 2004), peróxido de hidrogénio (Dukan e Touati, 1996) e o cloreto de benzalcónio (Gillespie *et al*, 1986; Romão *et al*, 2005). Tal como acontece com os antibióticos, os microrganismos podem apresentar resistência intrínseca/natural ou adquirida aos biocidas (Tabela 1).

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em  
*Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

**Tabela 1: Mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos aos biocidas em bactérias (Hegstad *et al*, 2010)**

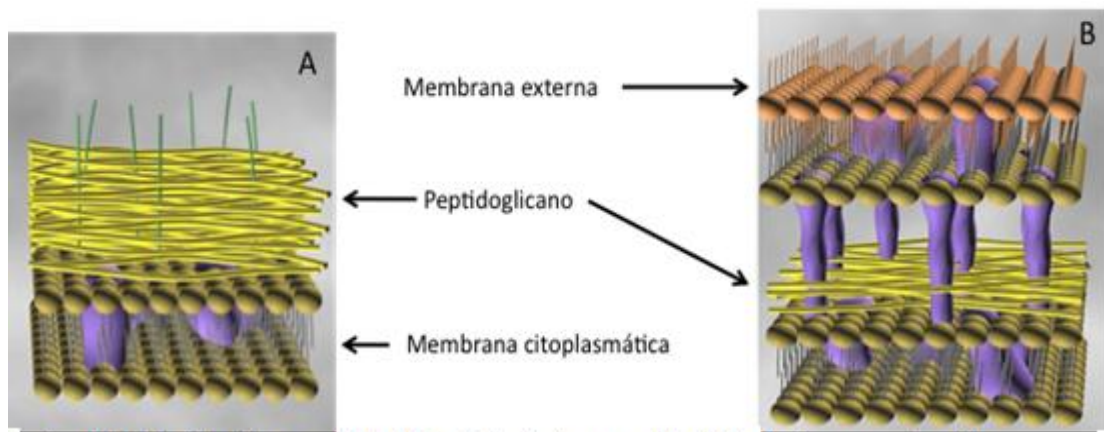
<b>Resistência</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Referências</b>
<b>Intrínseca</b>	<b>Barreiras associadas à permeabilidade da membrana</b>		McDonnell e Russell, 1999
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Membrana Externa</li> <li>- Paredes celulares contendo lípidos complexos</li> <li>- Porinas de pequeno tamanho e ligações fortes LPS-LPS</li> <li>- Menos ácidos na membrana externa de LPS</li> <li>- Diminuição da expressão de porinas</li> </ul>	<p>Bactérias de Gram negativo <i>Mycobacterium</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>Algumas estirpes de <i>Proteus</i></p>	
	<b>Bombas de efluxo codificadas por genes inseridos em cromossomas</b>		Chen <i>et al.</i> , 2003; Levy, 2002; Morita <i>et al</i> , 2003; Randall <i>et al</i> , 2007; Romanova <i>et al</i> , 2006
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SdeXY</li> <li>- AcrAB-TolC</li> <li>- MexCD-OprJ</li> <li>- MdrL</li> </ul>	<p><i>Serratia marcescens</i> <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Listeria monocytogenes</i></p>	
<b>Adquirida</b>	<b>Mutantes com sobre expressão de bombas de efluxo</b>		He <i>et al</i> , 2004; Huang. <i>et al</i> , 2004; Huet <i>et a.</i> , 2008; Kaatz <i>et al</i> , 2005; Kaatz <i>et al</i> , 1995; Maseda <i>et a.</i> , 2009; Piddock, 2006;
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PmpM</li> <li>- SdeAB</li> <li>- MdeA, MepA, NorA</li> <li>- ArcAB-TolC</li> </ul>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium</p>	
	<b>Redução da permeabilidade ou estabilização da membrana através de modificações dos LPS, fosfolípidos ou proteínas de membrana</b>		Braoudaki e Hilton, 2005; Gillespie <i>et al</i> , 1986.
	<b>Bombas de efluxo codificadas por genes localizados em plasmídeos</b>		Bjorland <i>et al</i> , 2003; Ceccarelli <i>et al</i> , 2006; Hansen <i>et al</i> , 2007; Heir, 1995; Kazama <i>et al</i> , 1998; Paulsen <i>et al</i> , 1996; Poole, 2002; Poole, 2007; Yum <i>et al</i> , 2002
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>qacA</i>, <i>qacB</i>, <i>qacG</i>, <i>qacH</i>, <i>qacJ</i></li> <li>- <i>Smr</i>, <i>qacEΔ1</i></li> <li>- <i>OqxAB</i></li> <li>- <i>qacE</i>, <i>qacF</i>, <i>qacG</i>, <i>qacH</i>, <i>qacI</i></li> </ul>	<p><i>Staphylococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i> Várias bactérias de Gram negativo</p>	
<b>Desconhecida</b>	<b>Mecanismos de Resistência ainda não identificados</b>		

#### 4.1. Mecanismos de Resistência Intrínsecos

A resistência intrínseca é aquela que faz parte das características naturais, fenotípicas do microrganismo, transmitida apenas verticalmente à descendência (Hegstad *et al*, 2009).

Vários microrganismos são intrinsecamente resistentes aos biocidas. Esta resistência está frequentemente associada a fenômenos de impermeabilidade relacionada com a estrutura e a composição da parede celular das bactérias influencia a sua susceptibilidade a diferentes biocidas.

As bactérias de Gram positivo (Figura 2A) são bactérias cuja parede celular é essencialmente constituída por peptidoglicano e ácidos teicóicos. Nenhum destes constituintes parece interferir com a entrada de antissépticos e desinfetantes. Mesmo as substâncias de elevado peso molecular podem facilmente atravessar a parede celular. Isto explica a sensibilidade destes organismos a muitos agentes antibacterianos como os Compostos de Amônio Quaternário e clorohexidina (Russell, 1991, Russell, 1995). No entanto, sob determinadas circunstâncias, a espessura e o grau de ligações cruzadas do peptidoglicano (PEP) diminui a sensibilidade aos biocidas (Poxton, 1993).



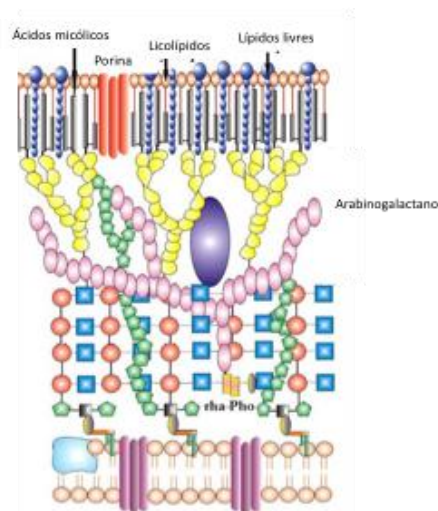
Constituição do invólucro celular de bactérias de Gram positivo (A) e de Gram negativo (B)  
([http://www.apsnet.org/edcenter/K-12/TeachersGuide/DNA\\_Easy/Article%20Images/cellwalls\\_compare.jpg](http://www.apsnet.org/edcenter/K-12/TeachersGuide/DNA_Easy/Article%20Images/cellwalls_compare.jpg))

As bactérias de Gram negativo (Figura 2B) são geralmente mais resistentes do que as bactérias de Gram positivo e micobactérias devido à presença de uma membrana externa, rica em lipopolissacarídeos que, dada a sua natureza lipófila, é impermeável

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em *Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

aos biocidas (Russell e Gould, 1988; Russell e Chopra, 1996). As moléculas hidrófilas de baixo peso molecular são capazes de passar esta barreira através dos canais de porina. A membrana externa das bactérias de Gram negativo confere uma resistência natural a moléculas como clorohexidina, glutaraldeído e cloreto de benzalcônio (Tabela 1) (Maillard, 2002). O aumento do conteúdo em  $Mg^{2+}$  (fortalece as ligações de lipopolissacarídeos) (McDonnell e Russell, 1999), a produção de proteínas de baixa eficiência (impede a difusão de moléculas para o interior da célula) (Maillard e Russell, 2000; Winder *et al*, 2000) e a alteração na composição dos ácidos gordos da membrana externa contribuem para o aumento das resistências aos biocidas em bactérias de Gram negativo.

A parede celular das micobactérias (Figura 3) é uma estrutura altamente hidrofóbica constituída por ácidos micólicos e lípidos, rica em peptidoglicano covalentemente ligado ao arabinogalactano (Wheeler *et al*, 1993). Dada a natureza hidrófila dos compostos biocidas, esta constituição funciona como uma barreira, impedindo a entrada de vários compostos, nomeadamente do gluteraídeido (Manzoor *et al*, 1999), dada a sua natureza hidrófila (Champlin *et al*, 2005, Denyer e Maillard 2002, Lambert 2002).



**Figura 3: Constituição da membrana celular das micobactérias** (<http://www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/fileadmin/REPORT/BIOTE/biote016.htm>)

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em *Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

A produção enzimática também é descrita como um mecanismo de resistência intrínseco aos biocidas, principalmente para metais pesados (ex: cobre, prata) (Cloete, 2003), parabenos (Valkova *et al*, 2001), aldeídos e peróxidos (Demple, 1996). Em termos de exemplo a superóxido dismutase e NAD+glutathione dihidrogenase actuam na degradação de peróxidos (Demple, 1996) e formaldeído, respectivamente (Brown e Gilbert, 1993, Brown e Gilbert, 1993). Estas enzimas existem naturalmente em algumas bactérias, nomeadamente na *P. aeruginosa* e *P. putida* (Kummerle *et al*, 1996).

A resistência intrínseca é muitas vezes associada à presença de bombas de efluxo capazes de remover os Compostos de Amônio Quaternário (Tabela 1). Estas podem actuar isoladamente ou em conjunto com um número basal de canais de porina. Na verdade, alguns autores consideram que estas bombas de efluxo podem estar relacionadas com a expulsão de metabolitos endógenos e por coincidência também servem para excluir substâncias nocivas.

Por exemplo, o locus *mar* em *E. coli* regula a expressão da bomba de efluxo *acrAB* (Ma *et al*, 1995; Ma *et al*, 1994). Este operão, localizado no cromossoma, codificado confere resistência a múltiplos compostos (ex: Compostos de Amônio Quaternário, triclosano, clorhexidina, ampicilina, cloranfenicol, ácido nalidixico, tetraciclina e rifampicina (Levy, 2002; Okusu, 1996) em diversas bactérias de Gram negativo (Okusu, *et al*, 1996). Em *Pseudomonas aeruginosa*, as bombas de efluxo *mexAB*, *mexCD* e *mexEF* são outros sistemas que expulsam uma gama de biocidas e antibióticos (ex: cloreto de benzalcónio, clorhexidina, quinolonas, macrólidos, tetraciclina, lincomicina, cloranfenicol novobiocina (Masuda, 2009; Masuda, 2000; Morita, 2003) que, juntamente com os canais de porina na membrana externa, restringem a acumulação de muitos agentes antimicrobianos nas células (Schweizer, 1998).

## 4.2. Mecanismos de Resistência Aquiridos

A resistência adquirida resulta da aquisição de novos genes de resistência por disseminação horizontal entre microrganismos, da produção mutações ou da combinação destes dois mecanismos (Russell, 2002a).

Apesar das mutações serem um mecanismo condicionante na evolução da resistência aos biocidas, a troca de genes é sem dúvida, aquela que mais contribui para maior variabilidade de resistências entre os microrganismos (Russell, 2002a).

### 4.2.1 Mutações

As mutações são alterações que ocorrem ao nível do DNA e reflectem-se por exemplo, na alteração de expressão de bombas de efluxo. Mutações em genes específicos podem levar à elaboração de proteínas alteradas que contribuem para um mecanismo de expulsão de biocidas e antibióticos mais eficiente (Nikaido, 1998, Levy, 2002, Hegstand *et al*, 2010). Por exemplo, as mutações que ocorrem no gene regulador de *E. coli* e *P. aeruginosa* levam a uma super expressão de *acrAB* e *mexAB*, quando as bactérias estão perante um composto específico (Schweizer, 1998). Quando a pressão selectiva é removida, as populações mutantes diminuem conservando, no entanto, a sua capacidade de efluxo, mesmo na ausência de indutores.

Também se verificou em *E. coli* a resistência ao triclosano devido a uma mutação no gene *fabI* que codifica a enzima *enoyl-acyl* redutase, proteína envolvida na biossíntese de ácidos gordos (Heath *et al*, 1998; McMurry *et al*, 1998a). Esta mutação não só altera o local de acção do biocida, como o impede de entrar na célula. Estas mutações também se verificaram em *S. aureus* (Heath *et al*, 2002a) e *Haemophilus influenzae* (Marcinkeviciene *et al*, 2001).

Os genes mutados podem ser mobilizados entre bactérias quando associados a elementos genéticos móveis ou mobilizáveis (ver ponto 4.2.2).

#### 4.2.2 Aquisição de novos genes por mecanismos de disseminação horizontal

Os microrganismos podem adquirir novos genes que lhes permitem resistir à ação dos biocidas por mecanismos de disseminação horizontal. Esses novos genes são mobilizados por elementos genéticos como plasmídeos ou transposões, entre bactérias que os possuem e outras em condições de os adquirirem (McDonnell e Russell, 1999).

A transmissão horizontal de determinantes genéticos de resistência trata-se de um mecanismo bem conhecido desde dos anos 60 (Gilbert e McBain, 2003).

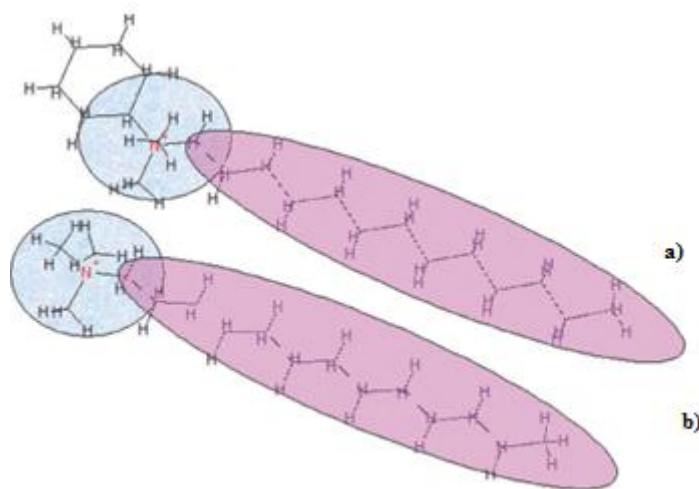
A primeira evidência de genes que codificam para resistências aos biocidas inseridos em plasmídeos encontra-se relacionada com os metais pesados (prata, mercúrio) (Chopra, 1991; Russell, 1997) e cobre (Cooksey, 1987). Transposões como Tn6009 em *Staphylococcus* spp, Tn21 em *Enterobacteriaceae* (Hegstad, 2010) transportam o operão *mer* relacionado com destoxificação de Hg<sup>2+</sup> a mercúrio volátil. Plasmídeos conjugativos de 100kb em *Enterococcus* spp são portadores do operão que expulsa o cobre (Hasman *et al*, 2002)

O uso de biocidas catiónicos, por outro lado, foi responsável pela propagação dos genes *qac* e, assim, pelo aparecimento generalizado que condificam para bombas de efluxo associadas a múltiplos compostos (para mais detalhes ver 5.1)

A presença de alguns plasmídeos (ex: RP1) em *E. coli* portadores dos genes mostrou também alterar a composição da membrana externa e reduzir a expressão proteínas de porina. Tais mudanças foram associadas à diminuição da sensibilidade à ceftrimida (Rossouw, 1984), clorhexidina e fenol (Klemperer, 1980).

## 5. Compostos de Amônio Quaternário

Os Compostos de Amônio Quaternário (QACs-*Quaternary Ammonium Compounds*) são tensoactivos catiónicos anfotéricos (Frier, 1971) pois possuem uma região hidrofílica, que lhes permite ligar a estruturas da mesma natureza, e uma região hidrofóbica que apresenta afinidade para compostos orgânicos. A parte hidrofóbica é geralmente composta por hidrocarbonetos (cadeias alifáticas, grupos aromáticos ou policíclicos). O grupo polar é constituído por uma molécula de azoto ( $N^+$ ) (Figura 4).



**Figura 4: Estrutura básica dos Compostos de Amônio Quaternário. A rosa encontra-se a cadeia de hidrocarbonetos, região apolar; a azul encontra-se o átomo de azoto carregado positivamente, fazendo parte da porção hidrófila. A imagem a) é o cloreto de benzalcônio, a imagem b) é a cetrimida (Gilbert e McBain, 2003).**

As propriedades antimicrobianas dos Compostos de Amônio Quaternário foram descobertas em 1916, no entanto, só em 1930 é que outros estudos puderam evidenciar o verdadeiro potencial destes compostos. Nesta altura foi descoberto que os compostos de cadeia longa, dos quais pelo menos um dos quatro radicais era constituído por um grupo alifático simples ou substituído com por um grupo com 8 a 18 átomos de carbono, apresentavam actividade germicida (Rahn, 1947). De facto, a actividade antimicrobiana dos Compostos de Amônio Quaternário depende do comprimento da cadeia *N-alquilo*, e assim da lipofília da molécula. Para bactérias de Gram positivo e

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amónio Quaternário em  
*Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

leveduras, a actividade ideal é alcançada com comprimentos de cadeia de 12 a 14 átomos de carbono, enquanto que, bactérias de Gram negativo, a actividade ideal é entre 14 a 16 átomos de carbono. Os compostos de cadeia menor que 4 e superior a 18 praticamente são inactivos (Gilbert, 2005).

Os Compostos de Amónio Quaternário são frequentemente utilizados em colírios de lágrimas artificiais, descongestionantes nasais, produtos de limpeza facial, formulações para o acne e cremes de protecção solar (Gilbert, 2005). Também se utilizam para lavagem de frutas e vegetais. São menos afectados que outros biocidas pela matéria orgânica, não são corrosivos excepto a elevadas concentrações e podem ser usados por grande período de tempo sem perder a sua actividade antimicrobiana (Bougeois *et al*, 1994).

### **5.1. Mecanismos de Acção dos Compostos de Amónio Quaternário**

Durante décadas, os Compostos de Amónio Quaternário foram designados de ‘agentes activos da membrana biológica’ ou somente como detergentes, por não se conhecer a especificidade do seu mecanismo de acção. Tal como já foi referido, os Compostos de Amónio Quaternário tratam-se de agentes químicos sintéticos com propriedades tensioactivas, com capacidade para interagir com diferentes estruturas quer de natureza lipófila quer de natureza hidrófila. Interagem inicialmente com as membranas das bactérias de Gram negativo e de Gram positivo de modo a deslocar os catiões que estabilizam esta estrutura, o  $Mg^{2+}$  e o  $Ca^{2+}$ . Esta acção pode ser complementada com a adição de agentes quelantes como o EDTA que perturbam a membrana, através do sequestro destes iões (Gilbert e Moore, 2005).

As soluções de Compostos de Amónio Quaternário formam agregados micelares que solubilizam compostos membranares hidrofóbicos como o lípido A das bactérias de Gram negativo e fosfolípidos. As interacções subsequentes dos Compostos de Amónio Quaternário com as proteínas da membrana lipídica dependem da natureza específica do agente tensioactivo. A membrana sofre uma transição do estado líquido para o estado cristalino, perdendo-se muitas das funções

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em  
*Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

osmorreguladoras e fisiológicas e, conseqüentemente, a liberação de íons de potássio e protões.

As concentrações intermédias destes agentes podem perturbar alguns processos bioquímicos como a biossíntese da parede celular, o transporte de solutos e a respiração oxidativa. As altas concentrações utilizadas em muitas formulações biocidas matam as células ao coagularem todos os constituintes intracelulares (Russell, 2002a).

Os Compostos de Amônio Quaternário também promovem a desorganização da membrana citoplasmática das leveduras, são esporoestáticos e micobacteriostáticos (Russel, 1996). Nos vírus, têm efeitos sobre vírus com invólucro como o HIV e HBV, mas apresentam actividade pouco significativa nos vírus sem invólucro. A actividade letal dos Compostos de Amônio Quaternário nos vírus está relacionada com o deslocamento do envelope causando a liberação dos ácidos nucléicos (Gilbert e McBain, 2003).

## **5.2. Mecanismos de Resistência dos Compostos de Amônio Quaternário**

A resistência bacteriana aos Compostos de Amônio Quaternário está fundamentalmente associada à produção de bombas de efluxo codificada por genes denominados de *qac*. As bombas de efluxo são proteínas que têm como função expulsar das células determinados compostos que lhes são nocivos. Estas podem apresentar apenas um único substrato como é o caso dos antibióticos ou transportar gama de compostos estruturalmente diferentes, podendo ser associadas a *multiple drug resistance* (MDR). As bombas de efluxo estão amplamente distribuídas quer em bactérias de Gram negativo quer em bactérias de Gram positivo (Paulsen, 1993; Brown e Skurray, 1996).

Actualmente estão descritos vários genes *qac* (o *qacA*, *qacB*, *qacC*, *qacD*, *qacE*, *qacG*, *qacH*, *qacI*, *qacJ*) (tabela 1) que codificam para bombas de efluxo que podem expulsar os Compostos de Amônio Quaternário e outros compostos (Bjorland *et al*, 2003; Correa *et al*, 2008; Hegstad *et al*, 2010). Por exemplo, o gene *qacA* codifica uma proteína que confere resistência aos Compostos de Amônio Quaternário, diamidinas, biguanidas e os compostos que se intercalam com o DNA

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em  
*Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

nomeadamente o brometo de etídeo (Littlejohn, 1992). O gene *qacB* é idêntico ao gene *qacA* com a diferença de 7 a 9 pares de bases (Alam, 2003), tornando-se difícil de os distinguir por PCR, sendo por isso representado por *qacA/B*. O *qacC*, também designado de *smr*, *qacD* e *ebr* e confere resistência aos Compostos de Amônio Quaternário e corantes (Littlejohn, 1992).

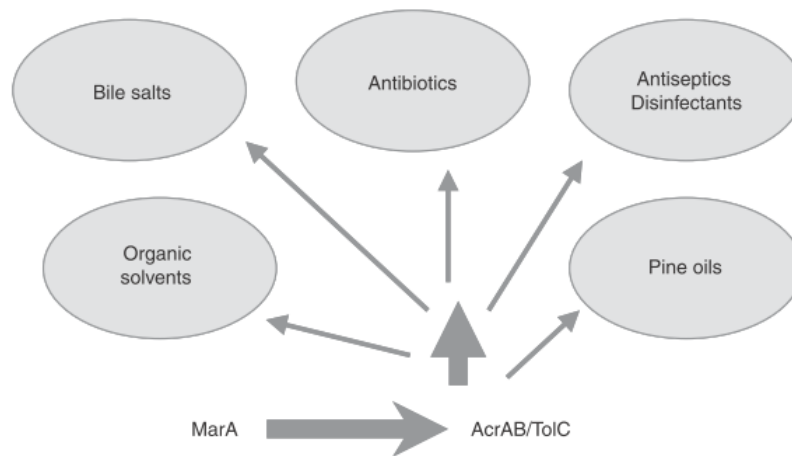
## **6. O uso de Biocidas e Antibióticos - Motivos para Preocupação?**

Ao contrário do que a maioria da população acredita, a redução da susceptibilidade aos biocidas não é um fenómeno recente. Embora haja poucas evidências de que bactérias resistentes aos antibióticos possam ser menos susceptíveis aos biocidas, a questão fundamental é se a introdução dos biocidas na prática clínica, no ambiente domiciliar, nos alimentos e indústrias contribuíram para a seleção de bactérias resistentes aos antibióticos (Bal, 2006).

Tem sido comprovado que o uso generalizado dos biocidas reduz a possibilidade de infecção. No entanto, o aparecimento de genes de resistência a antibióticos é cada vez mais acentuado. Diversos estudos demonstram existir ligação entre o uso de biocidas e a resistência aos antibióticos (Aiello e Larson 2003; Kunonga *et al*, 2000; Levy, 2000; Moken *et al*, 1997), outros apresentaram dados que uma única exposição a determinados conservantes como ácido nítrico de sódio, benzoato de sódio ou ácido acético induzem resistências bacterianas a múltiplos antibióticos como tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidixico ou ciprofloxacina, embora os níveis clínicos de resistência não tivessem sido alcançados (Aiello e Larson, 2003; Kunonga *et al*, 2000). Apesar de ainda existirem poucos estudos relativamente há diminuição da susceptibilidade das bactérias resistentes aos antibióticos associadas à resistência aos biocidas, surgem várias dúvidas e questões que implicam a necessidade do desenvolvimento de diversos estudos a longo prazo.

## 6.1 Co-resistência e Resistência Cruzada

A **resistência cruzada** é um fenómeno bem conhecido e ocorre quando os antibióticos apresentam o mesmo local alvo, podendo ou não pertencer à mesma classe (Levy, 2002). No caso dos biocidas, ainda são poucas as evidências de resistência cruzada (Levy, 2002; Piddock, 2006; Thorrold *et al*, 2007). Por exemplo, as mutações em genes que regulam a expressão de bombas de efluxo tanto podem afectar a saída de antibióticos como de biocidas. É o caso do gene *mar* em *E. coli* que regula a expressão da bomba de efluxo *acrAB* (Ma, *et al*, 1995; Ma *et al*, 1994). Uma mutação neste gene, tanto afecta o transporte dos antibióticos tetraciclina, ciprofloxacina, fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactâmicos e novomicina, como dos compostos biocidas brometo de etídeo, acriflavina e QACs (Okusu *et al*, 1996) (Figura 5).



**Figura 5: O gene *marA* localizado em locus *mar* de *E. coli* causa a hiper produção das bombas *AcrAB/TolC* permitindo o efluxo de solventes, antisépticos, desinfectantes (Levy, 2002).**

As alterações na permeabilidade da membrana celular tanto podem afectar antibióticos como biocidas. Por exemplo, *Pseudomonas stutzeri* demonstraram aumentar a resistência aos Compostos de Amônio Quaternário, triclosano, polimixina B, gentamicina, ácido nalidixico, eritromicina e ampicilina, como

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em  
*Enterococcus spp* oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

resultado da alteração da permeabilidade da membrana externa (Russell, A. D. 2000).

A **co-resistência** ocorre quando vários genes de resistência se encontram inseridos no mesmo segmento genético como plasmídeos, integroes ou transposões (Bal, 2006, Russell, A. D. 2000). Neste caso, todos os genes de resistência inseridos nestes elementos genéticos podem ser transferidos simultaneamente para outra bactéria hospedeira. Existem algumas publicações que referem, por exemplo, que os plasmídeos pST6, pSK4, e pSK41 e os transposões Tn552 e Tn4002 apresentam genes *qac* localizados junto de genes de resistência a antibióticos como a gentamicina, trimetoprim, penicilina, canamicina (Gilbert, McBain, 2003). Yamamoto *et al* (1988) detectou num MRSA possuía um plasmídeo (pASJ1) com vários genes de resistência aos aminoglicosídeos, brometo de etídeo, cloreto de benzalcônio e clorohexidina. Este plasmídeo era transferido para a *E. coli* que continuava a expressar todos os genes de resistência aos antibióticos e biocidas.

A contribuição do uso de biocidas para o problema global da resistência aos antibióticos é ainda difícil de avaliar uma vez que não existem dados epidemiológicos suficientemente robustos. De modo a compreender e controlar a resistência aos biocidas e antibióticos, é essencial o desenvolvimento de mais estudos epidemiológicos e genéticos e o desenvolvimento de metodologias reprodutíveis que permitam avaliar o fenótipo de susceptibilidade dos microrganismos a diferentes compostos.

## **II. Objectivos**

Desconhece-se ainda a verdadeira contribuição do uso de biocidas para a selecção de bactérias resistentes aos antibióticos. Tendo em consideração que os Compostos de Amónio Quaternário são frequentemente utilizados em desinfectantes e antisépticos e a escassez de dados relacionados com a distribuição dos genes que codificam para a resistência a estes compostos em bactérias de Gram positivo, constituíram objectivos deste estudo:

- Pesquisa genes de resistência aos Compostos de Amónio Quaternário (genes *qac* descritos em bactérias Gram positivo e Gram negativo, em isolados de *Enterococcus* spp provenientes de diferentes nichos ecológicos, espécies e com diferentes perfis de resistência aos antibióticos.
  
- Fazer uma pesquisa *insílico* dos genes pesquisados na colecção de *Enterococcus* spp no sentido de conhecer a sua distribuição em diferentes hospedeiros bacterianos.

### **III. Material e Métodos**

#### **1. Origem das bactérias incluídas no estudo**

*Enterococcus* spp incluídos neste estudo pertencem a uma colecção de bactérias que, na última década, tem vindo a ser caracterizada no Laboratório da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Desta colecção foram seleccionados 333 isolados representativos de vários nichos ecológicos, espécies e perfis de resistência aos antibióticos. De cada nicho ecológico foram seleccionados:

- a) Cento e noventa e sete isolados de suiniculturas do Norte, Centro e Sul do País, obtidos entre 2006 e 2007. As amostras foram divididas em cinco grupos diferentes consoante a sua natureza:
  - Suínos: n = 40 (fezes, zaragatoa rectal, da narina e da superfície dos animais)
  - Água e alimentos: n = 30 (ração dos leitões e comedouro, alimento medicamentoso de marca desconhecida, água para consumo não tratada e tratada com cloro, bebedouros)
  - Resíduos: n = 61 (lagonagem, chorume, esterco seco, fossa séptica, água residual)
  - Antiséptico da marca Mystral<sup>TM</sup>: n = 6
  - Amostras das instalações: n = 59 (ar, parede e pavimento, pó das diferentes salas com animais, ventilação, ninho dos leitões, doseador da ração, terra utilizadas por suínos de diferentes idades, terra em fase de pousio não usada por suínos no momento da colheita, jaula de gestação, maternidade, água limpa e suja.
  
- b) Águas residuais urbanas, hospitalares e de rio (n=43 isolados), obtidas entre 2001 e 2003.
  
- c) Saladas prontas a comer (n=11 isolados) provenientes de diversos supermercados da área do Porto, obtidas durante o ano de 2011

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amónio Quaternário em  
*Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

- d) Amostras clínicas (n=87 isolados) provenientes de pacientes hospitalizados em quatro hospitais do Centro e Norte do país, obtidas entre 1996 e 2010).

Estes 333 isolados foram previamente identificados por PCR em várias espécies (*E. faecium* n = 158, *E. faecalis* n = 87, *E. hire* n = 33, *E. gallinarum* n = 6, *E. casseliflavus* n = 5, e outros *Enterococcus* spp n = 44). Apresentaram resistência a várias famílias de antibióticos nomeadamente eritromicina - 87%, tetraciclina - 56%, estreptomicina - 45%, ciprofloxacina - 40%, canamicina - 34%, minociclina - 31%, gentamicina - 28%, cloranfenicol - 23%, vancomicina - 23%; teicoplanina - 16%, ampicilina - 13%, nitrofurantoína - 1%.

## **2. Amplificação dos Ácidos Nucléicos - Polymerase Chain Reaction (PCR)**

### **2.1. Pesquisa de genes que conferem resistência aos compostos de amónio quaternário**

A pesquisa de genes que conferem resistência aos compostos de amónio quaternário foi realizada através de 12 reacções de PCR utilizando os *primers* e as condições descritas nas Tabelas 2 e 3. Em todas as reacções de PCR foram adicionados controlos negativos e os controlos positivos de *qacA/B* (*Staphylococcus epidermidis*), *qacGI* (*staphylococcus epidermidis*, Correa *et al*, 2008), *qacHI* (*Streptococcus gallolyticus* SN298, Novais *et al*, estirpe da Faculdade Farmácia Universidade Porto), *qacHII* (*Enterococcus faecalis* V583, NP\_816932.1), *qacHIII* (*Salmonella entérica* serótipo *Wien* estirpe Alex 29, Novais *et al*, estirpe da Faculdade Farmácia Universidade do Porto), *qacJ* (*Staphylococcus epidermidis*, Correa *et al*, 2008), *qacEΔ1* (*Salmonella entérica* serótipo *Wien*, estirpe Alex 29, Novais *et al*, estirpe da Faculdade Farmácia Universidade do Porto), *smr* (*Staphylococcus epidermidis*, Correa *et al*, 2008).

**Tabela 2: Primers utilizados para amplificação dos genes *qac***

Gene	Primers	Sequência	Temperatura Annealing	Tamanho do produto amplificado	No. Acesso do Genbank	Referência Bibliográfica
<i>qacC</i>	<i>qacC</i> - F	5'- TAAACCGGGTCCGCCACCGT- 3'	66	170 bp	NZ_ACGZ02000032.	Este estudo
	<i>qacC</i> - R	5'- AGCTGCGACCGCCTGATTG - 3'	66			
<i>qacA/B</i>	<i>qacA/B</i> - F	5'- CTATGGCAATAGGAGATATGGTGT-3'	68	417 bp	CP002120.1	Smith <i>et al</i> , 2007
	<i>qacA/B</i> - R	5'- CCACTACAGATTCTTCAGCTACATG-3'	72			
<i>qacGI*</i>	<i>qacGI</i> - F	5'- TTTCGTTTGGGAATTTGCTTT- 3'	54	213 bp	GQ900412.1	Vali <i>et al</i> , 2008
	<i>qacGI</i> - R	5'- AATGGCTTTCTCCAAATACA- 3'	54			
<i>qacGII*</i>	<i>qacGII</i> - F	5'- GTCGGGCCTCGGGATCGTCTT- 3'	70	115 bp	FJ950725.1	Este estudo
	<i>qacGII</i> - R	5'- GAGCACAGCAACGCCGCTGATA- 3'	70			
<i>qacHII*</i>	<i>qacHII</i> - F	5'- ACCGACAGCTGACCATGTTGCA - 3'	68	115 bp	NZ_AEEM01000018.1	Este estudo
	<i>qacHII</i> - R	5'- GCCTATTCCAACCGTTTCTGCCC - 3'	62			
<i>qacHIII*</i>	<i>qacHIII</i> - F	5'-CAATAGTCAGTGAAGTAATAGGCAGTG- 3'	76	295 bp	AE016833.1	Vali <i>et al</i> , 2008
	<i>qacHIII</i> - R	5'- TGTGATGATCCGAATGTGTTT- 3'	58			
<i>qacHIII*</i>	<i>qacHIII</i> - F	5'- GGCTCTTCTGGCTATTG- 3'	66	177 bp	GU067642.1	Antunes <i>et al</i> (comunicação pessoal)
	<i>qacHIII</i> - R	5'- AAACAGCATAAGCAATGCCG- 3'	58			
<i>qacHIV*</i>	<i>qacHIV</i> - F	5'- ATCGCCCCGACTACGATTGCAAT- 3'	70	149 bp	NZ_ACGZ02000032.	Este Estudo
	<i>qacHIV</i> - R	5'- GCAATGCAACGCCTGCCGT- 3'	62			
<i>qacJ</i>	<i>qacJ</i> - F	5'- GGCCAACATTAGGCACACTTA- 3'	62	232 bp	EU622635.1	Vali <i>et al</i> , 2008
	<i>qacJ</i> - R	5'- TGACTTGATCCAAAAACGTTAAGA- 3'	64			
<i>qacEA1</i>	<i>qacEA1</i> - F	5'- ATCGCAATAGTTGGCGAAGT- 3'	58	226 bp	M95287.4	Smith <i>et al</i> , 2007
	<i>qacEA1</i> - R	5'- CAAGCTTTTGCCCATGAAGC- 3'	60			
<i>smr</i>	<i>Smr</i> - F	5'- ATAAGTACTGAAGTTATTGGAAGT- 3'	62	286 bp	X15574.1	Vali <i>et al</i> , 2008
	<i>Smr</i> - R	5'- TTCCGAAAAATGTTTAACGAAACTA- 3'	62			
<i>qacF</i>	<i>qacF</i> - F	5'- TTGTGGCTGGCTACGGGCTTG- 3'	68	170 bp	AF034958.3	Este estudo
	<i>qacF</i> - R	5'- TCCCATGCCAATGAACGCCCA- 3'	66			

\*A numeração I, II, III foi atribuída aleatoriamente a genes designados com o mesmo nome na literatura ou na base de dados, mas cuja composição nucleotídica é diferente.

Tabela 3: Condições de PCR utilizadas para a pesquisa de genes *qac*

Reagentes	Marca	Concentração Stock	Concentração Final	Condições do Termociclador
Água ultra pura				95°C – 10 min (1 ciclo)***
dNTP	Finzymes	10 mM	1 X	94°C – 30seg. <i>Annealling</i> ** - 30seg. 72°C – 30seg. (25 ciclos)
MgCl <sub>2</sub>	Promega	25 mM	2 mM	
Primer F*	Stabvida	100 µM	0,5 µM	72°C – 10 min. (1 ciclo)
Primer R*	Stabvida	100 µM	0,5 µM	
Taq polimerase	Promega	5U/ul	1,25 U	
Tampão de PCR	Promega	5X	1X	

\*Ver Tabela 2

\*\*A temperatura de *annealling* utilizada para os *qacHIII*, *qacA/B*, *qacGI*, *qacHIV* e *smr* foi de 45°C; para o *qacEA1* de 50°C; para os *qacHII* e *qacJ* de 47°C e para os *qacC*, *qacGII*, *qacHI*, *qacF* de 55°C

\*\*\* Este passo promove a lise bacteriana, facilitando e libertação de DNA directamente para a reacção de PCR

## **2.2 Visualização dos produtos de amplificação**

Os produtos de amplificação que resultaram das reacções de PCR foram analisados após uma electroforese horizontal com gel de agarose a 1,2% em tampão tris-acetato-EDTA (TAE) 1X, contendo 0,01% de *fluorescente-Syber Safe DNA* gel strain como revelador de DNA.

Transferiu-se cerca de 10µL do produto amplificado para o gel de agarose, adicionando um marcador de peso molecular (Hiperladder IV, Bioline), seguindo as condições previamente descritas pelo fabricante.

A electroforese foi efectuada a 110 volts, durante 30 minutos. Os resultados observados a partir de um transiluminador e adquiridos digitalmente segundo o programa QuantiOneVersion 4.6.1 Build 055.

O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado pela comparação da altura das bandas obtidas com aquelas presentes no marcador de pesos moleculares, cujo tamanho é conhecido (Anexo).

## **3. Sequenciação dos produtos amplificados e interpretação dos resultados**

Os produtos de PCR purificados foram enviados para a empresa STABVIDA (Oeiras, Portugal) para se proceder à respectiva sequenciação. As reacções de sequenciação foram efectuadas num sequenciador automático ABI 3700 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, Foster City, CA). As sequências foram enviadas a partir de cromatogramas, sendo posteriormente lidos pelo programa *Software Chromas*. As sequências obtidas foram comparadas com aquelas que se encontram em bancos de dados genéticos mundiais, nomeadamente no GenBank, através da ferramenta “BLASTN alignment”.

#### **4. Avaliação da dispersão dos genes *qac* estudados em diferentes hospedeiros bacterianos através de análise *in silico***

As bases de dados genéticas contêm informação por interpretar uma vez que as sequências nucleotídicas aí depositadas podem não ter sido descritas em artigos científicos, podem estar mal anotadas pelos investigadores ou corresponderem a determinantes genéticos que não foram identificados no momento da sua submissão ao GenBank.

No sentido de compreender melhor a dispersão dos genes *qac* estudados em diferentes hospedeiros bacterianos, procedeu-se à sua pesquisa através de uma abordagem *in silico* no GenBank. A sequência nucleotídica (número disponível na Tabela 2) usada para o desenho de *primers* específicos de cada gene *qac* foi lançada na base de dados usando a ferramenta *tblast* que traduz automaticamente a sequência nucleotídica numa sequência aminoacídica. A pesquisa por sequência aminoacídica permite fazer a comparação dos genes estudados com um maior número de entradas genéticas, que de outra forma não se conseguiriam detectar.

## IV. Resultados

### 1. Pesquisa de genes resistentes aos compostos de amônio quaternário

Entre os 333 isolados analisados foi detectado o gene *qacHII* num *E. faecalis* (E241) (Figura 6).

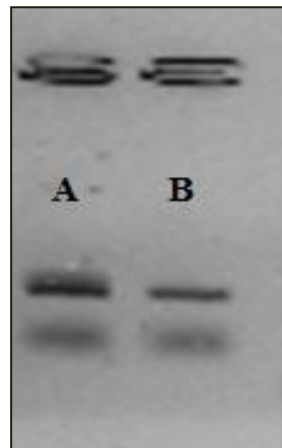


Figura 6: Amplificação do gene *qacHII*. A – Controlo positivo, [REDACTED]

Esta bactéria proveio de uma água residual de um hospital do Norte do país e apresenta um perfil de resistência a ampicilina, tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacina, gentamicina e estreptomicina (Novais *et al*, 2005). A amplificação deste *qacHII* por PCR foi confirmada por sequenciação (Figura 7).

Os restantes genes *qac* não foram identificados em nenhum dos isolados estudados.

```
Score = 363 bits (196), Expect = 3e-97
Identities = 202/205 (99%), Gaps = 0/205 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      TCTTCAGACGGTTTCFAAAATTATATCCAACATAACAACAGTCATTTACATACCTTATT 60
Sbjct 8775    TCTTCAGACGGTTTCFAAAATTATATCCAACATAACAACAATCATTTCATACCTTATT 8834

Query 61     TCTTTTTATTTCTGAGTAAACTATGCAACATTTACCACCTAATATTGCTTACGCAAGT 120
Sbjct 8835    TCTTTTTATTTCTGAGTAAACTATGCAACATTTACCACCTAATATTGCTTACGCAAGT 8894

Query 121    TGGTCAGGTTTAGGATTAGTATTAACAAGAATTGTTTCAGTTCTTATTTTCAAAGAACAA 180
Sbjct 8895    TGGTCAGGTTTAGGATTAGTATTAACAACAATTGTTTCAGTTCTTATTTTCAAAGAACAA 8954

Query 181    ATAAATTTAAGAAGCATTATTTCAA 205
Sbjct 8955    ATAAATTTAATAAGCATTATTTCAA 8979
```

Figura 7: Sequenciação do gene *qacHII*. Query - *E. faecalis*, E241; Subject - [REDACTED]

**Tabela 4: Dispersão dos genes *qac* e dos elementos genéticos em que estão inseridos em diferentes hospedeiros bacteriano**

Gene	Bactérias	Elemento Genético	No. Acesso do Genbank	Referências Bibliográficas
<i>qacC</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	Desconhecido	AL935263.2	Não publicado
<i>qacA/B</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> JKD6008, <i>S. epidermidis</i> , <i>S. hominis</i> SK119	Desconhecido	CP002120.1, GQ9004651, NZ_ACLP01000024.1	Benjamin <i>et al</i> , 2010
<i>qacGI</i> <sup>a)</sup>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Staphylococcus</i> spp	Plasmídeo (pST94)	EU622633.1, CAA76542.1	Correa <i>et al</i> , 2008, Heirn, Sundheim, Holck, 1998
<i>qacGII</i> <sup>b)</sup>	<i>Acinetobacter baumannii</i> , bactéria não cultivável, <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Citrobacter youngae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Integração de classe 1 inserido em plasmídeos (pJIBE401) e outros conjugativos sem designação	AAL38576.1, FJ172386.1, AJ609296.2, AF288045, FJ950725.1	Elizabeth <i>et al</i> , 2003; Espedido, <i>et al</i> , 2008; Tao Yu <i>et al</i> , 2010
<i>qacHI</i>	<i>Streptococcus gallolyticus</i>	Desconhecido	NZ_AEEM01000018.1	Não publicado
<i>qacHII</i> <sup>c)</sup>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> e <i>S. saprophyticus</i>	pST2H6	EU622634.1, EU622634.1	Correa <i>et al</i> , 2008
<i>qacHIII</i> <sup>d)</sup>	Bactéria não cultivável, <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Integração de classe 1 inserido em diferentes plasmídeos (exemplo: pCVM1562)	AAN41419.1, AAX56371.1, EF051037.1, EF408254.1, FJ748514.1, FR822749.1, CAI43346.1	Bischoff, 2005; Antunes <i>et al</i> , 2007; Colinon <i>et al</i> , 2010

**Tabela 4 (Continuação): Dispersão dos genes *qac* e dos elementos genéticos em que estão inseridos em diferentes hospedeiros**

Gene	Bactérias	Elemento Genético	No. Acesso do Genbank	Referências Bibliográficas
<i>qacHIV</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Desconhecido	CP002222.1	Não publicado
<i>qacJ</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Plasmídeo pNVH01 ou elemento desconhecido	NC_004562.1, ACC78798.1	Correa, 2008
<i>qacEΔ1</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Aeromonas salmonicida</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Aeromonas punctata</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Vibrio fluvialis</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Corynebacterium resistens</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Desulfurispirillum indicum</i> , <i>Riemerella anatipestifer</i>	Integrão de Classe 1 inserido em diferentes plasmídeos	HQ170513.2, JF714412.1, JF800674.1, AP012280.1, JF775514.1, CP001938.1, JF969163.1, GQ891753.1, HQ326183.1, FR822749.1, HQ184955.1, HQ401567.1, HQ401565.1, CP002432.1, HM173356.1, GQ891757.1, FN825254.1, FJ711659.1, FJ627181.1	Zhou <i>et al</i> , 2011; Chowdhury <i>et al</i> , 2001; Tijet <i>et al</i> , 2011; Xia <i>et al</i> , 2010
<i>smr<sup>e</sup></i>	<i>S. aureus</i> ; <i>S. warneri</i> , <i>S. pasteurii</i>	Plasmídeo (pSK41, pSW174, pSP187, plasmídeos mosaico)	NP_863640.1, NC_007165.1, NC_007167.1	Berg <i>et al</i> , 1998, Bjorland <i>et al</i> , 2006; Bjorlan <i>et al</i> , 2007; Chang <i>et al</i> , 2011
<i>qacF</i>	Bactéria não cultivável, <i>Salmonella entérica</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Integrão de Classe 1	FJ172420, HQ880284, FN827339	Gillings <i>et al</i> , 2009

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em *Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

- a) No Genbank existem sequências anotadas como *multidrug efflux protein* (*Staphylococcus aureus* – ADA62011.1) com 99% de homologia aminoacídica com *qacGI*.
- b) No Genbank existem sequências anotadas como *qacE2* (*Pseudomonas aeruginosa* – CAA11475.1 e *Enterobacter cloacae* – ACE81791.1, bactéria não cultivável – DQ462520.1) com 99% de homologia aminoacídica com *qacGII*.
- c) No Genbank existe uma sequência anotada como *multidrug efflux protein* (*Enterococcus faecalis* V583 – AE016833.1) com 98% de homologia nucleotídica com *qacH* de *Staphylococcus*.
- d) No Genbank existem sequências anotadas como *qacF* (*Salmonella entérica* – YP 209355.1), *qacE* (*Salmonella enterica* – YP 002112941.1), *qacI* (*Escherichia coli* – HQ875013.1) e *Small Multidrug Resistance Protein* (*E. coli* – AEHX01000110.1) que apresentam entre 98-99% de homologia com *qacHIII*.
- e) No Genbank existem sequências anotadas como *qacC* (*S. warneri* – NP 940784.1), determinante de resistência ao brometo de etídeo (*S. epidermidis* – NP\_647561.1, *S. aureus* – CAA44471.1), proteína de resistência a antisépticos (*S. aureus* – AAM94142.1) ou transportador *DMT superfamily drug/metabolite* (*S. epidermidis* – EES41161.1; *Enterococcus faecalis* – ACGL01000001.1) com 100% de homologia com o gene *smr*.

## V. Discussão dos Resultados

Com este trabalho pretendeu-se pesquisar uma variedade de genes *qac* que codificam para a resistência a Compostos de Amônio Quaternário em *Enterococcus* de várias espécies, provenientes de diferentes nichos ecológicos e resistentes a diversas famílias de antibióticos.

Embora *Enterococcus* spp adquiram e troquem facilmente genes com bactérias de diferentes géneros, só um isolado de uma água residual hospitalar era portador de um gene *qac* com homologia nucleotídica com *qacH* de *Staphylococcus haemolyticus* e *S. saprophyticus*. A análise *in silico* também revelou a presença deste gene em *Enterococcus faecalis* V583, mas com a designação de *multidrug resistance protein*. O número reduzido de *Enterococcus* spp com genes *qac* observado neste estudo sugere que este género bacteriano não constitui um reservatório dos diversos genes *qac* previamente descritos em bactérias de Gram positivo e de Gram negativo. No sentido de compreender se estes dados tinham apenas uma importância regional, procedeu-se a uma pesquisa *in silico* dos vários genes *qac* estudados nos genomas de *Enterococcus* spp recentemente disponibilizados. Esta análise veio corroborar os dados obtidos neste estudo, revelando que nos genomas de *Enterococcus* spp de várias espécies, nichos e regiões geográficas estes genes também não se encontravam presentes (excepção: *E. faecalis* V583, anteriormente mencionado e *smr* em *E. faecalis* TX0104). Na literatura, são raras as descrições de genes que codificam para a resistência a Compostos de Amônio Quaternário descritos em *Enterococcus* spp. Entre eles estão descritos o *qacZ*, presente em *E. faecalis* V583 (Braga *et al*, 2011), mas cuja sequência não está disponível no GenBank. Desta forma, não é possível avaliar se este gene corresponde a um gene novo ou se corresponde ao *multidrug resistance protein/qacH* referido acima para *E. faecalis* V583. Foi também descrito o gene *qacEΔ1* em isolados clínicos de *Enterococcus* (Kazama, 1998). Também pelo facto de esta sequência não estar disponível no GenBank, não foi possível confirmar a sua homologia com *qacEΔ1* frequentemente presentes em integrons de classe 1 de bactérias de Gram negativo. Recentemente foi detectado o *qacA/B* num isolado de gado e num isolado clínico

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em  
*Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

humano e o gene *smr* num isolado de fezes humanas e num de queijo (Bischoff, 2011) mostrando a existência de trocas genéticas entre *Enterococcus* e o gênero que normalmente é portador destes genes: *Staphylococcus*.

A ausência dos genes *qac* estudados em *Enterococcus* spp pode estar relacionada com os elementos genéticos que habitualmente os transportam. Por exemplo, *qacEΔ1* está associado a integrões de classe 1, raramente descritos em bactérias de Gram positivo (Bjorland *et al*, 2003). Os plasmídeos pST94 (*qacG*), pNVH01 (*qacJ*), pSK41/pSW174/ pSP187 (*smr*) só foram descritos em *Staphylococcus* spp (Bjorland *et al*, 2005; Bjorland *et al*, 2007). Se estes ou outros elementos genéticos portadores dos genes *qac* estudados tiverem dificuldade em se transferirem para *Enterococcus* spp ou se após a transferência não forem estáveis nestas bactérias, pode justificar os resultados obtidos. No entanto, a análise *in silico* de *E. faecalis* V583 mostrou que *qacH* está localizado num plasmídeo conjugativo pTEF1 e está flanqueado por duas sequências de inserção IS1216. Estas sequências de inserção têm sido descritas em abundância em *Enterococcus* spp (Hegstad *et al*, 2010) e têm um papel importante na evolução de diversos elementos genéticos, nomeadamente plasmídeos e transposições (Novais *et al*, Freitas *et al*; comunicação pessoal). Neste sentido, com a continuação do uso intensivo de Compostos de Amônio Quaternário, estas IS podem futuramente ajudar a dispersar os genes *qac*, nomeadamente *qacH*, através de elementos genéticos comuns na população de *Enterococcus* spp que consigam captar o conjunto IS-*qac*. Muitos destas unidades de captura genética poderão possuir genes de resistência aos antibióticos, tal como pTEF1 de *E. faecalis* V583 que tem genes que codificam para a resistência a aminoglicosídeos. A presença de genes *qac* e de resistência a antibióticos também se verifica em pST94, pNVH01 e pSK41/pSW174/ pSP187 de *Staphylococcus* ou em integões de classe 1 de bacilos de Gram negativo (Bjorland *et al*, 2005 Bjorland *et al*, 2007). Assim, o consumo intensivo de Compostos de Amônio Quaternário pode ajudar a seleccionar e a manter estes elementos genéticos com capacidade de conferir multi-resistência às bactérias que os adquirem.

Estes estudos também revelaram que uma análise genética cuidada é fundamental para compreender melhor a dispersão de vários genes. Muitos dos genes que codificam para resistência aos Compostos de Amônio Quaternário estão anotados com nomes

diferentes nas bases de dados genéticas. Por exemplo é o caso de *qacEΔ1*, *qacI* e *qacF*, todos com sequências iguais ou de *qacC* e *smr* de *Staphylococcus* que também representam o mesmo gene, entre outros exemplos referenciados na Tabela 4 dos resultados.

Apesar da ausência de genes *qac* na população de *Enterococcus* spp estudada, continua a ser fundamental a realização de mais estudos epidemiológicos ao longo do tempo que nos permitam avaliar a evolução e mobilização destes genes entre bactérias de géneros diferentes. Também é fundamental a realização de ensaios fenotípicos que permitam avaliar o comportamento de *Enterococcus* spp face a Compostos de Amônio Quaternário. Estes estudos poderão corroborar a ausência de genes encontrados neste trabalho através da inibição de bactérias a baixas concentrações. Pelo contrário, se se verificar a sobrevivência dos isolados a elevadas concentrações destes biocidas ou poderemos estar perante a presença de outros determinantes genéticos não procurados neste estudo. A recente disponibilidade de genomas completos de *Enterococcus* spp constitui uma oportunidade de procurar novos determinantes genéticos que codifiquem para resistência a Compostos de Amônio Quaternário em *Enterococcus* spp.

## VI. Bibliografia

Adair FW, Geftic SG, Gelzer J. (1971). Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds. *Applied Microbiology*, 21, pp1058-63.

Aiello AE, Larson E. (2003). Antibacterial cleaning and hygiene products as an emerging risk factor for antibiotic resistance in the community. *Lancet Infectious Disease*, (3), pp 501-6.

A.I.S.E. (Association Internationale de la Savonnerie, de la Détergence et des Produits d'Entretien International Association for Soaps, Detergents and Maintenance Products). [Em linha]. Disponível em <<http://www.aise.eu/downloads/biocid-PT.pdf>>. [Consultado em 11.02.11]

Alam M. M., Kobayashi N., Uehara N., Watanabe N., *Microbiology*. (2003) Drug Resist, 9, pp 109—121.

Antunes, P, Machado J, Peixe, L. (2007). Dissemination of *sul3*-Containing Elements Linked to Class 1 Integrons with an Unusual 3' Conserved Sequence Region among *Salmonella* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (51)4, pp1545-1548

Ayres, H.M., Furr, J.R. and Russell, A.D. (1999) Effect of permeabilizers on antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology* 28, 13–16.

Bischoff, K.M., White, D.G., Hume, M.E., Poole, T.L., Nisbet, D.J. (2005). The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that

confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letter*, 243 (1), pp 285-291

Bjorland, J., Steinum, T., Sunde, M., Waage, S., Heir, E. (2003). Novel Plasmid-Borne Gene *qacJ* Mediates Resistance to Quaternary Ammonium Compounds in Equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), pp 3046–3052

Björn A. Espedido, Sally R. Partridge, and Jonathan R. Iredell. (2008). *bla*<sub>IMP-4</sub> in Different Genetic Contexts in *Enterobacteriaceae* Isolates from Australia. *American Society for Microbiology*, 52(8), pp 2984-2987

Braga, T., Marujo, P., Pomba, C., Lopes, F. (2011) Involvement, and dissemination, of the enterococcal small multidrug resistance transporter *QacZ* in resistance to quaternary ammonium compounds. *Journal Antimicrobiology Chemotherapy*, pp 1-4.

Broadley, S. J., P. A. Jenkins, J. R. Furr, and A. D. Russell. (1991). Antimycobacterial activity of biocides. *Letter Applied Microbiology*, 13, pp118-122.

Broadley, S.J., Jenkins, P.A., Furr, J.R. and Russell, A.D. (1995). Potentiation of the effects of chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride on mycobacteria by ethambutol. *Journal of Medical Microbiology* 43, 458–460.

Brown, M. R. W., and P. Gilbert. 1993. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *Journal Applied Bacteriology*, 74, pp87S-97S.

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em  
*Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

Centers for Disease Control. (1974). Disinfectant or infectant: the label doesn't always say. *National Nosocomial Infections Study, Fourth Quarter, 1973*, pp18-23.

Chapman, S. (2003). Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Internacional Biodeterioration and Biodegradation*, 51, pp 271-6.

Chopra, I. (1991). Bacterial resistance to disinfectants, antiseptics and toxic metal ions,. In S. P. Denyer and W. B. Hugo (ed.), Mechanisms of action of chemical biocides: their study and exploitation. *Blackwell Scientific Publications, London, England*. pp 45–65

Ciak, J. and Hahn, F.E. (1967). Quinacrine (Atebrin): mode of action. *Science*, 156, pp 655–656

Cloete TE. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Internacional Biodeterioration and Biodegradation*, 51, pp 277-82

Cooksey, D. A. (1987). Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper-resistant strains of *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Applied Environmental Microbiology*, 53, pp 454–456.

Costerton, J.W., Irwin, R.T., Cheng, K.J., (1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*, 35, pp 299-324.

Denyer, S. P. (1995). Mechanisms of action of antibacterial biocides. *International Biodeterioration Biodegradation*, 36, pp 227-245

Denyer, S. P., and Stewart G. S. A. B. (1998). Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, pp. 261–268

Dong Li, Tao Yu, Yu Zhang, Min Yang, Zhen Li, Miaomiao Liu, Rong Qi. (2010). Antibiotic Resistance Characteristics of Environmental Bacteria from an Oxytetracycline Production Wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(11), pp 3444-3451

Dukan S, Touati D. (1996). Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *Journal Bacteriology*, 178, pp 6145-50.

El-Falaha, B.M.A., Rogers, D.T., Russell, A.D. and Furr, J.R. (1985a). Effect of some antibacterial agents on the hydrophobicity of wild type and envelope mutant of *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 12, pp 187–190.

El-Falaha, B.M.A., Russell, A.D. and Furr, J.R. (1985b) Effects of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride on the viability of wild type and envelope mutant of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology* 1, 21–24.

Elizabeth T. S. Houang, Yiu-Wai Chu, Wai-Sing Lo, *et al.* (2003). Epidemiology of Rifampin ADP-Ribosyltransferase (*arr-2*) and Metallo- $\beta$ -Lactamase (*bla*<sub>IMP-4</sub>) Gene Cassettes in Class 1 Integrons in *Acinetobacter* Strains Isolated from Blood Cultures in 1997 to 2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), pp 1382-1390

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em  
*Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

Even Heir, Gunhild Sundheim, Askild L Holck. (1998) Treatment Plant and the Receiving River The Staphylococcus qacH gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. *FEMS Microbiology Letters*, 163(1), pp 49-56

Fitzgerald, K.A., Davies, A. and Russell, A.D. (1992) Effect of chlorhexidine and phenoxyethanol on cell surface hydrophobicity of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 14, pp 91–95.

Flemming, H-C. e Schaule, G. 1996. Measures against biofouling. In: Heitz, E., Flemming, H-C e Sand, W. eds. *Microbially Influenced Corrosion of Materials*, Heidelberg, Springer – Verlag, 121-139.

Frier, M. 1971. Derivatives of 4-amino-quinaldinium and 8-hydroxyquino-line, p. 107±120. In W. B. Hugo (ed.), *Inhibition and destruction of the microbial cell*. Academic Press, Ltd., London, England.

Gilbert, P., Moore, L.E. (2005). Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal Applied. Microbiology*, 99, pp703–715.

Gilbert P, McBain A.J. (2001). Biocide usage in the domestic setting and concern about antibacterial and antibiotic resistance. *Journal Infectious*; 43, pp 85-91.

Gillespie M.T, May J.W, Skurray R.A. (1986) Plasmid-encoded resistance to acriflavine and quaternary ammonium compounds in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letter*; 34:47-51.

Hasman, H; Aarestrup, F. (2002). tcrB, a Gene Conferring Transferable Copper Resistance in *Enterococcus faecium*: Occurrence, Transferability, and Linkage to Macrolide and Glycopeptide Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp 1410-1416.

Heath RJ, Yu YT, Shapiro MA, Olson E, Rock CO. (1998). Broad spectrum antimicrobial biocides target the FabI component of fatty acid synthesis. *Journal Biology Chemical*, 273, pp 30316-20.

Heir, E., G. Sundheim, and A. L. Holck. (1999). The qacG gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *Journal Applied Microbiology*, 86, pp378–388.

Hegstad, K., Langsrud, S., Scheie, A. (2010). Does the Wide Use of Quaternary Ammonium Compounds Enhance the Selection and Spread of Antimicrobial Resistance and Thus Threaten Our Health?. *Microbial Drug Resistance*, 16(2), pp 91-103

Hegstad, K; Mikalsen, T; Coque, T; Werner, G; Sundsfjord, A. (2010). Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, *Clinical Microbiology Infectious*, 16, pp 541-554

Heir, E., G. Sundheim, and A. L. Holck. (1998). The *Staphylococcus* qacH gene product: a new member of the SMR family of multidrug resistance. *FEMS Microbiology Letter*, 163, pp 49–56

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em  
*Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

Hoffman, R.K. (1971) Toxic gases. In *Inhibition and Destruction of the Microbial Cell* ed. Hugo, W.B. pp. 225–258.

Howden, B., Seemann, P, Harrison, P, *et al.* (2010). Complete Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Strain JKD6008, an ST239 Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Intermediate-Level Vancomycin Resistance. *Journal of Bacteriology*, 192 (21), pp 5848-5849

Klemperer, R. M. M., N. T. Ismail, and M. R. W. Brown. 1980. Effect of R-plasmid RP1 and nutrient depletion on the resistance of *Escherichia coli* to cetrimide, chlorhexidine and phenol. *Journal Applied Bacteriology*, 48, pp 349–357.

Kummerle, N., Feucht, H.H., Kaulfers, P.M., (1996). Plasmid-mediated formaldehyde resistance in *Escherichia coli*: characterization of resistance gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, pp 2276-2279.

Levy, S. B. 2002. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Journal Applied Microbiology Supplement*, 92, pp 65s-71s.

Littlejohn TG, Paulsen IT, Gillespie MT. (1992) Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Letter*; 95, pp 259-266.

Liau, S.Y., Read, D.C., Pugh, W.J., Furr, J.R. and Russell, A.D. (1997) Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters in Applied Microbiology*, 25, pp 279–283.

Lutey, R.W. 1995. Process cooling water. *In*: Rossmore, H. W. ed. *Handbook of Biocide and Preservative Use*. Blakie Academic & Professional, Glasgow, UK, 51-82

McDonnell, G., and A. D. Russell. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:147–179.

Ma, D., D. N. Cook, M. Aiberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst. (1995). Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 16, pp 45–55

Ma, D., D. N. Cook, J. E. Hearst, and H. Nikaido. (1994). Efflux pumps and drug resistance in gram-negative bacteria. *Trends Microbiology*, 2, pp 489–493

Nikaido, R., M. Basina, V. Nguyen, and E. Y. Rosenberg. (1998). Multidrug efflux pump *acrAB* of *Salmonella typhimurium* excretes only those beta-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *Journal Bacteriology*, 180, pp4686–4692.

Okusu, H., D. Ma, and H. Nikaido. (1996). *acrAB* efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple antibiotic-resistance (Mar) mutants. *Journal Bacteriology*, 178, pp 306–308.

Maillard, J.Y. (2002). Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92, pp. 16S-27S

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em  
*Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. (1998a), Overexpression of marA, soxS, or acrAB produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letter*, 166, pp 305-9.

Mitchell, P. (1972) Chemiosmotic coupling in energy transduction: a logical development of biochemical knowledge. *Journal of Bioenergetics*, 3, 5–24.

Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type of mechanism. *Nature, London*, 191, 144–148

Moken MC, McMurry LM, Levy SB. (1997). Selection of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: Roles of the mar and acrAB loci. *Antimicrobiology Agents Chemother*, 41, pp 2770-2.

Nakamura, K. and Tamaoki, T. (1968). Reversible dissociation of *Escherichia coli* ribosomes by hydrogen peroxide. *Biochemica and Biophysica Acta*, 161, pp 368–376.

Nikaido, H., S.-H. Kim, and E. Y. Rosenberg. (1993). Physical organization of lipids in the cell wall of *Mycobacterium chelonae*. *Molecular Microbiology*, 8, pp 1025-1030.

Novais, C; Coque, T; Sousa, J; Peixe, L. (2006). Antimicrobial resistance among faecal enterococci from healthy individuals in Portugal, *Clinica Microbiology and Infectious Diseases*, 12(11), pp 1131- 1134

Paulsen IT, Littlejohn TG, Radstrom P. (1993). The 3´conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrobioly Agents Chemotherapy*; 37: 761-68.

Paulsen, I.T., M.H. Brown, T.G. Littlejohn, B.A. Mitchell, and R.A. Skurray. (1996). Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. *Proceeding of the Nacional Academy of Science USA*, 93, pp 3630–3635

Piddock, L.J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nature Review Microbiology*, 4, pp 629–636.

Poole, K. 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal Applied Microbiology*, 92, pp55S–64S.

Poxton, I. R. (1993). Prokaryote envelope diversity. *Journal Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 70, pp 1S-11S.

Romao CM, de Faria YN, Pereira LR, Asensi MD. (2005). Susceptibility of clinical isolates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital disinfectant and molecular typing. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, pp 541-8.

Rossouw, F. T., and R. J. Rowbury. 1984. Effects of the resistance plasmid R124 on the level of the OmpF outer membrane protein and on the response of *Escherichia coli* to environmental agents. *Journal Applied Bacteriology*, 56, pp 63–79.

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em  
*Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

Russell, A. D. (1995). Mechanisms of bacterial resistance to biocides. *Internacional Biodeterioration and Biodegradation*, 36, pp 247-265.

Russell, A. D. (1996). Activity of biocides against mycobacteria. *Journal Applied Bacteriology Symposium*. Supplement, 81, 87S-101S.

Russell AD. (2002b). Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *Journal Applied Microbiology*, 92, pp 121-35.

Russel A.D., Furr J.R. and Maillard J.Y. (2009). Microbial Susceptibility and Resistance to Biocides. *ASM News Features*, 63, pp. 481-487

Russell, A.D., Furr, J.R., Maillard, J.-Y. (1997) Microbial susceptibility and resistance to biocides: an understanding. *ASM News*, 63, pp 481–487.

Russell, A.D. and Hugo, W.B. (1994) Antimicrobial activity and action of silver. *Progress in Medical Chemistry*, 31, pp 351–371.

Russell, A. D., and N. J. Russell. (1999). Biocides: activity, action and resistance. *Symposium Society of General Microbiollogy*, 53, pp 327-365.

Russell, A. D., and J. R. Furr. (1986). Susceptibility of porin and lipopolysaccharid deficient strain of *Escherichia coli* to some antiseptics and disinfectants. *Journal Hospital Infectious*, 8, pp 47–56.

Seligman, M.L. and Mandel, H.G. (1971) Inhibition of growth and RNA biosynthesis of *Bacillus cereus* by quinacrine. *Journal of General Microbiology* 68, 135–148.

Russell, A.D. and Furr, J.R. (1977) The antimicrobial activity of a new chloroxylenol preparation containing ethylenediamine tetraacetic acid. *Journal of Applied Bacteriology*, 43, 253–260.

Schweizer, H. P. (1998). Intrinsic resistance to inhibitors of fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is due to efflux: application of a novel technique for generation of unmarked chromosomal mutations for the study of efflux systems. *Antimicrobiology Agents Chemotherapy*, 42, pp 394–398

SCENIHR, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, SCENIHR. (2009). Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides, pp 1-87

Stickler DJ. (1974). Chlorhexidine resistance in *Proteus mirabilis*. *Journal Clinical Pathology*, 27, pp 284-7.

Thomas L. Maillard J-Y, Lambert RJ, Russell AD. (2000). Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of 'residual' concentration. *Journal Hospital Infectiouses*, 46, 297-303.

**“Pesquisa de genes que conferem resistência aos Compostos de Amônio Quaternário em  
*Enterococcus* spp oriundos de diferentes nichos ecológicos”**

Thorrold CA, Letsoalo ME, Dusé AG, Marais E. (2007). Efflux pump activity in fluoroquinolone and tetracycline resistant *Salmonella* and *E coli* implicated in reduced susceptibility to household antimicrobial cleaning agents. *International Journal Food Microbiology*, 113, pp 315-20.

Wheeler, P. R., G. S. Besra, D. E. Minnikin, and C. Ratledge. (1993). Inhibition of mycolic acid biosynthesis in a cell-wall preparation from *Mycobacterium smegmatis* by methyl 4-(2-octadecylcyclopropen-1-yl)butanoate, a structural analogue of a key precursor. *Letter Applied Microbiology*, 17, pp 33-36.

Winder CL, Al-Adham IS, Abdel Malek SM, Buultjens TE, Horrocks AJ, Collier PJ. (2000). Outer membrane protein shifts in biocide-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal Applied Microbiology*; 89, pp 289-95.

Yum, J.H., D. Yong, K. Lee, H.S. Kim, and Y. Chong. (2002). A new integron carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. *Diagnosis Microbiology Infectious Disease*, 42, pp 217–219.